



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluss von Hitzestress auf die Viabilität  
probiotischer Bakterien und deren Resistenzbildung“

verfasst von

Birgit Maazouz

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreut von:

O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Ich bedanke mich bei Herrn O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein für die Unterstützung bei dieser Diplomarbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Mag. Dr. Sharareh Salar-Behzadi und DI Stefanie Stummer für die Hilfe während der praktischen Arbeit.

Aber vor allem danke ich meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums und der Hilfe in allen Lebenslagen.

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	5
1.1 Probiotika.....	5
1.2 <i>Enterococcus faecium</i> .....	7
1.3 <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	8
1.4 Stabilisierung probiotischer Mikroorganismen .....	9
1.5 Ziel der Studie .....	11
2 Materialien und Methoden .....	12
2.1 Materialien .....	12
2.1.2 Liste der verwendeten Geräte .....	12
2.1.2 Liste der verwendeten Materialien .....	13
2.2 Methoden .....	17
2.2.1 Kultivierung von <i>Enterococcus faecium</i> .....	17
2.2.2 Kultivierung von <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	18
2.2.3 Ernten und Waschen der Bakterien ( <i>E. faecium</i> und <i>L. reuteri</i> ) .....	18
2.2.4 Keimzahlbestimmung .....	18
2.2.5 Durchflusszytometrie .....	19
2.2.6 Bestimmung des DNA-Gehaltes .....	19
2.2.7 Stressen .....	20
2.2.8 Bestimmung der zellulären Aktivität .....	20
2.2.9 Fluid-Bed-Trocknung .....	23
2.2.10 Analyse der getrockneten Bakterien .....	24
2.2.11 Datenanalyse .....	24
3 Ergebnisse .....	25
3.1 <i>Enterococcus faecium</i> .....	25
3.1.1 Versuchsreihe <i>E. faecium</i> .....	25
3.1.2 Fluid-Bed-Trocknung .....	31

3.1.3 Stabilität nach Lagerung.....	36
3.2 <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	40
3.2.1 Einfluss von Hitzestress.....	40
3.2.2 Einfluss von Protektanten bei der Fluid-Bed-Trocknung.....	52
3.2.2.1 Magermilchpulver.....	52
3.2.2.2 Saccharose.....	55
3.2.2.3 Glucose.....	57
3.2.2.4 Dextrin.....	60
3.2.3 Stabilität nach Lagerung.....	63
3.2.3.1 Magermilchpulver .....	63
3.2.3.2 Saccharose.....	66
3.2.3.3 Glucose.....	69
3.2.3.4 Dextrin.....	72
3.2.4 Versuchsreihe <i>L. reuteri</i> .....	75
3.2.5 Fluid-Bed-Trocknung.....	81
3.2.6 Stabilität nach Lagerung.....	85
4 Diskussion .....	89
4.1 <i>Enterococcus faecium</i> M74.....	89
4.2 <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730.....	92
5 Zusammenfassung .....	97
6 Abstract .....	100
7 Verzeichnisse.....	102
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	102
7.2 Abbildungsverzeichnis .....	103
7.3 Quellenverzeichnis .....	108
8 Lebenslauf.....	112

# 1 Einleitung

## 1.1 Probiotika

Der Begriff Probiotika leitet sich vom griechischen „pro bios“ ab und bedeutet „für das Leben“.

Nach WHO (World Health Organization) und FAO (Food and Agriculture Organization) lautet die Definition: „Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die dem Wirt einen gesundheitlichen Vorteil bringen, wenn sie in ausreichender Menge aufgenommen werden.“ [1]

Eingesetzt werden vor allem Bakterien der Gattungen Lactobacillus und Bifidobakterium, aber auch Escherichia, Enterococcus oder Pilze wie Saccharomyces. [2]

Probiotika werden in Nahrungsmitteln v.a. Milchprodukten, Nahrungsergänzungsmitteln aber auch als Arzneimittel verwendet. Dabei können ein Stamm einer Spezies oder Mischungen mehrerer Stämme oder Spezies enthalten sein.

An Probiotika werden folgende Anforderungen gestellt: [1, 3]

- genaue taxonomische Identifizierung von Gattung, Spezies und Stamm, da die Eigenschaften und Wirkungen stammspezifisch sind und nicht ohne weiteres auf Bakterien der gleichen Gattung übertragen werden können
- Unbedenklichkeit: Es dürfen nur apathogene Stämme verwendet werden und es dürfen keine Toxine gebildet werden
- Resistenz gegenüber Magensäure und Gallensalzen:  
Um den Darm lebend, in aktiver Form und ausreichender Zahl erreichen zu können, müssen Probiotika die Magen-Darm-Passage unbeschadet überstehen.
- Gewährleistung einer ausreichend hohen Keimzahl und der Aktivität während der Produktion und der Lagerung bis zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums
- Nachweis der Wirksamkeit probiotischer Zubereitungen anhand klinischer Studien

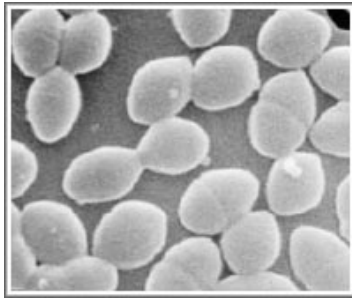
Die klassische Anwendung der Probiotika liegt in der Aufrechterhaltung bzw. Verbesserung des Gleichgewichtes der Darmflora. [4]

Sie können bei einer Vielzahl von Erkrankungen präventiv oder therapeutisch eingesetzt werden: [3, 5, 6, 7]

- Verschiedene Durchfallerkrankungen: Reisediarrhoe, infektiöse Diarrhoe, Antibiotika-assoziierte Diarrhoe [8, 9]
- Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, z. B. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn [10]
- Helicobacter pylori-Infektion [11]
- Harnwegsinfekte, Urogenitalentzündungen [12, 13]
- Karies und Zahnfleischentzündung [14]
- Allergien [15, 16]
- Lactoseintoleranz [4,17]
- Stärkung des Immunsystems [18] und Vorbeugung von Infektionen [19]
- Senkung des Cholesterolspiegels [20, 21]
- Bluthochdruck [22]
- Kardiovaskuläre Erkrankungen [23, 24]
- Krebsprävention, v.a. Dickdarmkrebs [25, 26]

Die genauen Wirkmechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Probiotika sind lebende Organismen, die sich im Darm bzw. dem gewünschten Wirkort ansiedeln und vermehren sollen. Dadurch soll das Wachstum anderer, v.a. pathogener Organismen verhindert werden. Das geschieht zum einen durch Konkurrenz um Nährstoffe und Blockade von Rezeptoren der Darmschleimhaut, sodass Pathogene nicht binden können. Weiters bilden probiotische Bakterien durch Fermentierung von Kohlenhydraten Milchsäure und kurzkettige Fettsäuren wie Essig-, Propion- und Buttersäure, außerdem Ethanol, Wasserstoffperoxid u.a.. So wird einerseits ein saures Milieu geschaffen, welches die Ansiedlung anderer Organismen erschwert oder verhindert und zum anderen wirken die Stoffe direkt antibakteriell. Darüber hinaus bilden einige Probiotika Bakteriocine mit antibakterieller Wirkung. Durch Stimulation des Mucosa-assoziierten Lymphsystems (MALT) wird das Immunsystem gestärkt durch Proliferation der Bildung von Phagozyten, Lymphozyten, NK-Zellen und Antikörpern. [3, 4]

## 1.2 *Enterococcus faecium* [27, 28]



**Abb. 1: *Enterococcus faecium***

<http://www.qualityhealth.com/colds-infections-articles/7-germs-kill>

*E. faecium*-Keime sind grampositive, fakultativ anaerobe und kokkenförmige Bakterien, die in Paaren oder kettenförmig vorliegen.

Sie sind Bestandteil der physiologischen Darmflora von Mensch und Tier, sie kommen aber auch auf Pflanzen, im Boden oder Abwasser vor.

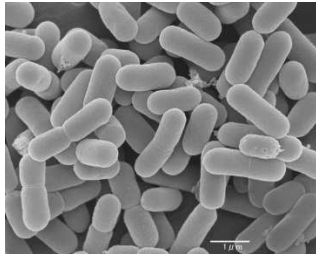
Es sind robuste Bakterien, die in einem Temperaturbereich von 10 – 45 °C wachsen können und auch kurzzeitige Temperaturen von 60 °C überleben. Sie sind relativ unempfindlich gegen Säure und Gallensalze.

*E. faecium*-Stämme bilden Milchsäure und Bacteriocine. Des Weiteren bestehen Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika.

Pathogene Stämme dieser Gattung können bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem Nosokomialinfektionen verursachen, wie z.B. Endocarditis, Sepsis oder Entzündungen des Harntraktes. Dabei stellt die Zunahme der Resistenzen gegen Standardantibiotika aber auch gegen Reserveantibiotika wie Vancomycin ein zunehmendes Problem dar. [29]

Angewendet werden *Enterococcus faecium* enthaltende Probiotika v.a. zur Prophylaxe und Therapie gastrointestinaler Beschwerden, außerdem werden sie in der Veterinärmedizin als Futtermittelzusatz zur Behandlung von Durchfällen und zur Stabilisierung der Darmflora verwendet.

### 1.3 *Lactobacillus reuteri* [30, 31]



**Abb. 2: *Lactobacillus reuteri***

[http://www.kimchitech.co.kr/lab\\_show/Lactobacillus\\_reuteri.jpg](http://www.kimchitech.co.kr/lab_show/Lactobacillus_reuteri.jpg)

*L. reuteri*-Keime gehören zur Gattung der Milchsäurebakterien. Es sind grampositive, anaerobe, stäbchenförmige Bakterien, die einzeln oder auch in Ketten vorliegen.

Sie sind Bestandteil der natürlichen Darmflora von Mensch und Tier. Sie kommen weiters in Pflanzen, Böden und im Abwasser vor. Außerdem sind sie in vielen Lebensmitteln enthalten wie Milch, Milchprodukten und Fleisch.

Durch Fermentation verschiedener Kohlenhydrate entsteht v. a. Milchsäure, aber auch Kohlendioxid, Ethanol und Essigsäure. Des Weiteren werden Folat und Vitamin B12 synthetisiert. Außerdem werden direkt antimikrobielle Substanzen gebildet, wie verschiedene Bacteriocine und Reuterin. [32]

Angewendet werden *Lactobacillus reuteri* enthaltende Probiotika u.a. bei gastro-intestinalen Beschwerden und zur Aufrechterhaltung der Vaginalflora.



## **1.4 Stabilisierung probiotischer Mikroorganismen**

Laut Definition müssen die verwendeten probiotischen Bakterien lebend und in ausreichender Menge aufgenommen werden. Das setzt voraus, dass eine erforderliche Mindestkeimzahl und die Aktivität der Bakterien während Herstellung, Transport und Lagerung bis zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums erhalten bleiben.

Bei der Herstellung probiotischer Zubereitungen werden die Mikroorganismen z.T. großen thermischen, osmotischen oder mechanischen Belastungen ausgesetzt, die zu einer starken Verminderung der Viabilität (Lebensfähigkeit) und Vitalität (funktionelle Eigenschaften) führen können.

Als lebende und stoffwechselaktive Bakterien sind Probiotika in wässriger Umgebung nur begrenzt lebensfähig und lagerfähig. Aus diesem Grund werden diese Mikroorganismen oft durch Trocknung stabilisiert. Dabei wird ihnen Wasser entzogen, wodurch ihr Stoffwechsel inaktiviert wird. Bei der Rehydrierung bilden sich wieder aktive und vermehrungsfähige Bakterien. Dennoch sind auch getrocknete Mikroorganismen nur begrenzt lagerfähig, je nach Bakterienstamm und Lagerbedingungen.

Um eine hohe Zahl lebensfähiger und stoffwechselaktiver Bakterien zu erhalten, kann durch verschiedene Maßnahmen Einfluss genommen werden. Beispielsweise kann man durch Variation des Nährmediums oder der Wachstumsbedingungen bei der Fermentation infolge adaptiver Vorgänge der Zelle Bakterien erhalten, die toleranter gegenüber verschiedenen Stressbedingungen sind. Auch können verschiedene cytoprotektive Stoffe zugesetzt werden, wodurch die Bakterien den verschiedenen Belastungen während des Herstellungsprozesses besser standhalten. [33, 34, 35] Des Weiteren richtet sich die Wahl der Stabilisierungsmethode nach der Bakterienart.

Die klassischen Trocknungsverfahren sind die Gefriertrocknung und Sprühtrocknung, aber auch andere Verfahren, wie die Wirbelschichttrocknung und Vakuumtrocknung, gelangen zunehmend an Bedeutung. Aufgrund neuer Erkenntnisse über den

gesundheitlichen Nutzen von Probiotika und dem dadurch ständig wachsenden Markt wird nach weiteren alternativen Technologien zur Stabilisierung geforscht.

Die Gefriertrocknung (Lyophilisation) findet schon seit Jahrzehnten breite Anwendung in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie, aber auch in vielen anderen Bereichen, wie z. B. zur Trocknung wassergeschädigter Bücher und Dokumente oder zur Trocknung archäologischer Funde. Sie ist ein schonendes Trocknungs- und Konservierungsverfahren für thermolabile, hochwertige Stoffe. Zunächst wird das Trocknungsgut tiefgefroren, anschließend wird das Wasser mittels Sublimation, d.h. direkter Übergang vom festen in den gasförmigen Zustand, entfernt. Durch Temperaturerhöhung wird auch stärker gebundenes Wasser entfernt. Wesentliche Nachteile sind die hohen Energiekosten und langen Prozesszeiten. [36]

Die Sprühtrocknung dient der Trocknung von Lösungen und Suspensionen. Dabei wird das Trocknungsgut mittels Düse oder rotierender Sprühscheibe in einen Heißluftstrom von bis zu 220 °C versprüht und augenblicklich getrocknet. Im Vergleich zur Gefriertrocknung ist diese Methode kostengünstiger, allerdings kommt es zu einer hohen thermischen Belastung. [37]

Diese klassischen Verfahren können zu Zellschädigungen durch das Einfrieren bzw. der enormen thermischen Belastung führen. Nicht zuletzt aus wirtschaftlichen Gründen werden Alternativen gesucht.

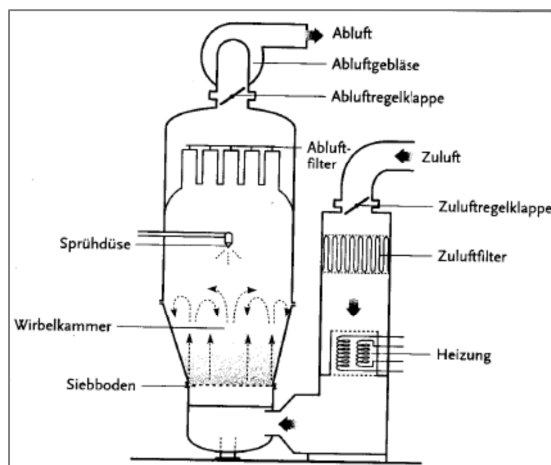
In der vorliegenden Studie wurde die Wirbelschichttrocknung als Alternative zu den herkömmlichen Methoden näher untersucht.

Die Wirbelschichttechnologie wird neben der Trocknung auch zur Granulation, zum Coating sowie bei der Sprühverkapselung eingesetzt. [38]

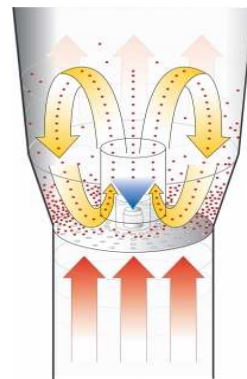
Das Gut, welches sich im Materialbehälter anfänglich auf einem Siebboden befindet, wird von einem Warmluftstrom hochgewirbelt und in Schwebe gehalten. Mittels einer Sprühvorrichtung werden Flüssigkeiten für Granulierung und Coating eingebracht. Die Teilchen werden in der Wirbelschicht intensiv durchmischt und gleichmäßig besprüht und getrocknet. Je nachdem, aus welcher Richtung besprüht wird, unterscheidet man top-spray (Gegenstrom)-, bottom-spray (Gleichstrom)-, tangential-spray-, sowie das Rotor-Verfahren. Beim Wurster-Verfahren, einer Variante des Gleichstromverfahrens, befindet sich im Materialbehälter ein zentraler

Führungszylinder. Die Bodenplatte enthält unter dem Zylinder viele und größere Perforationen, die zum Rand hin immer weniger und kleiner werden. Dadurch kommt es zentral zu einem starken Luftstrom. Die Partikel werden innerhalb des Zylinders nach oben gehoben, von unten besprüht, sinken nach außen ab und werden dabei getrocknet. Dieses Verfahren ermöglicht eine gleichmäßige Zirkulation der Partikel und ein homogenes Besprühen.

In der vorliegenden Studie wurde das Wurster-Verfahren eingesetzt. Dabei wurde eine Bakteriensuspension auf Pellets aus mikrokristalliner Cellulose gesprüht.



**Abb. 3: Wirbelschichtanlage Fa. Glatt**  
entnommen aus Voigt „Pharmazeutische  
Technologie“, Dt. Apotheker-Verlag



**Abb. 4: Wurster-Verfahren**  
[http://www.chemietechnik.de/bildergalerien/  
anzeigen/1284/5/text/112939/](http://www.chemietechnik.de/bildergalerien/anzeigen/1284/5/text/112939/)

## 1.5 Ziel der Studie

In der vorliegenden Studie war beabsichtigt, den Einfluss von Hitzestress auf die Viabilität der probiotischen Bakterien *Enterococcus faecium* und *Lactobacillus reuteri* sowie deren Resistenzbildung zu untersuchen.

Außerdem sollte überprüft werden, ob die Wirbelschichttrocknung eine geeignete Alternative zur Lyophilisation hinsichtlich der Stabilisierung probiotischer Bakterien darstellt.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Liste der verwendeten Geräte**

Autoklav: Varioklav Typ 400 H+P, Labortechnik GmbH (Deutschland)

Brutschrank: Model 500, Memmert GmbH + Co KG (Deutschland)

Durchflusszytometer EPICS® XL-MCL™, Beckman Coulter (USA)

Laminar-Air-Flow-Bank: Variolab Mobilien W90 Typ SWB, DIN 12950 Waldner Electronics (Deutschland)

Microplate Reader: Infinite®200, Tecan Österreich GmbH (Österreich)

pH-Meter: HANNA instruments pH 211 Microprocessor pH Meter

Schüttelinkubator: Innova 4000, New Brunswick Scientific Co. Inc. (USA)

Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Deutschland)

Vortex: Heidolph REAX 2000 (Deutschland)

Zentrifuge: High Speed Zentrifuge Typ RC5C, Sorvall® Instruments (Schweiz)

### 2.1.2 Liste der verwendeten Materialien

*Enterococcus faecium* M74, Chr. Hansen (Schweden)

*Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, Bio Gaia Biologicals (Schweden)

AnaeroGen (Oxoid, Österreich)

Dextrin (Merck, Deutschland)

Dihydrorhodamin 123 (Sigma-Aldrich, Österreich)

Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), (Merck, Deutschland)

Fluoresceindiacetat (Sigma-Aldrich, Österreich)

Glucose (Sigma-Aldrich, Österreich)

InstaGene<sup>TM</sup> Matrix (BIO RAD, Österreich)

Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (Merck, Deutschland)

Magermilchpulver (Sigma-Aldrich, Österreich)

MCC-Pellets (Pharmatrans sanaq, Schweiz)

MRS-Agar ( Merck, Deutschland)

MRS-Broth (Merck, Deutschland)

Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), (Merck, Deutschland)

Petrischalen (Bibby Sterilin Ltd., UK)

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Österreich)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf AG, Deutschland)

Saccharose (Merck, Deutschland)

Steritop® (0.22 µm, Millipore, Durapore<sup>TM</sup>, USA)

Zitronensäure (Merck, Deutschland)

96 well Polystyrene Microplatten, transparent (Greiner Bio-One, Österreich)

### Nährmedium

#### MRS-Broth

Zusammensetzung in g/l:

Caseinpepton	10,0
Fleischextrakt	8,0
Hefeextrakt	4,0
D(+)-Glucose	20,0
Tween 80	1,0
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0
Diammoniumhydrogencitrat	2,0
Natriumacetat	5,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangansulfat	0,04

52,2 g des trockenen Mediums wurden in 1 Liter destillierten Wassers gelöst. Das Nährmedium wurde für die spätere Verwendung abgefüllt; jeweils 10 ml in verschließbare Epprouvetten sowie in 1 l, 2 l Erlenmeyerkolben. Die Gefäße wurden 15 min bei 121 °C autoklaviert und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

## Agar

### Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (KAA-Agar)

Zusammensetzung in g/l:

Caseinpepton	20,0
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
Natriumcitrat	1,0
Natriumazid	0,15
Äsculin	1,0
Ammoniumeisen(III)-citrat	0,5
Kanamycinsulfat	0,02
Agar	15,0

47,5 g der Substanz wurden in 1 Liter destillierten Wasser gelöst und 15 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurden je 10 ml des noch heißen Mediums in einer Laminar Air-Flow-Bank in Petrischalen gefüllt. Nach dem Abkühlen wurden die gegossenen Agarplatten bis zum Gebrauch im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

## MRS Agar

Zusammensetzung in g/l:

Caseinpepton	10,0
Fleischextrakt	10,0
Hefeextrakt	4,0
D(+)-Glucose	20,0
Tween 80	1,0
Dikaliumhydrogenphosphat	2,0
Diammoniumhydrogencitrat	2,0
Natriumacetat	5,0
Magnesiumsulfat	0,2
Mangansulfat	0,04
Agar	14,0

68,2 g des Mediums wurden in 1 Liter destillierten Wasser gelöst und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurden je 10 ml in Petrischalen gefüllt unter Verwendung einer Laminar Air-Flow-Bank. Die gegossenen Agarplatten wurden bis zum Gebrauch im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

## Phosphatpuffer mit Zitronensäure pH 6,8

Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) 3,65 g/l

Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) 13,7 g/l

Die Substanzen wurden unter Rühren in destilliertem Wasser gelöst. Mit einer Lösung von 10 g Zitronensäure in 250 ml Wasser wurde der pH auf 6,8 eingestellt. Anschliessend wurde 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Für die Keimzahl-



bestimmungen wurden vor dem Autoklavieren jeweils 9 ml des Puffers in Eprouvetten gefüllt. Der Puffer wurde bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Für die Messungen mittels Flow-Cytometer wurde ausschließlich partikelfreier Phosphatpuffer verwendet. Dafür wurde der Phosphatpuffer durch einen Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm unter Verwendung einer Laminar Air-Flow-Bank filtriert.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung von *Enterococcus faecium***

Die Stammkultur wurde bei - 80 °C tiefgekühlt und in 1 ml Reaktionsgefäßen gelagert. Diese Kultur enthielt Glycerol. Dieses wurde in die bakterielle Zellwand eingelagert und wirkt cytoprotektiv. Da es nachfolgende Untersuchungen stören würde, musste das Glycerol entfernt werden. Dazu wurde die tiefgefrorene Kultur (1 ml) in 10 ml des Nährmediums MRS-Broth suspendiert, 24 h bei 37 °C inkubiert, anschließend davon 1 ml in 10 ml Nährmedium umgesetzt und erneut inkubiert; von dieser Suspension wurden 100 µl in 10 ml Nährmedium überführt und inkubiert. Die 3. Generation diente als Ausgangsstamm für die weiteren Untersuchungen. Das Umsetzen erfolgte unter Verwendung einer Laminar Air-Flow-Bank zur Verhinderung von Kontaminationen.

Bei der nachfolgenden Kultivierung wurden nach 24 Stunden Wachstum 100 µl der Bakteriensuspension in 10 ml MRS-Broth überführt und bei 37 °C inkubiert.

Zur Erzielung einer hohen Bakterienmasse für die Fluid-Bed-Trocknung erfolgte die Kultivierung in 1 l und 2 l Kolben.

### **2.2.2 Kultivierung von *Lactobacillus reuteri***

Wie bei *E. faecium* wurde auch hier die 3. Generation des vormals tiefgekühlten Stammes als Ausgangsstamm verwendet. Zur Kultivierung wurden 100 µl in 10 ml MRS-Broth überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Dazu wurden die Epruvetten mit der Bakteriensuspension in anaerobe Töpfe unter Zusatz von AnaeroGen gegeben und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Für eine hohe Ausbeute erfolgte die Kultivierung ebenfalls in größeren Ansätzen (1 l und 2 l Kolben).

### **2.2.3 Ernten und Waschen der Bakterien (*E. faecium* und *L. reuteri*)**

Nach 24 h Wachstum wurde die Bakteriensuspension bei 8000 U/min für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Phosphatpuffer pH 6,8 gewaschen und in 10 ml desselben Puffers resuspendiert.

### **2.2.4 Keimzahlbestimmung**

Die Bestimmung der Keimzahl erfolgte durch Zählen der Koloniebildenden Einheiten auf Agarplatten. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. 1 ml der Bakteriensuspension wurde in 9 ml Phosphatpuffer gegeben. Nach dem Vortexen wurde davon 1 ml in 9 ml Phosphatpuffer überführt usw. Auf diese Weise wurden mehrere Verdünnungsstufen hergestellt. Anschließend wurden 100 µl der entsprechenden Stufe auf eine Agarplatte gegeben und vorsichtig mit einem Drigalskispatel verteilt. So wurden von drei Verdünnungen je zwei Agarplatten angefertigt. Es wurde an einer Laminar Air-Flow-Bank gearbeitet. Die Inkubation erfolgte bei *E. faecium* 72 h bei 37 °C auf Kanamycin-Äskulin-Azid-Agar, bei *L. reuteri* unter anaeroben Bedingungen 72 h lang bei 37°C auf MRS-Agar. Nach der Inkubationszeit wurden die sichtbaren Kolonien gezählt.

### **2.2.5 Durchflusszytometrie [39]**

Bei der Durchflusszytometrie wird eine Probe mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes transportiert. Dabei passiert jede enthaltene Zelle (0,2 bis 150 µm Größe) einzeln einen Laserstrahl. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal oder Streulicht wird mittels Detektor ausgewertet. So erhält man Informationen über die physikalische und chemische Struktur jedes Partikels. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einer hohen Anzahl von Zellen innerhalb kürzester Zeit.

In der vorliegenden Studie wurde die Durchflusszytometrie ausschließlich zur Bestimmung der Zellzahl eingesetzt. Dabei wurden auch tote oder geschädigte Zellen mitgezählt. Die genaue Bestimmung der Keimzahl erfolgte durch Plattenausählung. An jedem Tag wurde bei der wie oben beschrieben erhaltenen Bakteriensuspension eine Zellzahl von ca.  $10^8$  Bakterien eingestellt. Da die Färbungen konzentrationsabhängig sind, sollte gewährleistet werden, dass die Proben eine ausreichend hohe Bakterienkonzentration aufweisen und dass die Zellzahlen der Proben annähernd gleich sind, um die Effekte des nachfolgenden Hitzestresses zu zeigen und um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Für die Messungen wurden 50 µl der zu bestimmenden Probe in ein Röhrchen mit 1 ml partikelfreiem Phosphatpuffer gegeben, mittels Vortex durchmischt und sofort vermessen. Am Cytometer wurde die Anzahl der Partikel pro 30 Sekunden Meßzeit angegeben. Anhand dieses Wertes wurde die Suspension auf eine Partikelzahl von ca. 9.500 pro 30 s eingestellt.

### **2.2.6 Bestimmung des DNA-Gehaltes**

Die Isolierung der DNA erfolgte mittels InstaGene Matrix. Diese enthält ein ionisches Harz, welches mehrwertige Kationen bindet. Der Kochvorgang führt zur Zelllyse und Freisetzung der DNA. Die Matrix adsorbiert Lyseprodukte und inaktiviert durch Komplexbildung Enzyme, wie z. B. DNase und verhindert so den Abbau der DNA. [40, 41]

1 ml der eingestellten Bakteriensuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und eine Minute bei 12.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, 1 ml autoklaviertes Wasser hinzugegeben, mittels Vortex durchmischt

und erneut zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden zum verbliebenen Pellet 200 µl InstaGene zugegeben und durchmischt. Danach wurde 30 min bei 56 °C inkubiert. Nach dem Vortexen wurde 8 min bei 100 °C inkubiert. Nach erneuter Durchmischung mittels Vortex wurde 3 min bei 12.000 U/min zentrifugiert.

Anschließend erfolgte die spektralphotometrische Vermessung. 10 µl des Überstandes wurden in eine Küvette mit 1 ml autoklaviertem Wasser gegeben und bei 260 nm gegen Wasser als Referenz vermessen. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes (µg DNA/ml) erfolgte nach der Formel: gemessene Absorption x 50 x 100

### **2.2.7 Stressen**

Es wurde der Einfluss von Hitzestress untersucht. 500 µl der zu untersuchenden Bakteriensuspension wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und mithilfe eines Thermomixers bei bestimmten Temperaturen und Zeiten gestresst. Die jeweiligen Bedingungen werden im entsprechenden Versuchsteil näher beschrieben.

### **2.2.8 Bestimmung der zellulären Aktivität**

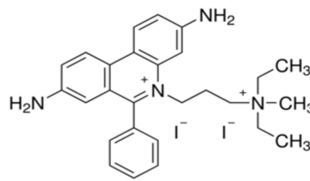
Der Einfluss von Hitzestress auf zelluläre Veränderungen wurde mittels Fluorimetrie überprüft. Dafür wurde die Bakteriensuspension mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und die Fluoreszenz gemessen.

#### **Fluorimetrie [42]**

Bei der Fluorimetrie werden die Moleküle zunächst mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt. Die Elektronen werden durch Aufnahme von Photonen angeregt und erreichen ein höheres, aber instabiles Energieniveau. Unter Emission von Strahlung, der Fluoreszenz, kehren die angeregten Elektronen wieder in den Grundzustand zurück.

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Propidiumiodid, Dihydrorhodamin 123 und Fluoresceindiacetat verwendet.

### Propidiumiodid (PI) [43]



**Abb. 5: Propidiumiodid**

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4170>

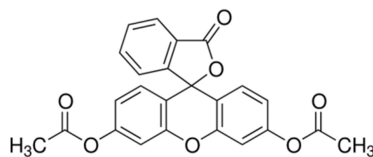
PI (MW 668,4 g/mol) bindet an die DNA der Bakterien durch Interkalation zwischen die Basen ohne Präferenz, es bindet ebenso an RNA.

Nach Bindung an Nukleinsäuren verstärkt sich die Fluoreszenz um das 20-30 fache, das Absorptionsmaximum verschiebt sich und liegt nach Bindung bei 535 nm, das Emissionsmaximum bei 617 nm.

Der Farbstoff ist nicht membrangängig und wird von lebenden Zellen mit intakter Membran ausgeschlossen. Er wird zur Färbung und Messung toter oder geschädigter Zellen verwendet.

Die Stammlösung (1,5 mM) wurde durch Lösen von 1 mg/ml PI mit entionisiertem Wasser hergestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C unter Ausschluss von Licht aufbewahrt. Die Arbeitslösung wurde kurz vor Gebrauch durch Lösen von 2,4 µl Stammlösung pro ml Phosphatpuffer frisch hergestellt.

### Fluoresceindiacetat (FDA) [44]



**Abb. 6: Fluoresceindiacetat**

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f7378>

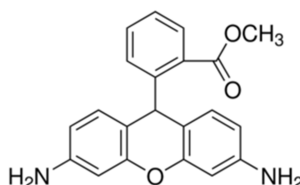
FDA (MW 416,38 g/mol) ist ein selbst nicht fluoreszierender Farbstoff, der durch intrazelluläre Esterasen nach Abspaltung der Acetatreste zum grün fluoreszierenden Fluorescein hydrolysiert wird. Dieses wird in Zellen mit intakter Membran

akkumuliert. Der Farbstoff dient zum Nachweis lebender und enzymatisch aktiver Zellen.

Das Absorptionsmaximum beträgt 494 nm und das Emissionsmaximum 521 nm.

Die Stammlösung enthielt 5 mg FDA pro ml DMSO und wurde bei – 20 °C unter Ausschluss von Licht aufbewahrt. Die Arbeitslösung wurde vor Gebrauch durch Lösen von 8 µl Stammlösung pro ml Phosphatpuffer frisch zubereitet.

#### Dihydrorhodamin 123 (DHR) [45]



**Abb. 7: Dihydrorhodamin**

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d1054>

DHR (MW 346,38 g/mol) ist ein selbst nicht fluoreszierender Farbstoff, der durch passive Diffusion durch Membranen gelangt. Innerhalb der Zelle wird DHR durch oxidative Spezies oder Redoxsysteme zum fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert und in den Mitochondrien angehäuft. Es dient der Detektion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies, wie Peroxide und Peroxynitrite.

Das Absorptionsmaximum liegt bei 500 nm und das Emissionsmaximum bei 536 nm.

Zur Herstellung einer 5 mM Stammlösung wurden 2 mg DHR in 1,155 ml DMSO gelöst. Die Lösung wurde bei – 20 °C unter Lichtausschluss gelagert. Die Arbeitslösung wurde unmittelbar vor Gebrauch durch Lösen von 10 µl Stammlösung pro ml Phosphatpuffer frisch hergestellt.

Für die Messungen wurden je 500 µl der zu untersuchenden Bakteriensuspension und 500 µl der frisch bereiteten Farbstofflösungen in ein Reaktionsgefäß gegeben und durchmischt. Danach wurden die Proben mit PI 15 min, die Proben mit FDA und

DHR jeweils eine Stunde lang mittels Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert, zum Lichtausschluss wurden die Proben mit Aluminiumfolie abgedeckt. Für zuverlässigere Ergebnisse wurden für jeden Farbstoff jeweils 2 Proben gefärbt. Die fluorimetrischen Messungen erfolgten mit 96-well-Mikrotiterplatten. Dafür wurden je 50 µl der inkubierten Proben nach dem Vortexen in dreifacher Ausführung einpipettiert sowie Phosphatpuffer und die entsprechende Farbstofflösung als Kontrolle. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmessung am Microplate Reader bei den jeweiligen Wellenlängen.

### **2.2.9 Fluid-Bed-Trocknung**

Die verwendeten probiotischen Bakterien wurden mittels Fluid-Bed-Trocknung stabilisiert. Um eine hohe Bakterienmasse zu erreichen, erfolgte die Kultivierung der Bakterien in größeren Ansätzen, d.h. in 1 l und 2 l Kolben. Ernte und Waschen erfolgte wie bei 2.2 beschrieben, weiterhin wurde die feuchte Masse der Bakterien bestimmt. Die jeweiligen Bakteriensuspensionen wurden am Durchflusszytometer vermessen und die Konzentration entsprechend eingestellt.

Jeweils 100 ml dieser Bakteriensuspension wurden auf 500 g Pellets gesprüht. Bei der Untersuchung von Protektanten wurden diese, mengenmäßig bezogen auf die feuchte Bakterienmasse, der Suspension zugefügt.

Als Prozessparameter wurden eingestellt:

- Produkttemperatur: 37 - 38 °C
- Druck: 1,5 bar
- Sprührate: 7 g pro min

Die überzogenen und getrockneten Pellets wurden luftdicht verschweißt und gelagert. Die Lagerung erfolgte bei *E. faecium* bei 4 °C, bei *L. reuteri* zusätzlich bei Raumtemperatur.

### **2.2.10 Analyse der getrockneten Bakterien**

20 g Pellets wurden mit 50 ml Phosphatpuffer versetzt und mehrmals geschüttelt. Nach ca. 15 min wurde der Überstand zentrifugiert und in 9 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Diese Suspension diente als Untersuchungsprobe zur Bestimmung der Keimzahl, des DNA-Gehaltes und der zellulären Aktivität mittels Fluorimetrie.

### **2.2.11 Datenanalyse**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Graph Pad Prism 3 und Microsoft Excel.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von one-way ANOVA mit dem post-hoc Tukey Test, bei dem alle Gruppen miteinander verglichen werden.

Werte mit  $p < 0,05$  gelten als signifikant.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 *Enterococcus faecium*

#### 3.1.1 Versuchsreihe

In einer Versuchsreihe wurde überprüft, ob es durch wiederholten Hitzestress zur Ausbildung von Resistenzen kommt. Als Stress wurde 1 min bei 80 °C gewählt. Die nachfolgende Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Versuchsreihe.

Der Versuch wurde über 8 Tage durchgeführt. Kultivierung, Ernte und Waschen der Bakterien erfolgte wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Bakteriensuspension wurde anschließend am Cytometer vermessen und eingestellt auf ca.  $10^8$  Partikel. Am ersten Tag wurde ein Teil der eingestellten Bakteriensuspension durch Hitze gestresst, der andere Teil nicht. Von den so erhaltenen 2 Bakteriensuspensionen wurde jeweils die zelluläre Aktivität bestimmt durch Färben mit PI, FDA und DHR und anschließender fluorimetrischer Messung (siehe Kapitel 2.2), weiters wurde jeweils die Keimzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.2). Beide Proben wurden weitergezüchtet, so dass am nächsten Tag (nach Ernte und Waschen) eine ungestresste Bakteriensuspension und eine gestresste Bakteriensuspension vorlagen. Beide Suspensionen wurden am Cytometer vermessen und eingestellt. Von diesen beiden Suspensionen wurde jeweils ein Teil gestresst, der andere blieb ungestresst. Von den so erhaltenen 4 Proben erfolgten die Bestimmungen der zellulären Aktivität und der Keimzahlen. Weitergezüchtet wurden die ungestresste Probe sowie die gestresste Probe, die erneut durch Hitze gestresst wurde. Außer an den Tagen 6 und 7, an denen die Bakterien nur weitergezüchtet wurden, wurde an allen Tagen so vorgegangen. Es wurden die Tag zu Tag Unterschiede untersucht, v.a. im Hinblick auf mögliche Resistenzbildung.

Diese Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt. Die Bestimmungen der Keimzahlen und der Membranintegrität ergaben etwa gleiche Resultate, die Ergebnisse für die Esteraseaktivität und Wasserstoffperoxidbildung variierten.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden jeweils die relativen Intensitäten berechnet. Dafür wurde die gemessene Intensität der ungestressten Probe = 1 gesetzt und alle Intensitäten darauf bezogen.

Tag 1:

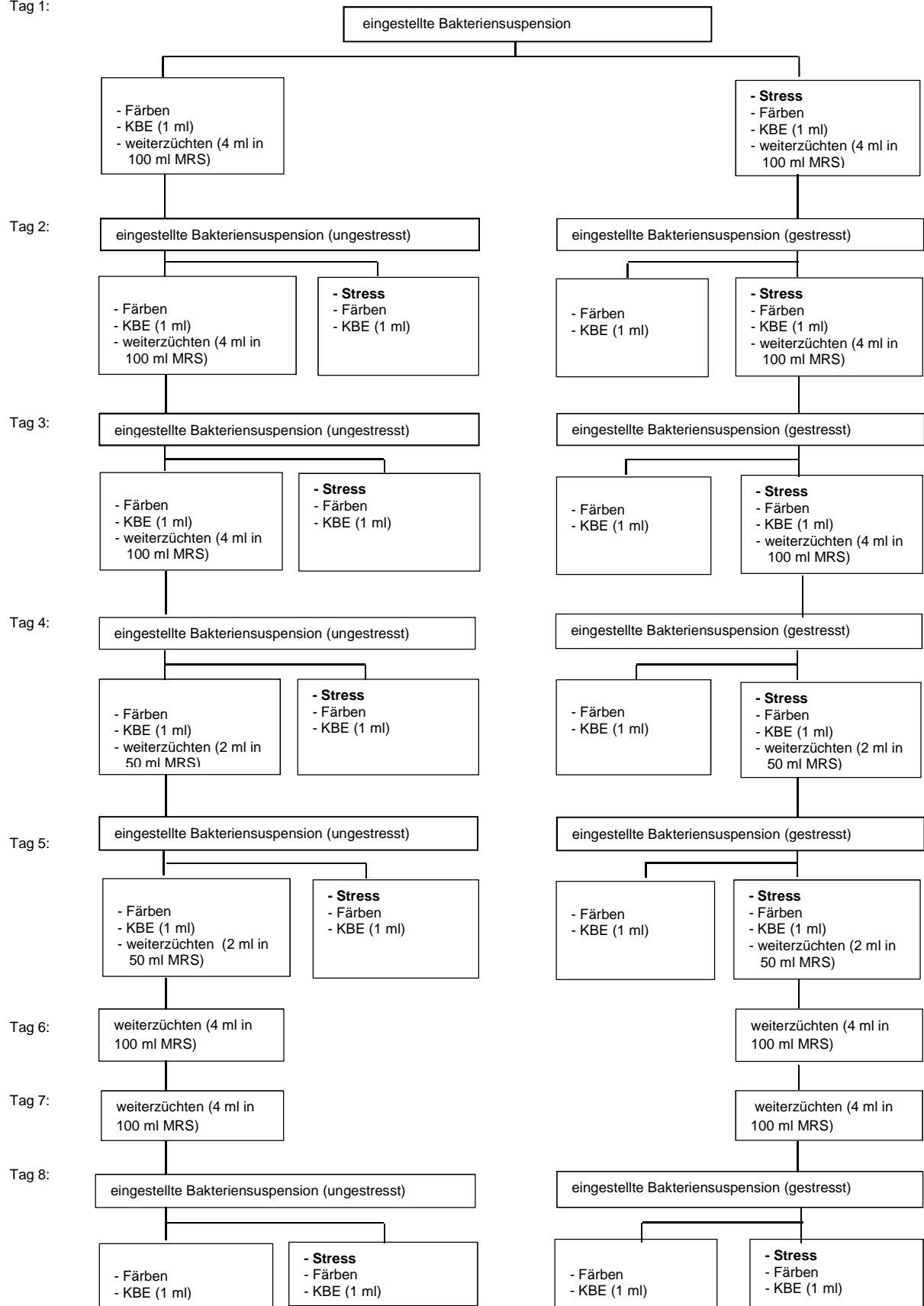
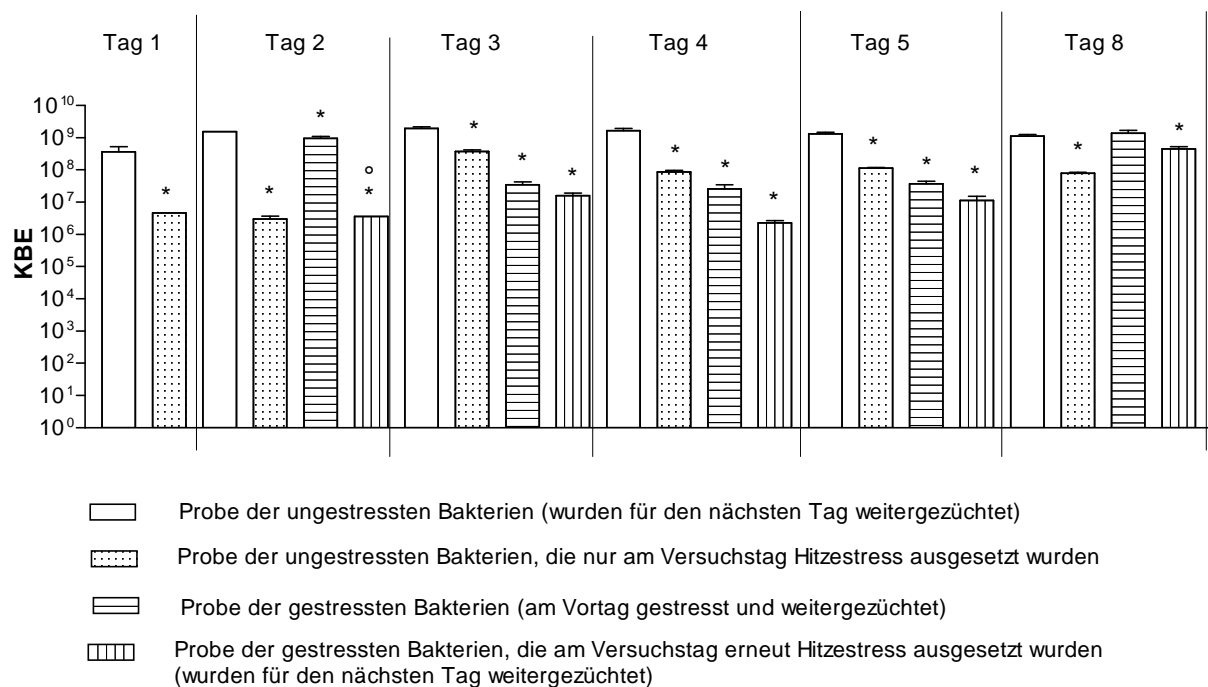


Abb. 8: Übersicht Versuchsreihe *Enterococcus faecium*, Streß: 80 °C, 1 min

## Keimzahlbestimmung



**Abb. 9: KBE der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen und bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den ungestressten Bakterien

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den gestressten Bakterien

Abbildung 9 zeigt die Keimzahlen der ungestressten, gestressten und jeweils neu gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen. An den Tagen 6 und 7 wurden die Bakterien nur weitergezüchtet.

Es ist ersichtlich, dass durch erneuten Stress die Keimzahl sinkt, sowohl bei den vorher ungestressten als auch den gestressten Bakterien.

An Tag 2 sind die Keimzahlen der neu gestressten Proben etwa gleich.

An Tag 3 ist zwar die Ausgangskeimzahl der gestressten Bakterien geringer als bei den ungestressten, allerdings sinkt die Keimzahl nach erneutem Hitzestress weniger.

Auch an den nächsten Versuchstagen ist die Keimzahl nach Hitzestress der ungestressten Bakterien signifikant geringer, während es bei den gestressten Bakterien zu einer geringeren Abnahme nach dem Hitzestress kommt.

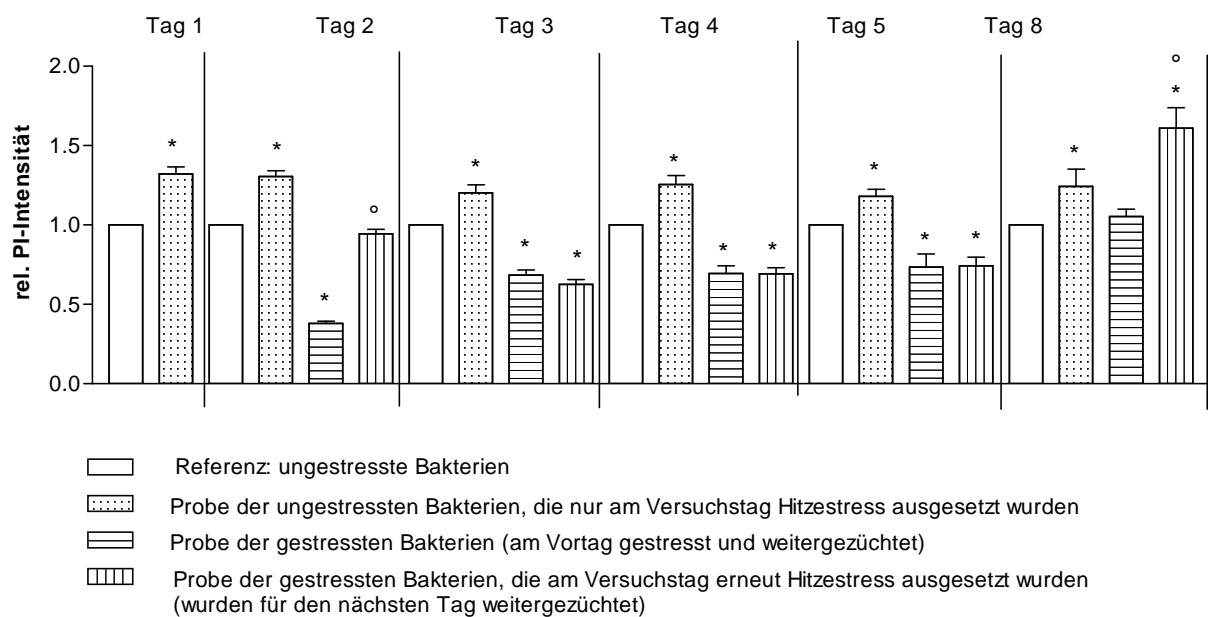
Tag 8 zeigt die Keimzahlen der ungestressten, gestressten und jeweils neu gestressten Bakterien, nachdem die Tage zuvor nur weitergezüchtet wurde. Auch hier führt Hitzestress der ungestressten Bakterien zu einer stärkeren Abnahme der Keimzahl im Vergleich zu den gestressten Bakterien.

## Zelluläre Aktivität

### Membranpermeabilität

Die Messung erfolgte nach Färbung mit Propidiumiodid (PI).

Da PI nur die geschädigte Zellmembran durchdringen kann, korreliert die Höhe der Intensität mit dem Maß der Membranschädigung.



**Abb. 10: Rel. PI-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C**  
\* signifikant (  $p < 0,05$ ) gegenüber der Referenz  
° Signifikanz (  $p < 0,05$ ) der gestressten Bakterien

Abbildung 10 zeigt die relative Intensität nach Färbung mit Propidiumiodid (PI). Als Referenz dienten die ungestressten Bakterien.

Wurden diese ungestressten Bakterien am Versuchstag Hitzestress ausgesetzt, so zeigt sich eine signifikant höhere rel. PI-Intensität. Dabei ist der Anstieg der Intensität an jedem Tag der Versuchsreihe etwa gleich hoch.

An Tag 2 zeigten die gestressten Bakterien eine signifikant geringere rel. PI-Intensität. Wurden diese gestressten Bakterien erneut gestresst, steigt die PI-Intensität.

An den Tagen 3, 4 und 5 sind die Intensitäten der gestressten und erneut gestressten Proben annähernd gleich und signifikant geringer als die Referenz.

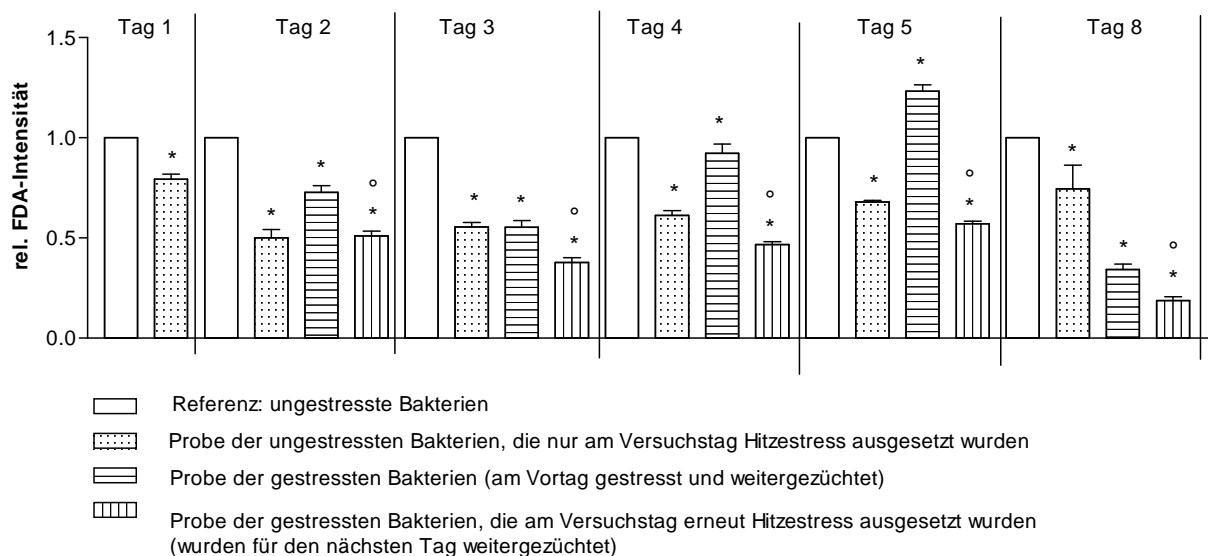
An Tag 8 ist die rel. Intensität der gestressten Probe so hoch wie die Referenz. Durch erneuten Hitzestress steigt die rel. PI-Intensität stark an.

## Esteraseaktivität

Die Messung erfolgte nach Färbung mit Fluoresceindiacetat (FDA).

FDA wird intrazellulär von Esterasen nach Abspaltung der Acetatreste zum fluoreszierenden Fluorescein hydrolysiert. Nur Zellen mit intaktem Metabolismus und Esteraseaktivität zeigen Fluoreszenz.

Je höher die Intensität von FDA, desto höher ist die Enzymaktivität und desto geringer demzufolge das Maß der Zellschädigung.



**Abb. 11: Rel. FDA-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Referenz  
° Signifikanz ( $p < 0,05$ ) der gestressten Bakterien

Abbildung 11 zeigt die relative Intensität nach Färbung mit Fluoresceindiacetat (FDA). Als Referenz dienten die ungestressten Bakterien.

Wurden diese ungestressten Bakterien gestresst, sinkt die rel. FDA-Intensität signifikant. Das zeigt sich an jedem Tag der Versuchsreihe.

An den Tagen 2, 3 und 4 sind die rel. Intensitäten der gestressten Proben geringer als die der Referenz. Nach erneutem Stress sinken die Intensitäten signifikant.

An Tag 5 ist die rel. Intensität der gestressten Probe deutlich höher als die der Referenz. Nach erneutem Stress ist die Intensität signifikant geringer.

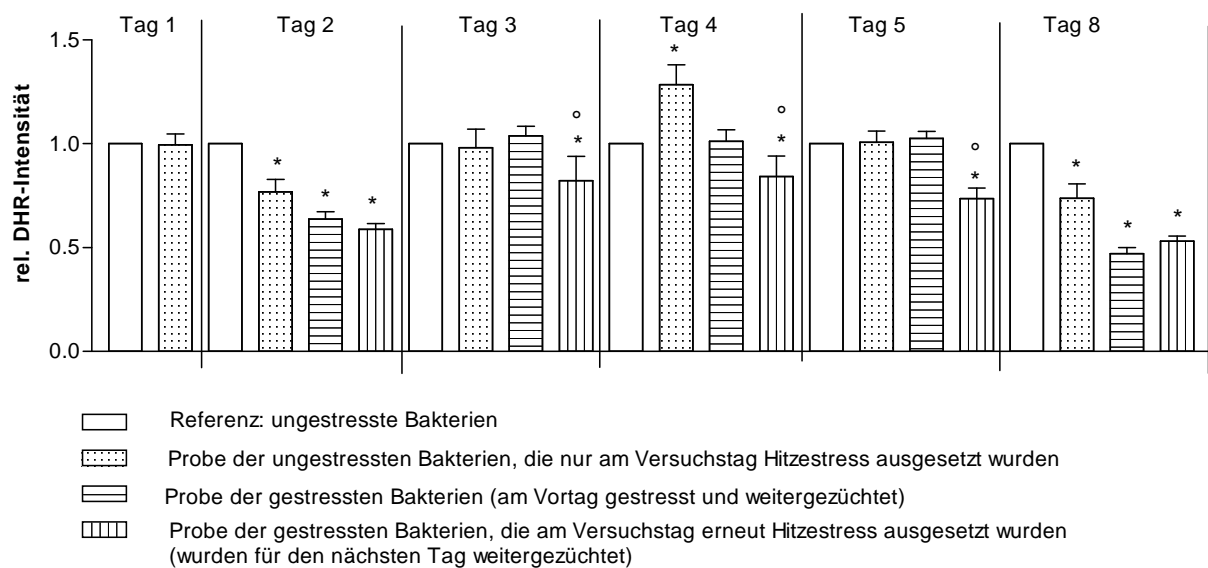
An Tag 8 sind die rel. Intensitäten aller Proben geringer als die der Referenz.

Auch bei den gestressten Bakterien zeigt sich, dass durch erneuten Stress die rel. FDA-Intensität signifikant sinkt.

## Wasserstoffperoxidbildung

Die Messung erfolgte nach Färbung mit Dihydrorhodamin 123 (DHR).

DHR wird innerhalb der Zelle durch oxidative Spezies oder Redoxsysteme zum fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert. Es dient dem Nachweis intrazellulärer reaktiver Spezies, wie Peroxide und Peroxynitrite, die als Reaktion auf Stress gebildet werden. Eine hohe DHR-Intensität deutet auf eine erhöhte Aktivität der Redoxsysteme hin.



**Abb. 12: Rel. DHR-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Referenz  
° Signifikanz ( $p < 0,05$ ) der gestressten Bakterien

Abbildung 12 zeigt die relative Intensität nach Färbung mit Dihydrorhodamin 123 (DHR). Als Referenz dienten die ungestressten Bakterien.

An Tag 2 liegen die rel. DHR- Intensitäten aller Proben unter der der Referenz.

An Tag 3 ist die rel. Intensität der Probe der gestressten Bakterien, die erneut gestresst wurde, signifikant geringer als die Referenz, die Intensitäten aller anderen Proben sind etwa so hoch wie die Referenz.

An Tag 4 ist die DHR-Intensität der ungestressten Probe, die Hitzestress ausgesetzt wurde signifikant höher. Die Intensität der gestressten Probe entspricht etwa der Referenz und sinkt signifikant nach erneutem Stress.

An Tag 5 ist nur die rel. Intensität der Probe der gestressten Bakterien, die erneut gestresst wurde, signifikant geringer als die Referenz.

An Tag 8 ist die Intensität der ungestressten Probe, die Hitzestress ausgesetzt wurde, signifikant geringer als die der Referenz. Die Intensitäten der gestressten und neu gestressten Proben sind etwa gleich hoch und ebenfalls signifikant geringer als die Intensität der Referenz.

### **3.1.2 Fluid-Bed-Trocknung**

Die Bakterien wurden mittels Fluid-Bed-Trocknung, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, stabilisiert. Als Untersuchungsproben wurden ungestresste sowie gestresste Bakterien, die 3mal für 1 min bei 80 °C gestresst wurden, verwendet. Es sollte gezeigt werden, ob es Unterschiede zwischen den ungestressten und gestressten Bakterien gibt und weiterhin, ob die gestressten Bakterien für die Fluid-Bed-Trocknung besser geeignet sind.

Als Protektanten wurden Magermilchpulver in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse und Zitronensäure in Konzentrationen von 50 % und 100 % gewählt.

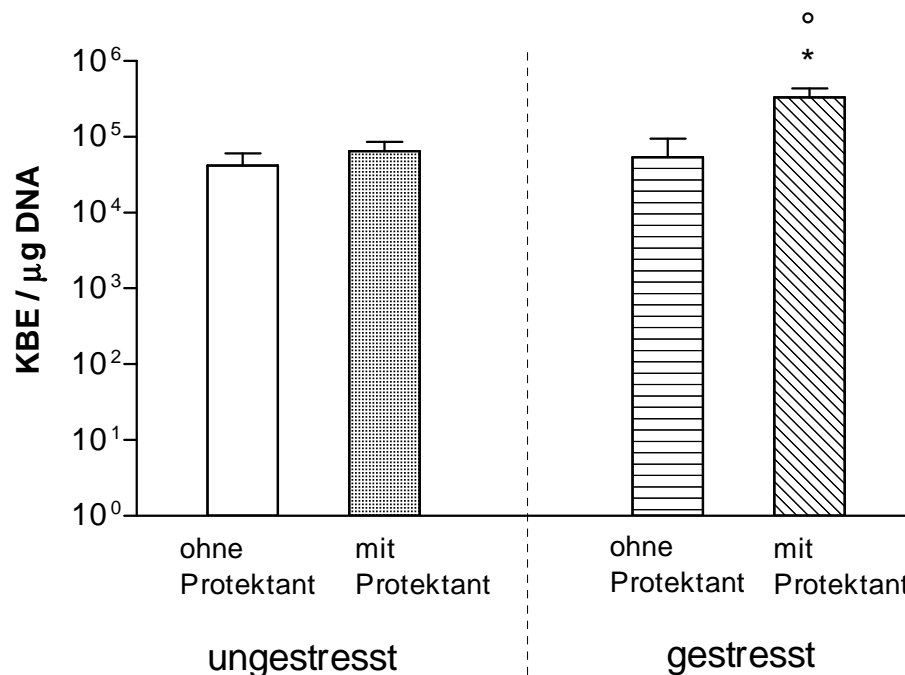
Nach der Trocknung erfolgte die Untersuchung der Pellets (siehe Kapitel 2.2).

Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wurde von jeder der DNA-Gehalt bestimmt und die Ergebnisse pro  $\mu\text{g}$  DNA berechnet. Es wurden die relativen Intensitäten angegeben. Dafür wurde jeweils die Intensität/ $\mu\text{g}$  DNA der ungestressten Probe ohne Protektant = 1 gesetzt und alle anderen Intensitäten in Relation gesetzt.

Auch hier erfolgte die Prüfung mittels Bestimmungen der Keimzahlen und der zellulären Aktivität.

Zitronensäure erwies sich als ungeeignet und wird deshalb nicht dargestellt.

## Keimzahlbestimmung



**Abb. 13: KBE pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

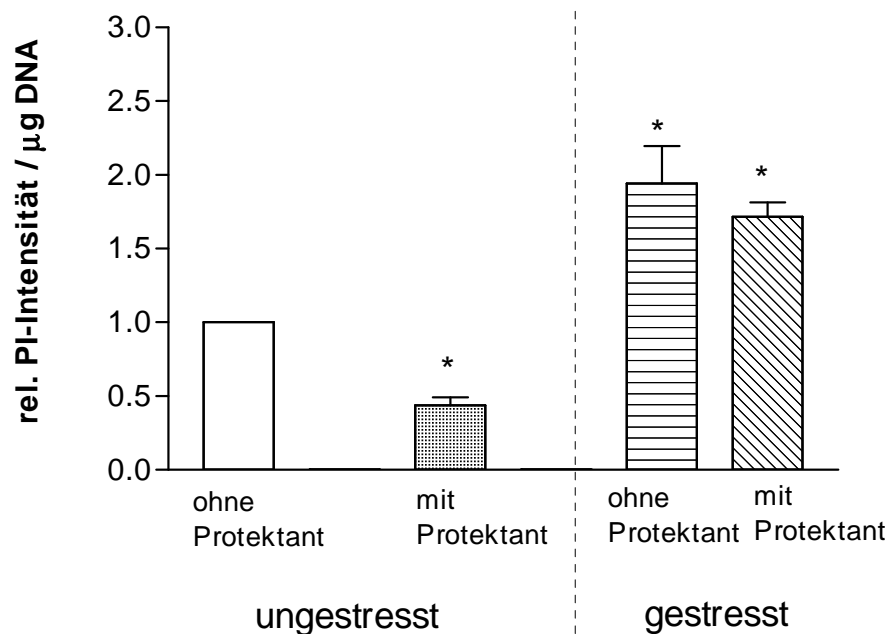
Abbildung 13 zeigt KBE pro µg DNA nach der Fluid-Bed-Trocknung der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant.

Bei den ungestressten Proben gibt es keinen signifikanten Unterschied der Keimzahlen. Bei der gestressten Probe ohne Protektant entspricht die Keimzahl etwa der der ungestressten. Bei der gestressten Probe mit Magermilchpulver zeigt sich eine signifikant erhöhte Keimzahl, sowohl gegenüber der gestressten Probe ohne Protektant als auch gegenüber den ungestressten Proben ( $p < 0,001$ ).



## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität



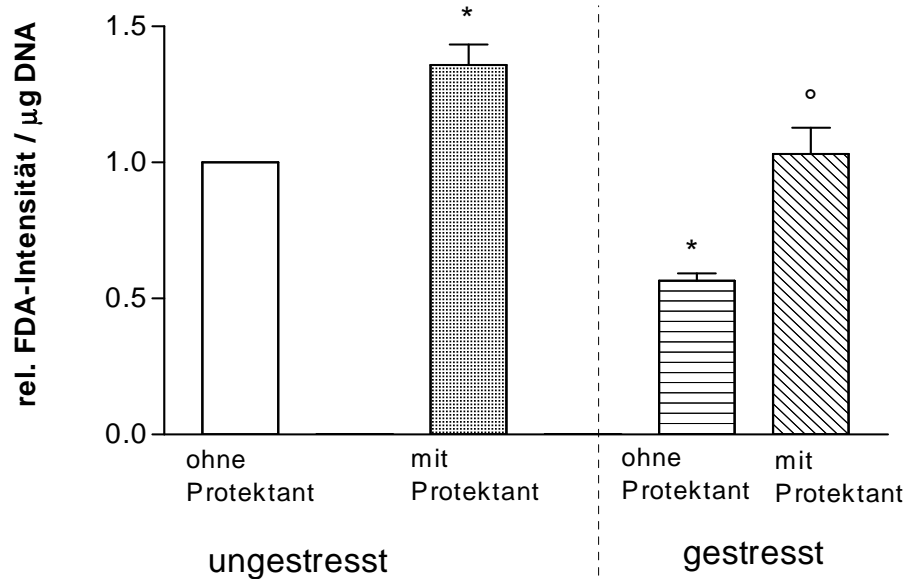
**Abb. 14: Rel. Intensität von PI pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

Abbildung 14 zeigt die relative Intensität von PI pro µg DNA der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant.

Bei der ungestressten Probe mit Protektant ist die PI-Intensität signifikant geringer als bei jener ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

Bei den gestressten Proben sind die rel. PI-Intensitäten signifikant höher ( $p < 0,001$ ). Auch bei den gestressten Proben hat Magermilchpulver einen protektiven Effekt, allerdings nicht signifikant.

## Esteraseaktivität



**Abb. 15: Rel. Intensität von FDA pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant**

**\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant**

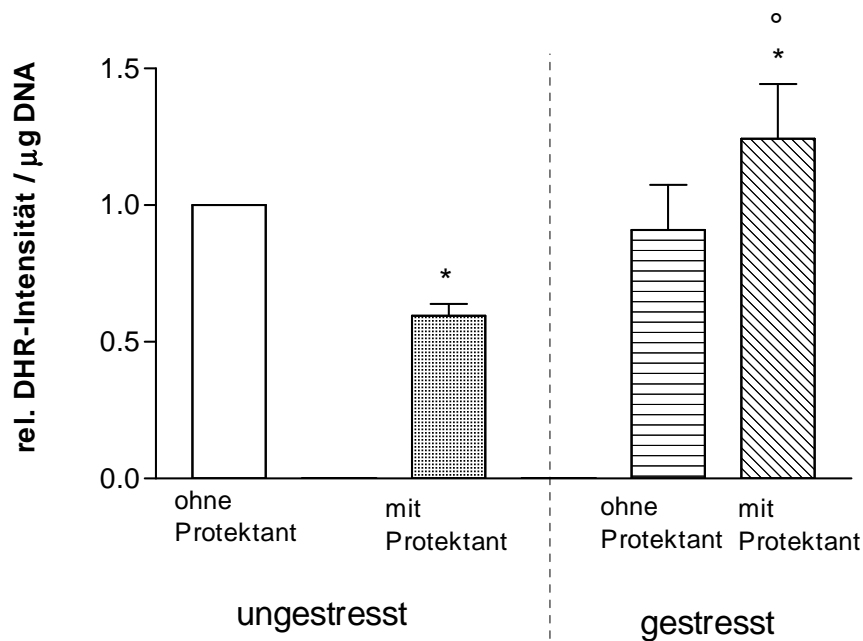
**° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken**

Abbildung 15 zeigt die relative Intensität von FDA pro µg DNA der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant.

Bei der gestressten Probe ohne Protektant ist die Enzymaktivität signifikant geringer im Vergleich zur ungestressten Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

Bei den Proben mit Magermilchpulver zeigt sich jeweils ein signifikanter Anstieg der rel. FDA-Intensität ( $p < 0,001$ ).

## Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 16: Rel. Intensität von DHR pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 16 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant.

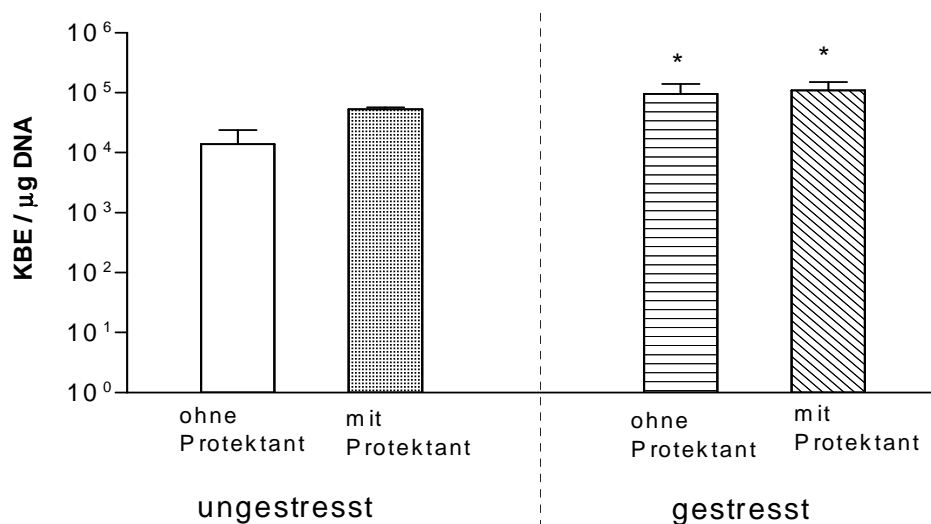
Die ungestresste Probe mit Protektant zeigt eine signifikant geringere rel. DHR-Intensität gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

Die gestresste Probe ohne Protektant zeigt keinen signifikanten Unterschied. Bei der gestressten Probe mit Magermilchpulver ist die rel. DHR-Intensität signifikant höher als alle anderen ( $p < 0,01$ ).

### 3.1.3 Stabilität nach Lagerung

Nach einer Lagerzeit von drei Monaten bei 4 °C wurden die Pellets aus Versuchsteil 3.1.2 erneut bezüglich ihrer Keimzahlen und zellulären Aktivität überprüft. Die Untersuchungen wurden einmal durchgeführt.

#### Keimzahlbestimmung



**Abb. 17: KBE pro  $\mu\text{g DNA}$  der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

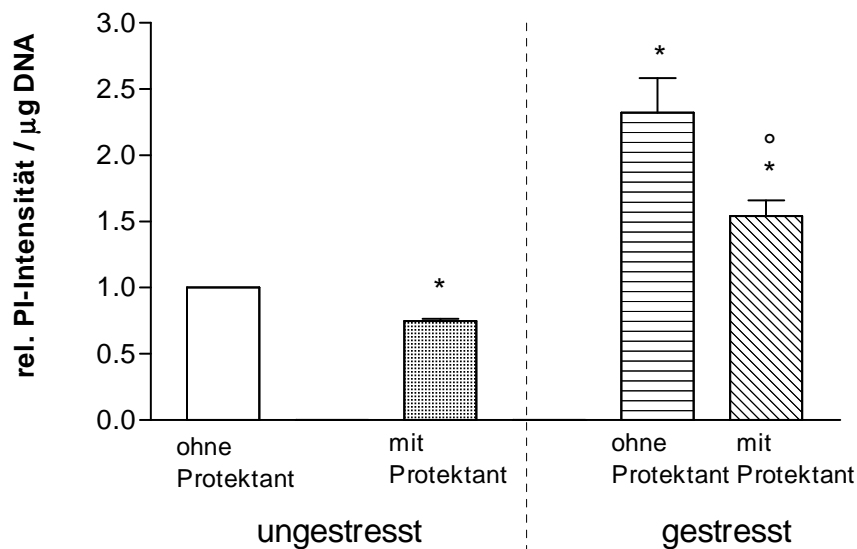
Abbildung 17 zeigt KBE pro  $\mu\text{g DNA}$  nach der Fluid-Bed-Trocknung der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant, nach einer Lagerzeit von ca. 3 Monaten bei 4 °C.

Die Keimzahlen der gestressten Proben sind signifikant höher als die der ungestressten ( $p < 0,001$ ).

Im Vergleich zu den frischen Pellets (Abb. 13, S. 32) zeigen die ungestressten Proben keinen Unterschied. Bei den gestressten Proben sind die Keimzahlen nach der Lagerung etwa gleich, während bei den frischen Proben die gestresste Probe mit Magermilchpulver eine signifikant höhere Keimzahl aufwies. Insgesamt sind die koloniebildenden Einheiten nach der Lagerung geringer als vorher.

## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität



**Abb. 18: Rel. Intensität von PI pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant  
° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

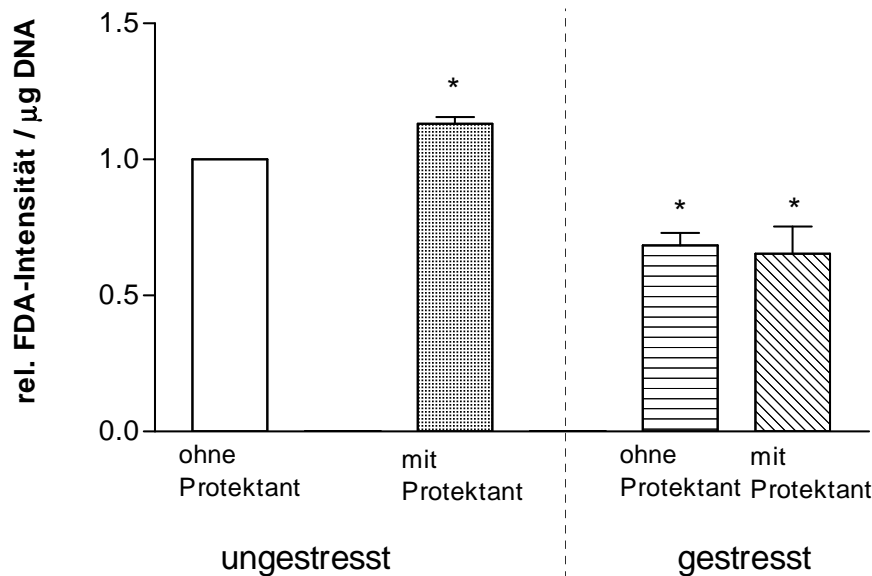
Abbildung 18 zeigt die relative Intensität von PI pro µg DNA der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant, nach einer Lagerung von ca. 3 Monaten bei 4 °C.

Bei der ungestressten Probe mit Magermilchpulver ist die rel. PI-Intensität signifikant geringer als bei der Probe ohne Protektant ( $p < 0,05$ ).

Die PI-Intensitäten der gestressten Proben sind signifikant höher als die der ungestressten Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Auch hier bewirkt Magermilchpulver eine signifikante Verringerung der PI-Intensität ( $p < 0,001$ ).

Die frischen Pellets (siehe Abb. 14, S. 33) zeigten die gleichen Ergebnisse. Die gestressten Proben zeigten höhere rel. PI-Intensitäten als die ungestressten, bei den Proben mit Magermilchpulver waren die Intensitäten jeweils geringer als die Intensitäten der Proben ohne Protektant. Insgesamt erhöhen sich die rel. PI-Intensitäten nach der Lagerung.

## Esteraseaktivität



**Abb. 19: Rel. Intensität von FDA pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant  
° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

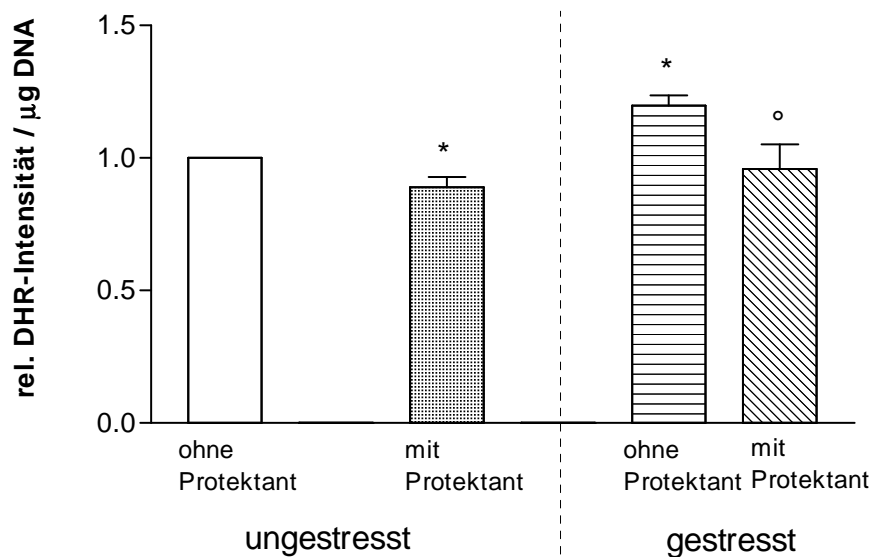
Abbildung 19 zeigt die relative Intensität von FDA pro µg DNA der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant, nach einer Lagerung von ca. 3 Monaten bei 4 °C.

Bei der ungestressten Probe mit Magermilchpulver steigt die rel. FDA-Intensität signifikant ( $p < 0,01$ ).

Bei den gestressten Proben sind die rel. FDA-Intensitäten etwa gleich hoch. Sie liegen signifikant unter der ungestressten Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

Im Vergleich zu den frischen Pellets (Abb. 15, S. 34) liegt nach der Lagerung bei der ungestressten Probe mit Protektant die rel. FDA-Intensität ebenfalls signifikant höher. Die Intensitäten der gestressten Proben sind nach der Lagerung annähernd gleich, während bei den frischen Pellets die Probe mit Magermilchpulver eine höhere Intensität aufwies. Insgesamt verringern sich die rel. FDA-Intensitäten während der Lagerung.

## Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 20: Rel. Intensität von DHR pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant  
° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 20 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA der ungestressten und gestressten Proben, jeweils ohne und mit Magermilchpulver als Protektant, nach einer Lagerung von ca. 3 Monaten bei 4 °C.

Bei der gestressten Probe ohne Protektant ist die rel. DHR-Intensität signifikant höher als die der ungestressten. Die Proben mit Magermilchpulver zeigen eine signifikante Verringerung der rel. DHR-Intensität jeweils im Vergleich zur Probe ohne Protektant. (Bei den ungestressten Proben  $p < 0,01$ ; bei den gestressten  $p < 0,001$ ).

Bei den frischen Pellets (Abb. 16, S. 35) war bei der ungestressten Probe mit Protektant die DHR-Intensität deutlich geringer als nach der Lagerung. Bei den frischen Pellets zeigte die gestresste Probe mit Magermilchpulver eine signifikant höhere DHR-Intensität, während nach der Lagerung die Intensität geringer ist als bei der gestressten Probe ohne Protektant. Insgesamt sind die rel. DHR-Intensitäten nach der Lagerung höher als vorher.

## **3.2 *Lactobacillus reuteri***

### **3.2.1 Einfluss von Hitzestress**

Der Einfluss von Hitzestress wurde untersucht, indem die Bakterien verschiedenen Temperaturen und Zeiten ausgesetzt wurden. Es wurde die Vermehrungsfähigkeit durch Bestimmung der Keimzahlen sowie die zelluläre Aktivität durch Messung der Fluoreszenzintensität nach Färben mit verschiedenen Farbstoffen überprüft.

Kultivierung, Ernten und Waschen von *L. reuteri* erfolgte wie unter 2.2 beschrieben. Die Bakteriensuspension wurde am Durchflusszytometer vermessen und eine Konzentration von etwa  $10^8$  Partikeln eingestellt. Jeweils 500 µl dieser Suspension wurden für die fluorimetrischen Messungen sowie jeweils 1 ml für die Keimzahlbestimmungen in ein Reaktionsgefäß gegeben und bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Intervallen gestresst. Anschließend erfolgten die Messungen mittels Fluorimetrie sowie die Bestimmung der Keimzahlen wie in Kapitel 2.2 beschrieben.

Folgende Streßbedingungen wurden gewählt:

50 °C: 0, 30 s, 1 min, 90 s, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min

60 °C: 0, 30 s, 1 min, 90 s, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min

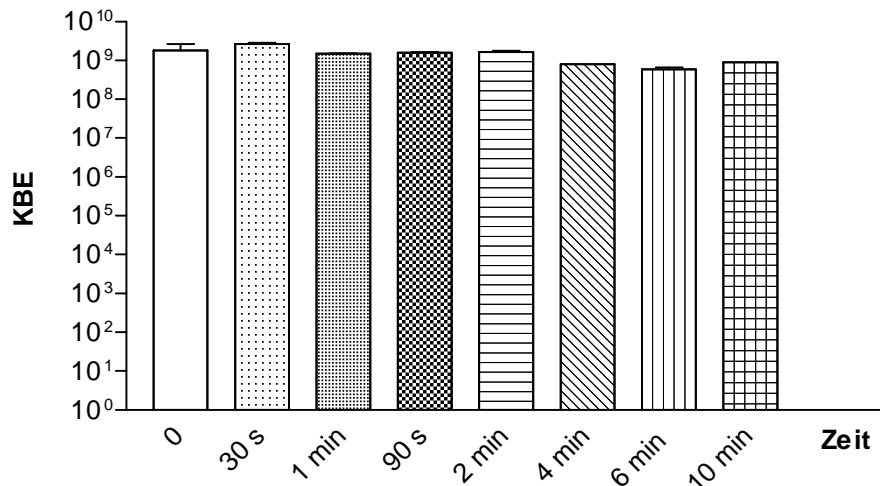
70 °C: 0, 30 s, 1 min, 90 s, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min

80 °C: 0, 30 s, 1 min, 90 s, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min

90 °C: 0, 30 s, 1 min, 90 s, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min

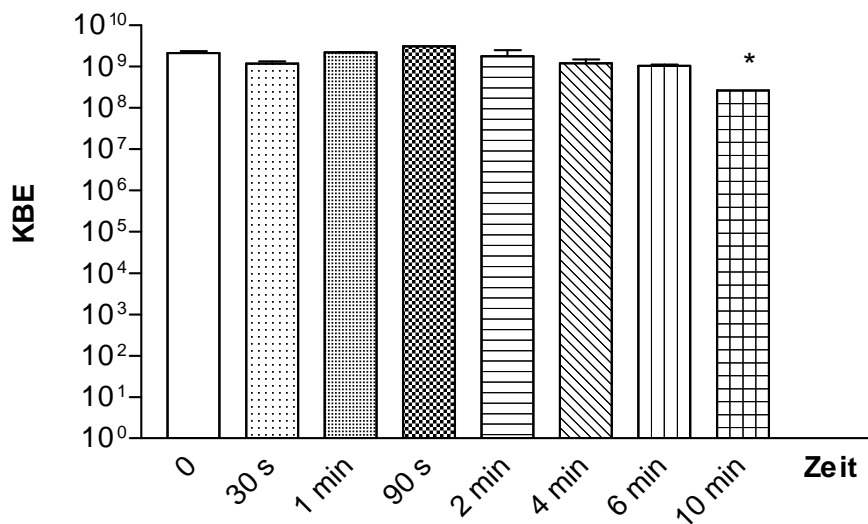


## Keimzahlbestimmung



**Abb. 21: KBE bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**

Abbildung 21 zeigt KBE bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses. Es gibt keine signifikanten Änderungen der Keimzahlen über den gesamten Bereich.



**Abb. 22: KBE bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe**

Abbildung 22 zeigt KBE bei 60 °C bei verschiedenen Stresszeiten. Bei 10 min sinkt die Keimzahl signifikant im Vergleich zur ungestressten Probe ( $p < 0,01$ ).

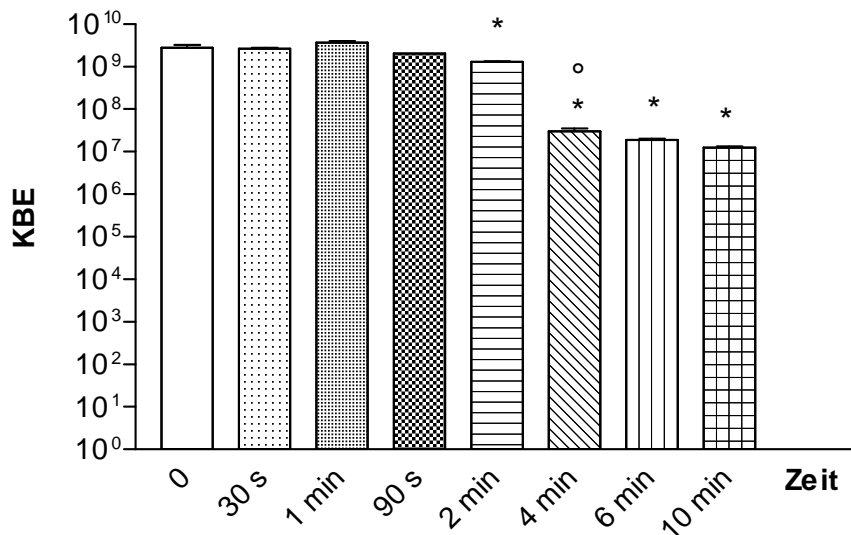


Abb. 23: KBE bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 23 zeigt KBE bei 70 °C bei verschiedenen Zeiten. Bei 2 min ( $p < 0,01$ ) und nochmals ab 4 min ( $p < 0,001$ ) zeigt sich eine signifikante Abnahme der Keimzahlen gegenüber der ungestressten Probe.

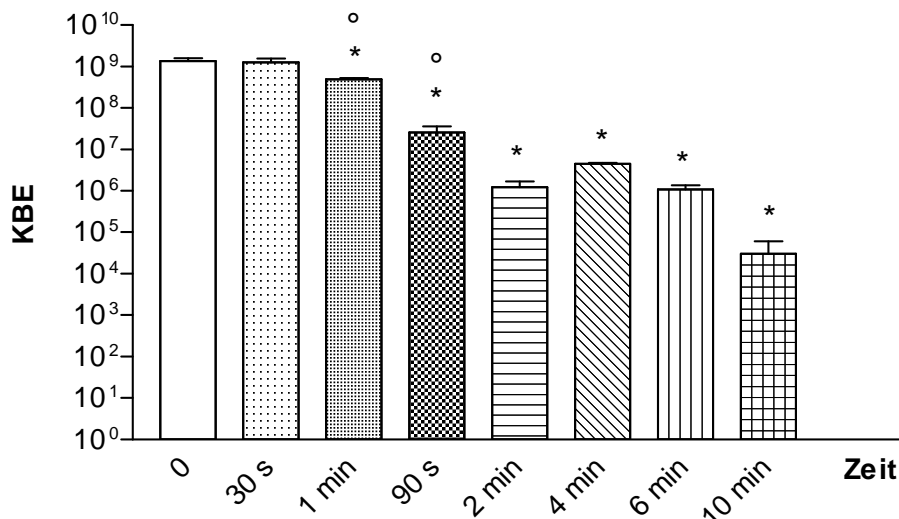
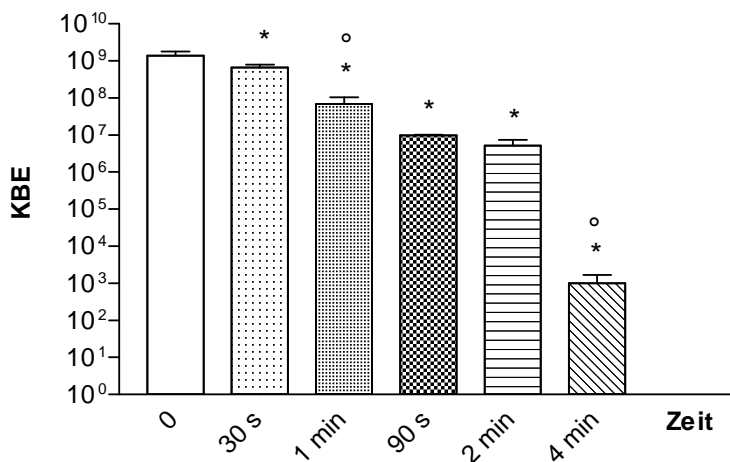


Abb. 24: KBE bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 24 zeigt KBE bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses. Ab 1 min sinkt die Keimzahl signifikant gegenüber der ungestressten Probe ( $p < 0,001$ ), bei 90 s kommt es zu einer weiteren signifikanten Abnahme.



**Abb. 25: KBE bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe  
 ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 25 zeigt KBE bei 90 °C bei verschiedenen Zeiten. Schon ab 30 s kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Keimzahl im Vergleich zur ungestressten Probe ( $p < 0,01$ ). Bei 1 min sinkt die Keimzahl signifikant gegenüber der bei 30 s ( $p < 0,01$ ) sowie bei 4 min signifikant gegenüber der von 2 min. Ab 6 min bei 90 °C wurden die Bakterien abgetötet.

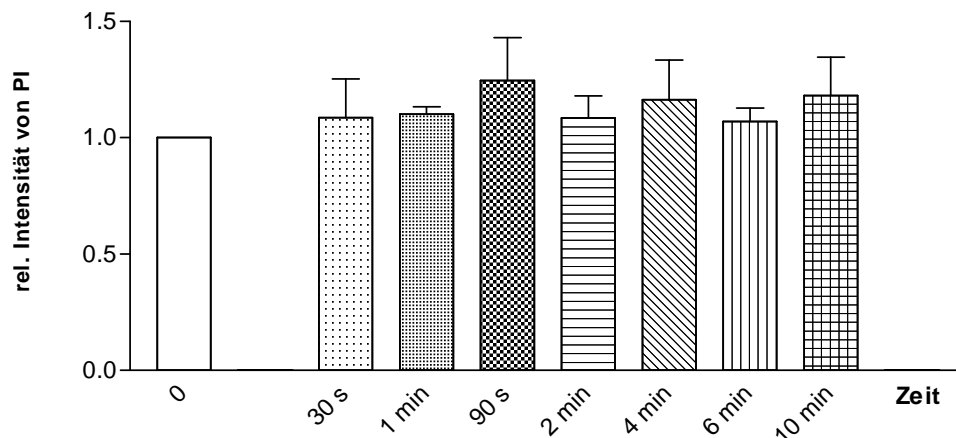
Allgemein lässt sich sagen, dass mit steigender Temperatur und Dauer des Hitzestresses die Keimzahl sinkt.

## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität

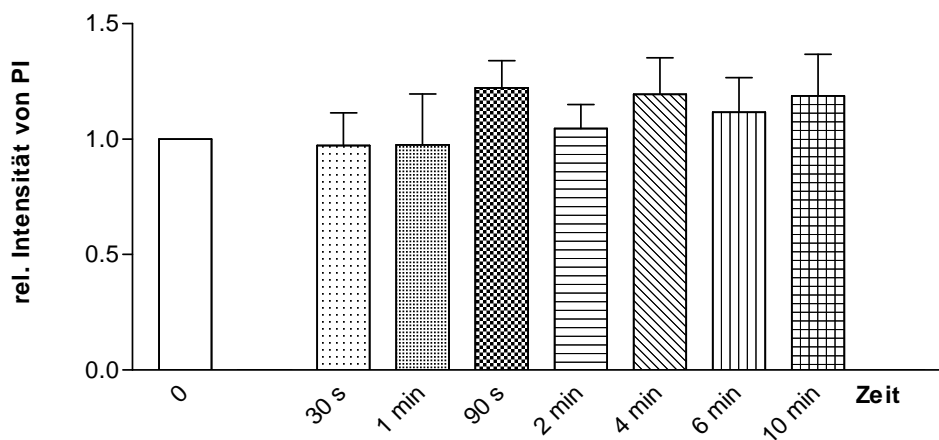
Die Messung erfolgte nach Färbung mit Propidiumiodid (PI).

Da PI nur die geschädigte Zellmembran durchdringen kann, korreliert die Höhe der Intensität mit dem Maß der Membranschädigung.



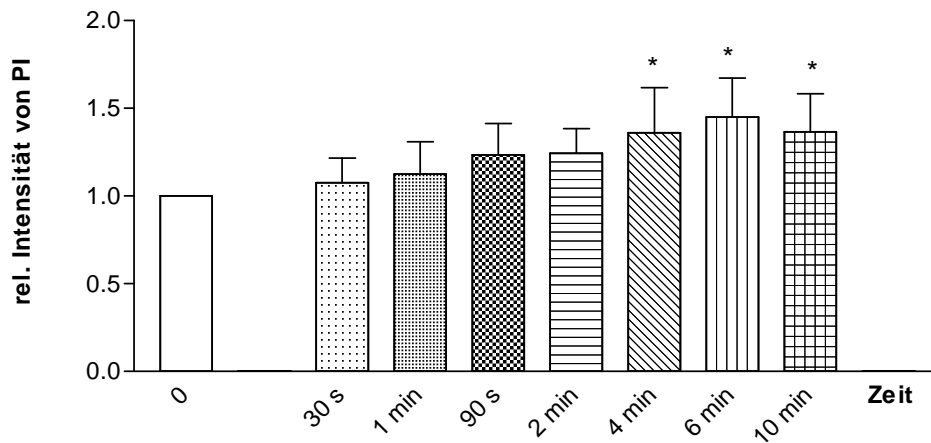
**Abb. 26: Rel. Intensität von PI bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**

Abbildung 26 zeigt die relative Intensität von PI bei 50 °C bei verschiedenen Zeiten. Es gibt keine signifikante Änderung der rel. PI-Intensität.



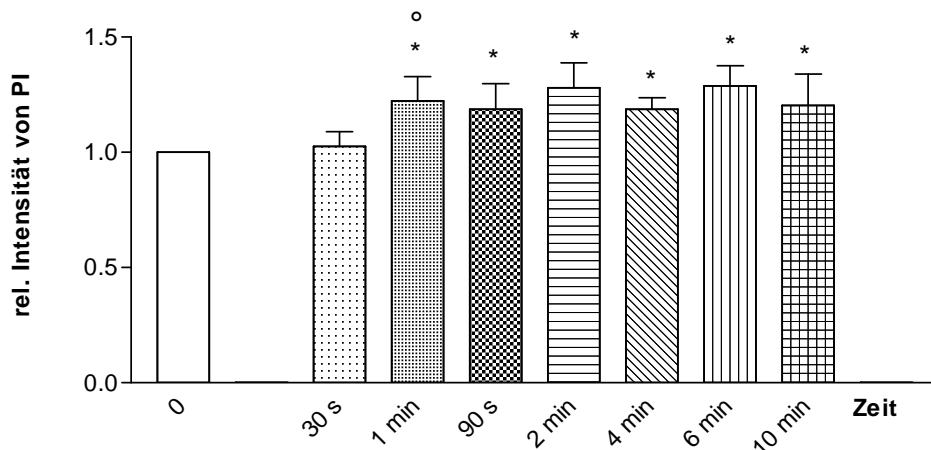
**Abb. 27: Rel. Intensität von PI bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**

Abbildung 27 zeigt die relative Intensität von PI bei 60 °C bei verschiedenen Stresszeiten. Auch hier zeigen sich keine signifikanten Änderungen der rel. Intensitäten im Vergleich zu ungestressten Zellen.



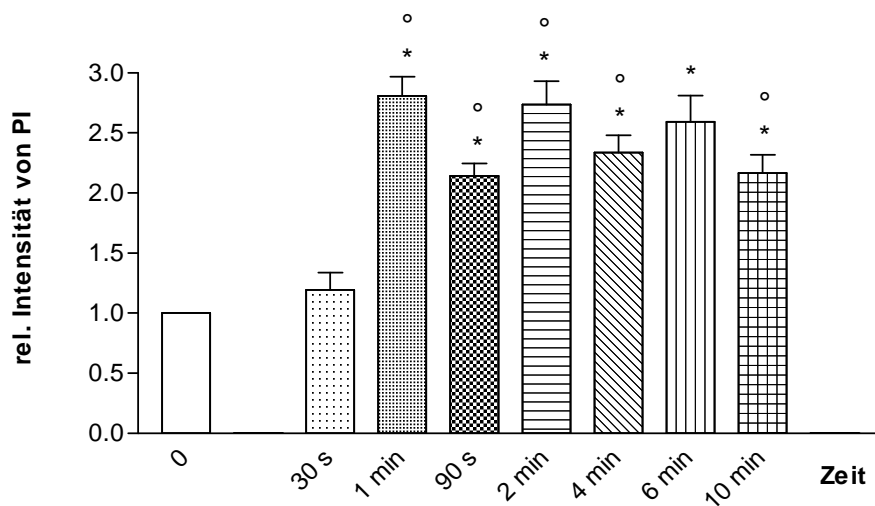
**Abb. 28: Rel. Intensität von PI bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe

Abbildung 28 zeigt die relative Intensität von PI bei 70 °C bei verschiedenen Zeiten. Ab 4 min erhöht sich die PI-Intensität signifikant gegenüber der ungestressten Probe ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 29: Rel. Intensität von PI bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe  
 ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 29 zeigt die relative Intensität von PI bei 80 °C bei verschiedenen Zeiten. Schon ab 1 min erhöht sich die Intensität signifikant ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 30: Rel. Intensität von PI bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 30 zeigt die relative Intensität von PI bei 90 °C bei unterschiedlicher Stressdauer. Ab 1 min erhöht sich die Intensität signifikant gegenüber der ungestressten Probe ( $p < 0,001$ ), sie steigt da auf etwa das 3fache.

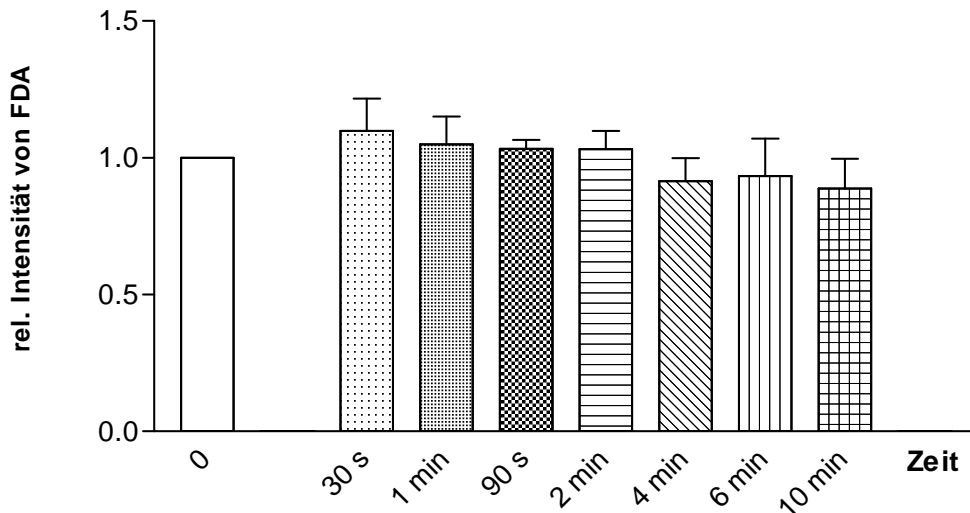
Allgemein lässt sich sagen, je höher die Temperatur und je länger die Dauer des Hitzestresses, desto höher war die Intensität von PI, d.h. desto mehr wurden die Bakterien geschädigt.

### Esteraseaktivität

Die Messung erfolgte nach Färbung mit Fluoresceindiacetat (FDA).

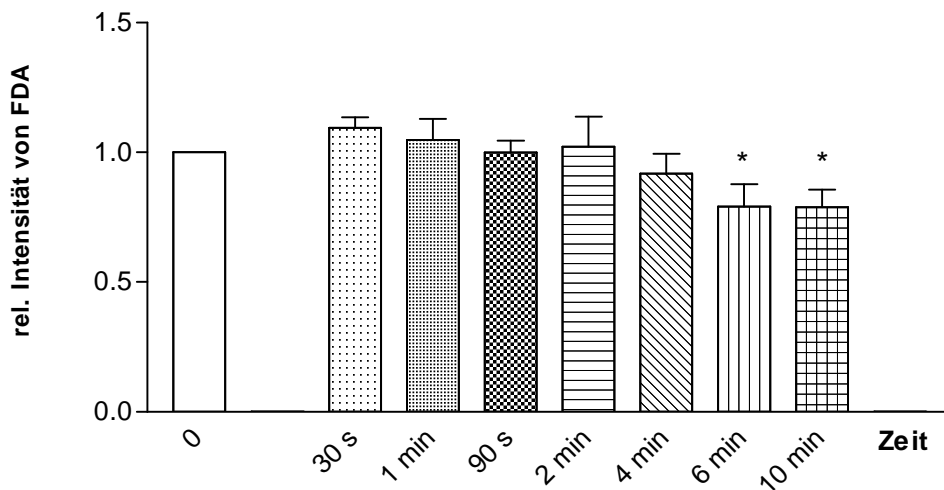
FDA wird intrazellulär von Esterasen nach Abspaltung der Acetatreste zum fluoreszierenden Fluorescein hydrolysiert. Nur Zellen mit intaktem Metabolismus und Esteraseaktivität zeigen Fluoreszenz.

Je höher die Intensität von FDA, desto höher ist die Enzymaktivität und desto geringer demzufolge das Maß der Zellschädigung.



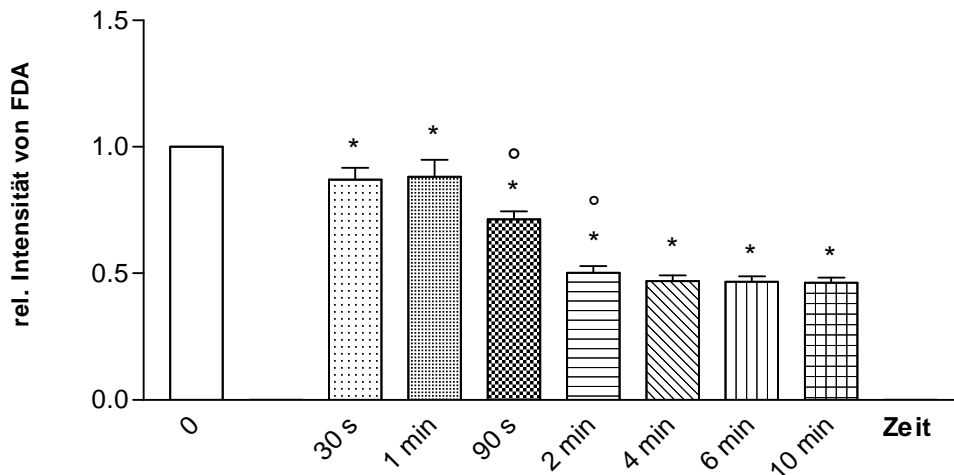
**Abb. 31: Rel. Intensität von FDA bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**

Abbildung 31 zeigt die relative Intensität von FDA bei 50 °C bei verschiedenen Zeiten. Es gibt keine signifikante Veränderung der Intensität im Vergleich zu ungestressten Zellen.



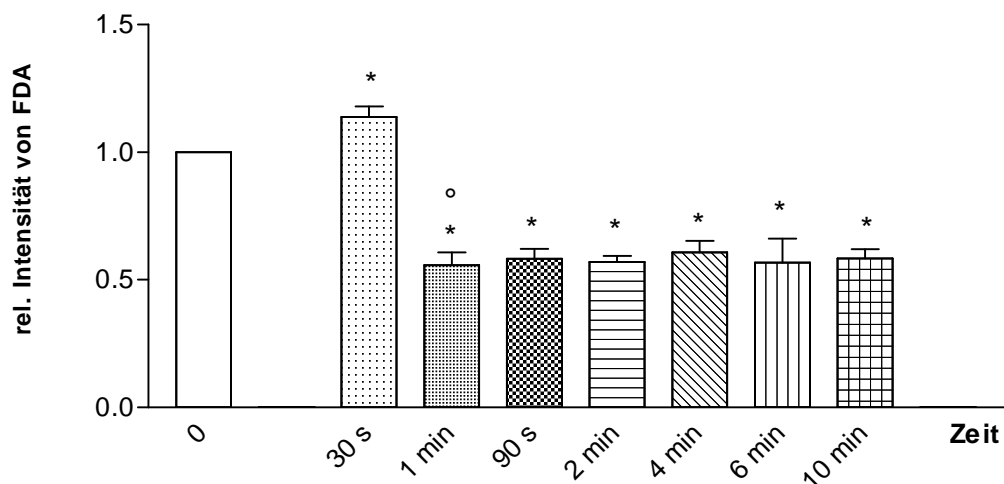
**Abb. 32: Rel. Intensität von FDA bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe  
 ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 32 zeigt die relative Intensität von FDA bei 60 °C bei verschiedenen Stresszeiten. Bei 6 min und 10 min sinken die Intensitäten signifikant gegenüber der ungestressten Probe ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 33: Rel. Intensität von FDA bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe  
 ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

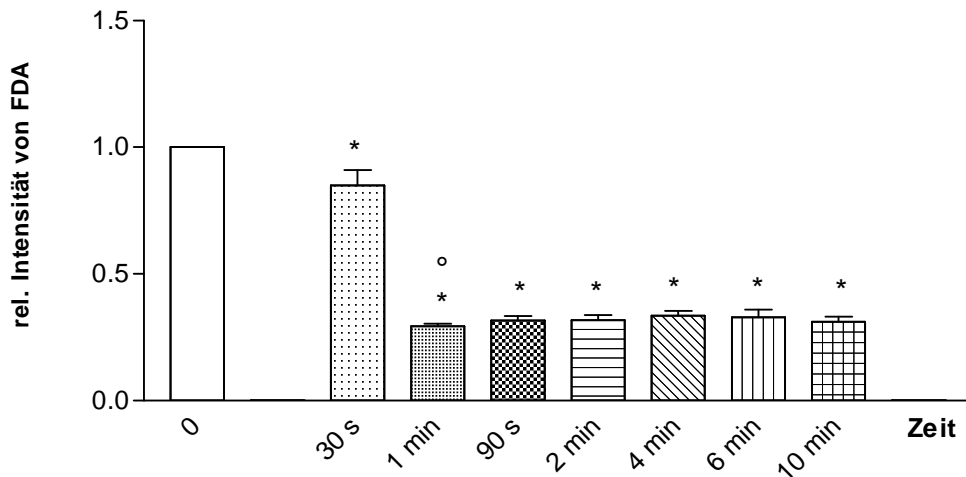
Abbildung 33 zeigt die relative Intensität von FDA bei 70 °C bei verschiedenen Zeiten. Schon ab 30 s kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Intensität gegenüber den ungestressten Zellen ( $p < 0,001$ ). Zu einer weiteren signifikanten Abnahme kommt es bei 90 s und 2 min. Ab 2 min ändert sich die Fluoreszenzintensität nicht mehr.



**Abb. 34: Rel. Intensität von FDA bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe  
 ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 34 zeigt die relative Intensität von FDA bei 80 °C bei verschiedenen Zeiten. Nach 30 s kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Intensität im Vergleich zur ungestressten Probe ( $p < 0,01$ ). Ab 1 min sinkt die Intensität signifikant ( $p < 0,001$ ) und ändert sich kaum bei weiterer Dauer des Hitzestresses.





**Abb. 35: Rel. Intensität von FDA bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe  
 ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

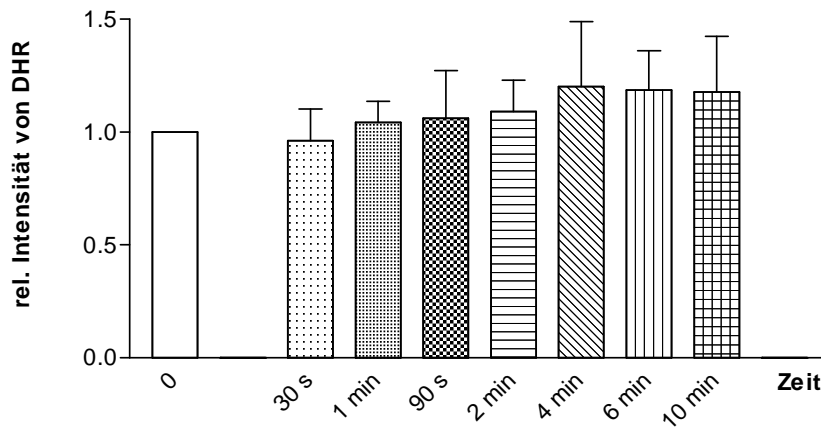
Abbildung 35 zeigt die relative Intensität von FDA bei 90 °C bei verschiedenen Stresszeiten. Ab 30 s sinkt die Intensität signifikant gegenüber den ungestressten Zellen ( $p < 0,001$ ), ab 1 min zeigt sich eine weitere signifikante Abnahme ( $p < 0,001$ ) und die Intensität ändert sich kaum noch bei weiterer Dauer des Hitzestresses.

Bei geringeren Temperaturen steigt erst die FDA-Intensität durch eine erhöhte Enzymaktivität. Nach längerer Zeit bei geringeren Temperaturen bzw. schon nach kurzer Zeit bei höheren Temperaturen sinkt die Enzymaktivität und erreicht schließlich ein Minimum, welches sich nicht mehr ändert.

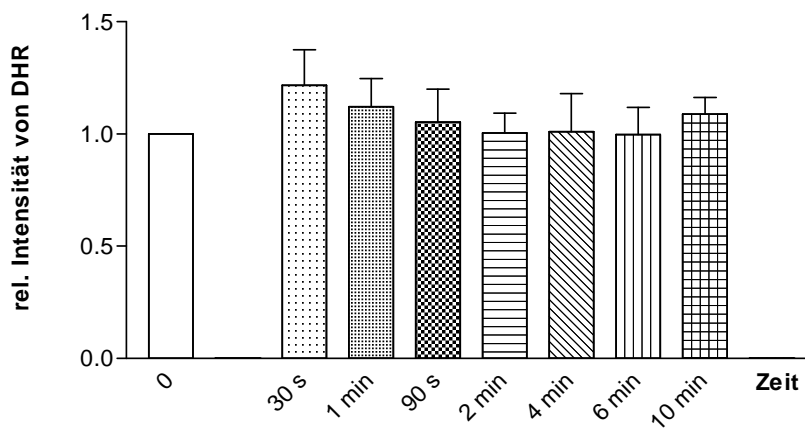
### Wasserstoffperoxidbildung

Die Messung erfolgte nach Färbung mit Dihydrorhodamin 123 (DHR).

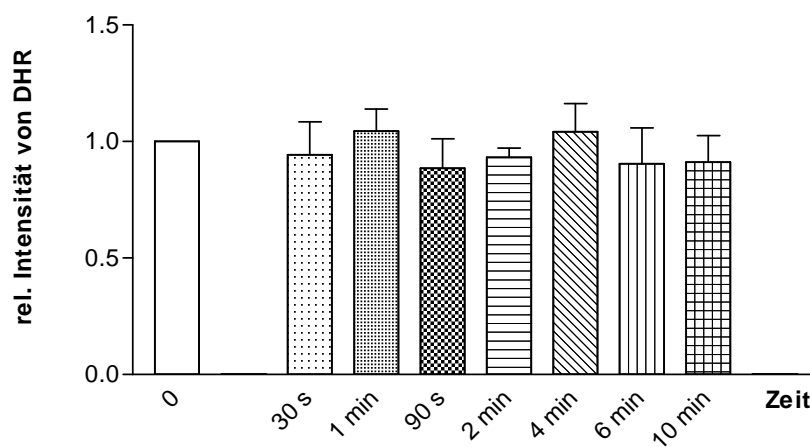
DHR wird innerhalb der Zelle durch oxidative Spezies oder Redoxsysteme zum fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert. Es dient dem Nachweis intrazellulärer reaktiver Spezies, wie Peroxide und Peroxynitrite, die als Reaktion auf Stress gebildet werden. Eine hohe DHR-Intensität deutet auf eine erhöhte Aktivität der Redoxsysteme hin. Bei zu starkem Stress können die Redoxsysteme die Stressfaktoren nicht mehr kompensieren und die DHR-Intensität sinkt.



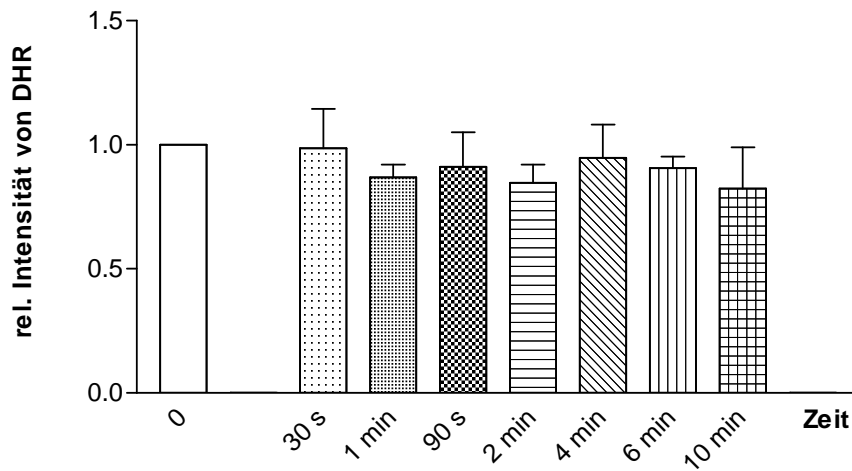
**Abb. 36: Rel. Intensität von DHR bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**



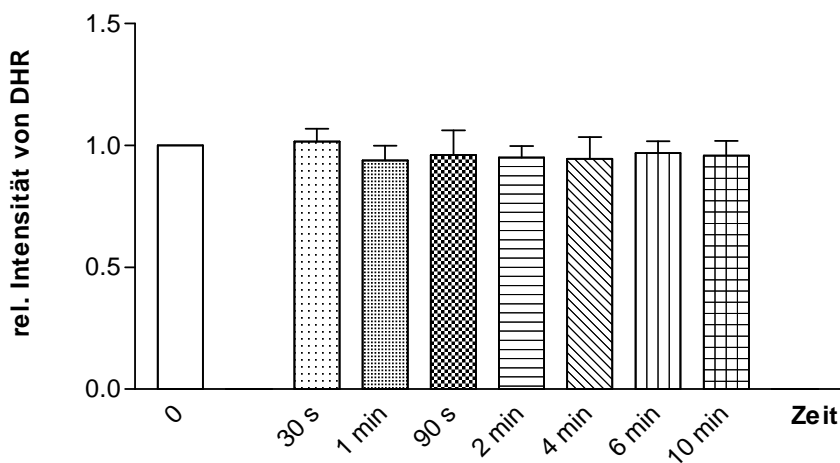
**Abb. 37: Relative Intensität von DHR bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**



**Abb. 38: Relative Intensität von DHR bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**



**Abb. 39: Relative Intensität von DHR bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**



**Abb. 40: Relative Intensität von DHR bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses  
keine Signifikanz**

Abbildungen 36 bis 40 zeigen die rel. DHR-Intensitäten bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Intervallen. Bei keiner Temperatur ergaben sich signifikante Änderungen der Intensitäten. Allerdings zeigte sich bei 50 °C ein Anstieg der DHR-Intensität mit steigender Dauer des Hitzestresses und blieb ab 4 min etwa gleich hoch. Bei 60 °C war die DHR-Intensität bei 30 s am höchsten und verringerte sich bei zunehmender Stressdauer. Bei 90 °C waren alle Intensitäten etwa gleich hoch.

### 3.2.2 Einfluss von Protektanten bei der Fluid-Bed-Trocknung

Es wurde der Einfluss verschiedener Protektanten auf die Kultivierbarkeit und zelluläre Aktivität von *L. reuteri* bei der Fluid-Bed-Trocknung untersucht.

Als Protektanten wurden verwendet:

Magermilchpulver, Saccharose, Glucose und Dextrin jeweils in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse an Bakterien.

Die Fluid-Bed-Trocknung und die Untersuchung der so erhaltenen Pellets erfolgten wie unter 2.2 beschrieben. Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wurde von allen der DNA-Gehalt bestimmt und die Ergebnisse pro  $\mu\text{g}$  DNA berechnet. Es wurden die relativen Intensitäten angegeben. Dafür wurde jeweils die Intensität/ $\mu\text{g}$  DNA der Probe ohne Protektant = 1 gesetzt und alle anderen Intensitäten in Relation gesetzt.

Die Untersuchungen wurden einmal durchgeführt.

#### 3.2.2.1 Magermilchpulver

##### Keimzahlbestimmung

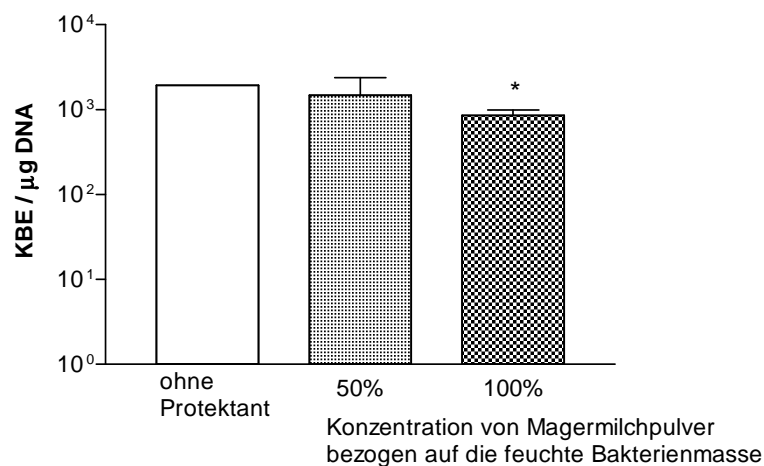


Abb. 41: KBE /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

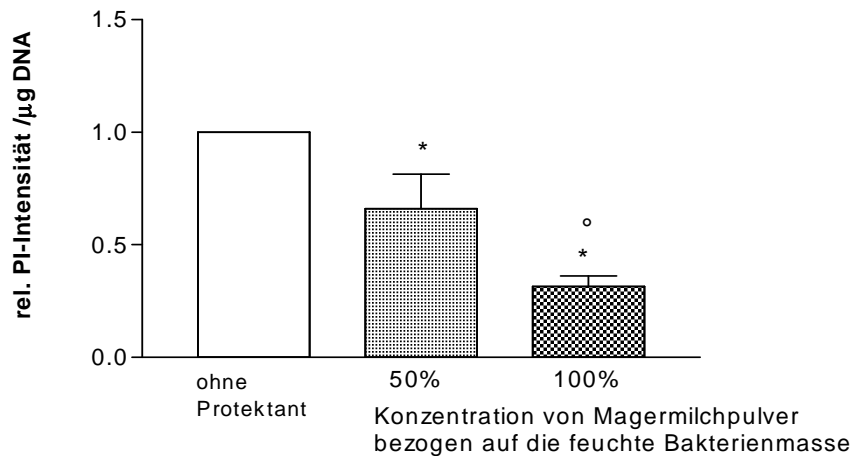
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 41 zeigt KBE pro  $\mu\text{g}$  DNA nach der Fluid-Bed-Trocknung mit Magermilchpulver als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien und KBE ohne Protektant zum Vergleich.

Bei einer Konzentration von 100 % Magermilchpulver sinkt die Keimzahl signifikant ( $p < 0,05$ ).

## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität



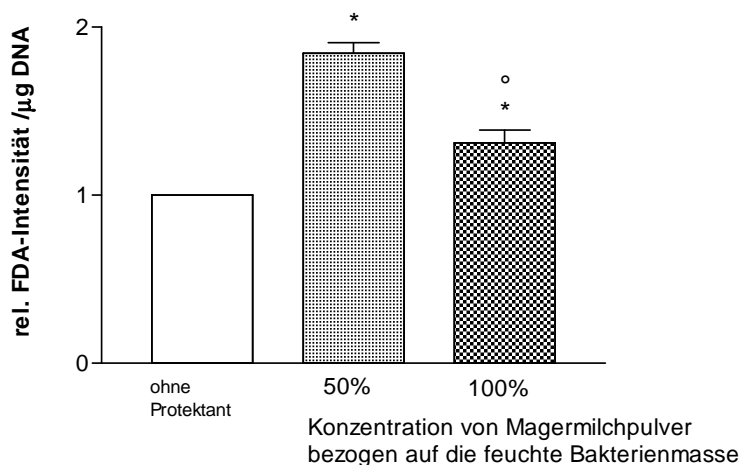
**Abb. 42: Rel. Intensität von PI / µg DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**

- \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant
- ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 42 zeigt die relative Intensität von PI pro µg DNA mit Magermilchpulver als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Mit Protektant kommt es zu einer signifikanten Abnahme der Intensität, bei einer Konzentration von 50 % sinkt die Intensität um etwa  $\frac{1}{4}$  ( $p < 0,001$ ) und bei einer Konzentration von 100 % sinkt die Intensität um mehr als die Hälfte ( $p < 0,001$ ).

### Esteraseaktivität



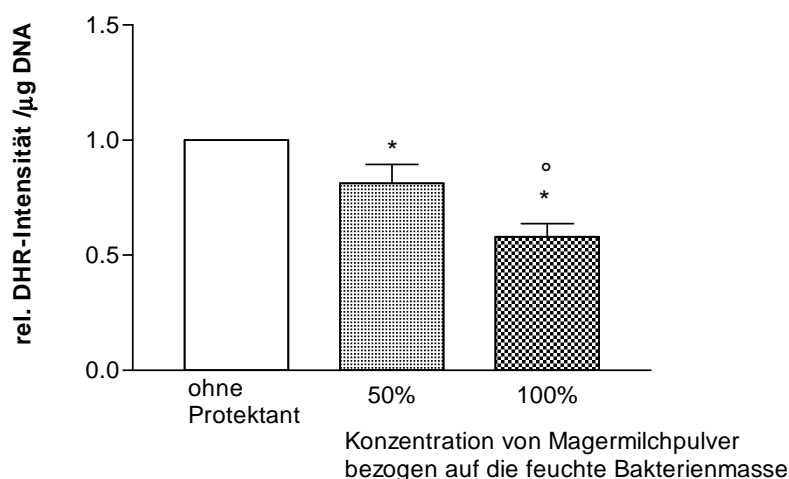
**Abb. 43: Rel. Intensität von FDA / µg DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**

- \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant
- ° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 43 zeigt die relative Intensität von FDA pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Protektant liegen die rel. Intensitäten signifikant höher als bei der Probe ohne Protektant. Bei einer Konzentration von 50 % beträgt die Intensität von FDA fast das Doppelte gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Bei einer Konzentration von 100 % ist die FDA-Intensität signifikant geringer als bei 50%iger Konzentration ( $p < 0,001$ ), aber signifikant höher gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

### Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 44: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 44 zeigt die relative Intensität von DHR pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Protektant sind die rel. Intensitäten signifikant geringer gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Bei einer Konzentration von 100 % ist die rel. Intensität signifikant geringer als bei 50%iger Konzentration ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.2.2 Saccharose

#### Keimzahlbestimmung

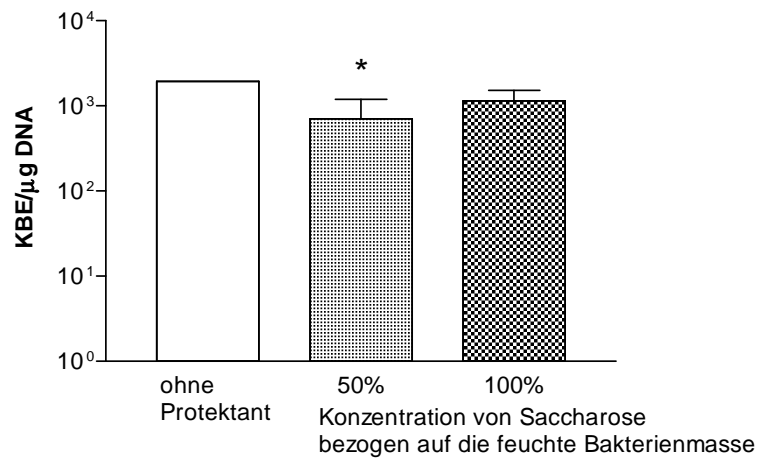


Abb. 45: KBE / μg DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 45 zeigt KBE pro μg DNA nach der Fluid-Bed-Trocknung mit Saccharose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien und KBE ohne Protektant zum Vergleich.

Bei einer Konzentration von 50 % Saccharose ist KBE signifikant geringer als bei der Probe ohne Protektant ( $p < 0,01$ ). Bei einer 100%igen Konzentration gibt es keine signifikante Veränderung.

#### Zelluläre Aktivität

##### Membranintegrität

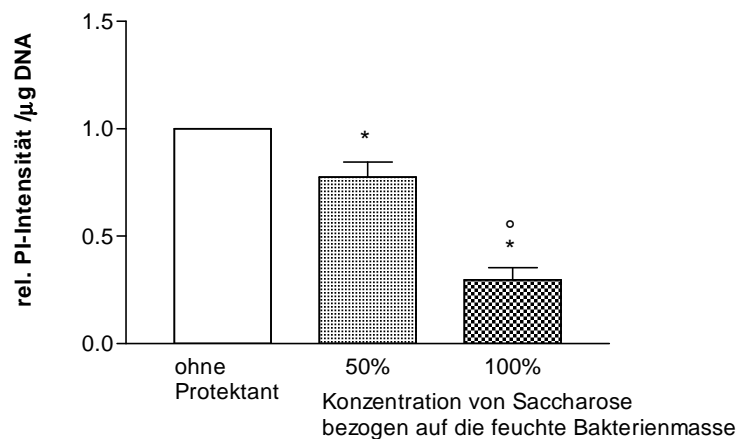


Abb. 46: Rel. Intensität von PI /μg DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

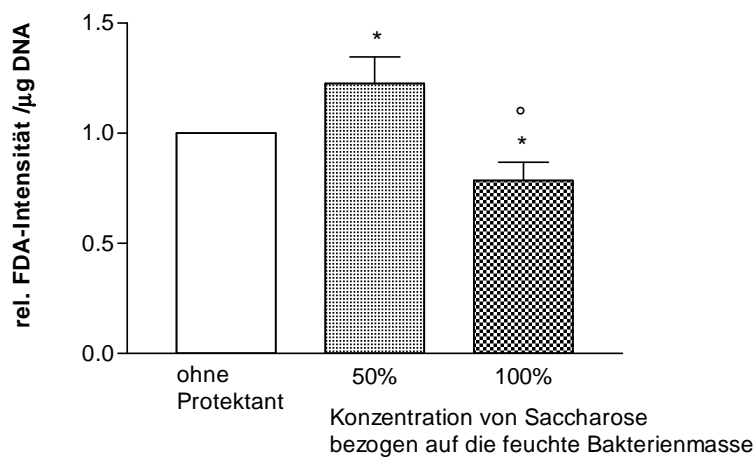
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 46 zeigt die relative Intensität von PI pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Saccharose in beiden Konzentrationen sinken die rel. PI-Intensitäten signifikant ( $p < 0,001$ ). Die Intensität der Probe der 100%igen Konzentration ist signifikant geringer als die der 50%igen.

### Esteraseaktivität



**Abb. 47: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**

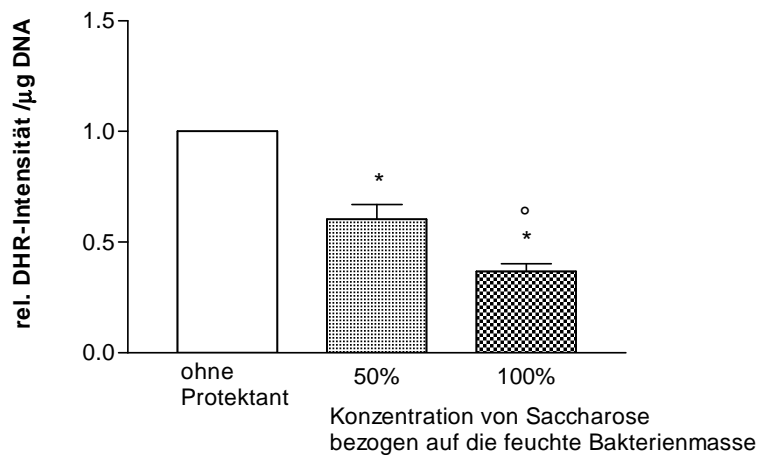
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 47 zeigt die relative Intensität von FDA pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant. Bei der Probe mit der Konzentration von 50 % Saccharose ist die rel. FDA-Intensität signifikant höher ( $p < 0,01$ ), bei der Probe mit 100 % signifikant geringer ( $p < 0,05$ ) als die Intensität der Referenz.



## Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 48: Rel. Intensität von DHR / µg DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

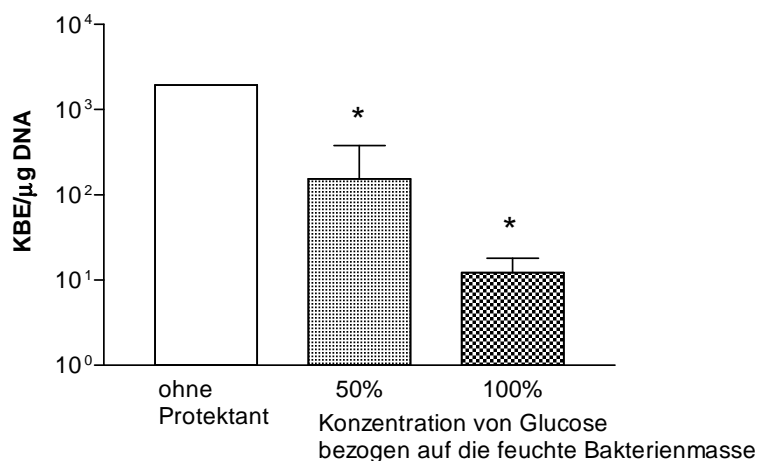
° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 48 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA mit Saccharose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Protektant sind die rel. Intensitäten signifikant geringer gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Bei der Probe mit 100%iger Konzentration liegt die rel. Intensität signifikant unter der mit 50%iger Konzentration an Saccharose ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.2.3 Glucose

## **Keimzahlbestimmung**



**Abb. 49: KBE / µg DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**

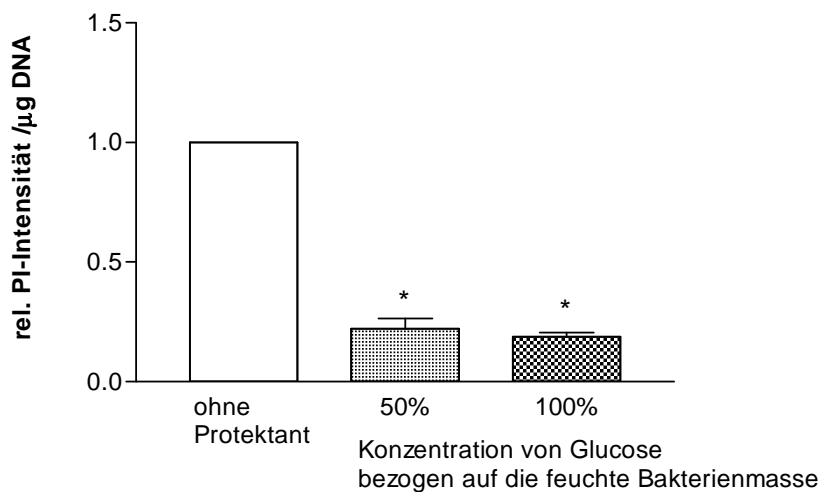
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 49 zeigt KBE pro  $\mu\text{g}$  DNA nach der Fluid-Bed-Trocknung mit Glucose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien und KBE ohne Protektant zum Vergleich.

Bei den Proben mit Protektant sind die Keimzahlen signifikant geringer als bei der Probe ohne Protektant ( $p < 0,01$ ).

## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität

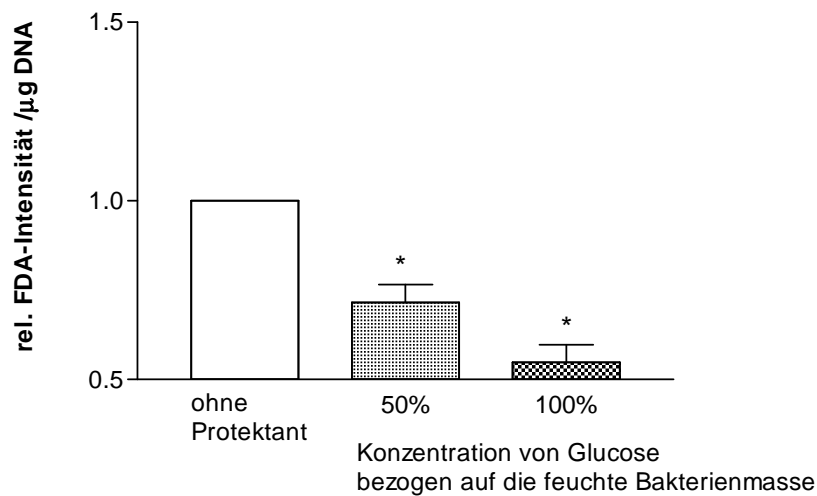


**Abb. 50: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 50 zeigt die relative Intensität von PI pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Protektant sind die rel. PI-Intensitäten signifikant geringer gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Die Intensitäten beider Konzentrationen von Glucose sind etwa gleich hoch.

## Esteraseaktivität

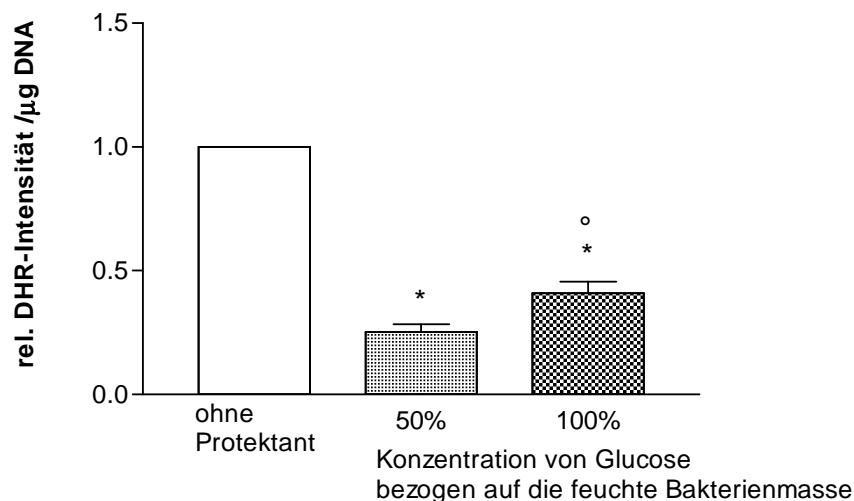


**Abb. 51: Rel. Intensität von FDA / µg DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed- Trocknung**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 51 zeigt die relative Intensität von FDA pro µg DNA mit Glucose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Glucose sind die rel. FDA-Intensitäten signifikant geringer ( $p < 0,001$ ).

## Wasserstoffperoxidbildung



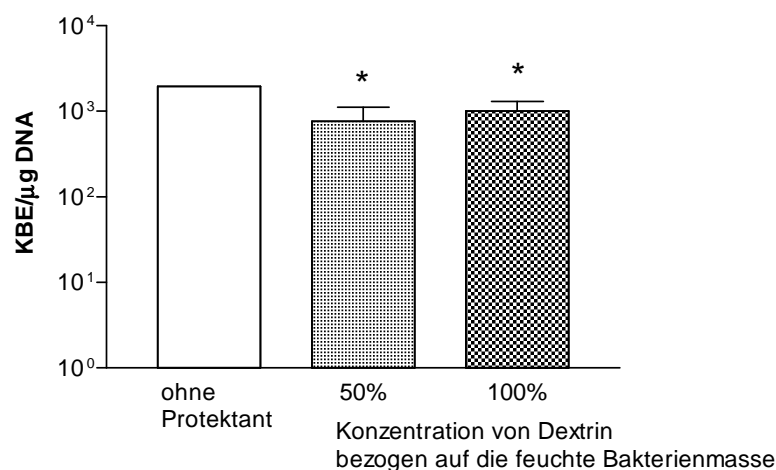
**Abb. 52: Rel. Intensität von DHR / µg DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed- Trocknung**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant  
° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 52 zeigt die relative Intensität von DHR pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben beider Konzentrationen von Glucose sind die rel. DHR-Intensitäten signifikant geringer als die Intensität der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Die rel. Intensität der Probe mit 100 % Glucose ist signifikant höher als die der Probe mit 50 %.

### 3.2.2.4 Dextrin

#### Keimzahlbestimmung



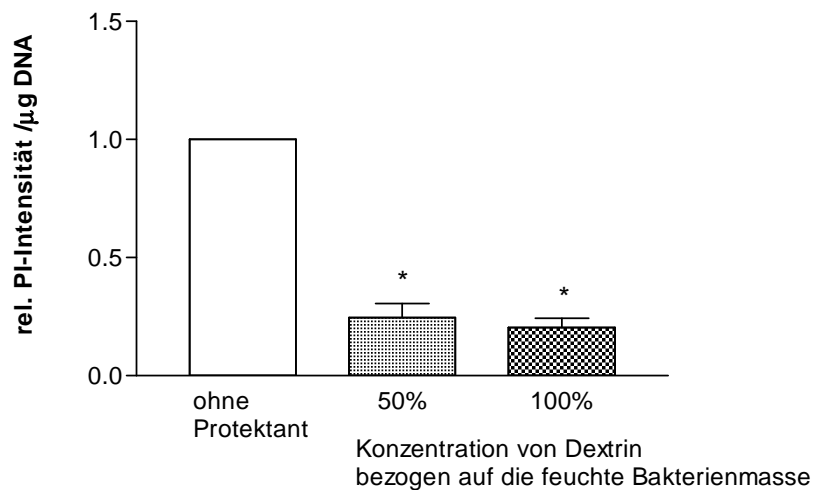
**Abb. 53: KBE /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 53 zeigt KBE pro  $\mu\text{g}$  DNA nach der Fluid-Bed-Trocknung mit Dextrin als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien und KBE ohne Protektant zum Vergleich.

Mit Protektant sinkt die Keimzahl signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Proben beider Konzentrationen von Dextrin ergeben etwa die gleichen KBE.

## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität

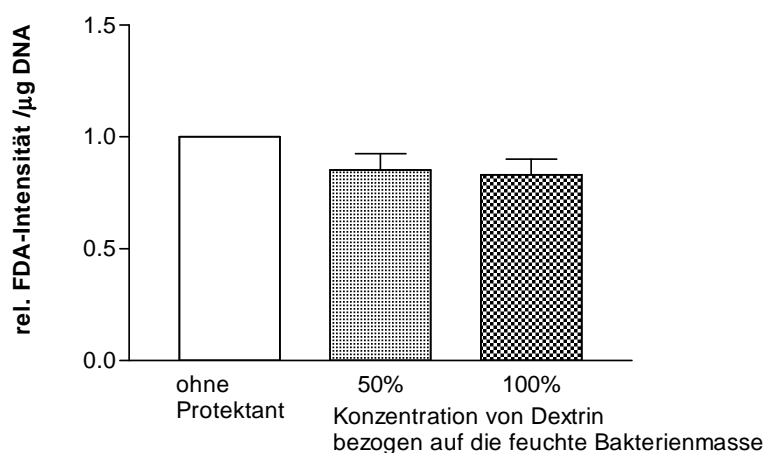


**Abb. 54: Rel. Intensität von PI / µg DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 54 zeigt die relative Intensität von PI pro µg DNA mit Dextrin als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Protektant sind die rel. Intensitäten signifikant geringer als die Referenz ( $p < 0,001$ ) und sie sind bei beiden Konzentrationen etwa gleich hoch.

### Esteraseaktivität

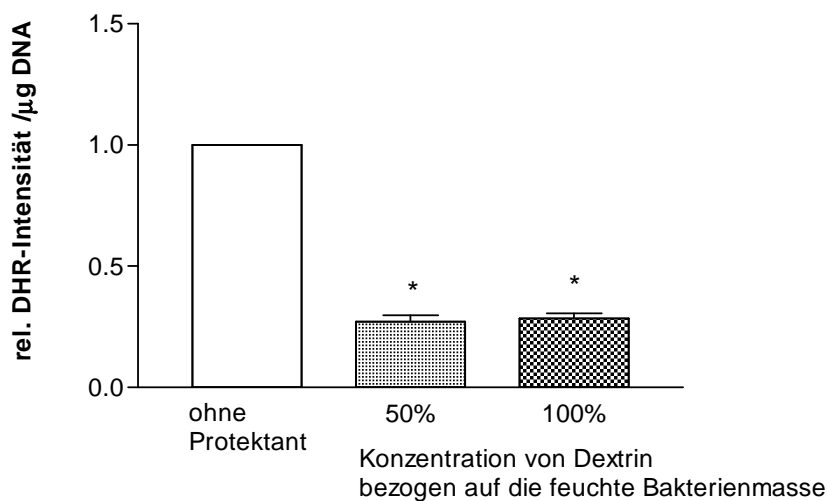


**Abb. 55: Rel. Intensität von FDA / µg DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**  
Keine Signifikanz

Abbildung 55 zeigt die relative Intensität von FDA pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Protektant sind die rel. Intensitäten geringer als bei der Probe ohne Protektant, aber nicht signifikant.

### Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 56: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung**  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

Abbildung 56 zeigt die relative Intensität von DHR pro  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben mit Protektant sind die rel. Intensitäten etwa gleich hoch und signifikant geringer als bei der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.3 Stabilität nach Lagerung

Nach einer Lagerzeit von ca. 5 Monaten, sowohl bei Raumtemperatur (25 °C) als auch bei 4 °C, wurden die Pellets aus Versuchsteil 3.2.2 erneut bezüglich ihrer zellulären Aktivität untersucht. Die Untersuchungen wurden einmal durchgeführt.

Es konnte keine Keimzahl bestimmt werden, da falsche Verdünnungsstufen ausplattiert wurden.

#### 3.2.3.1 Magermilchpulver

##### Zelluläre Aktivität

##### Membranintegrität

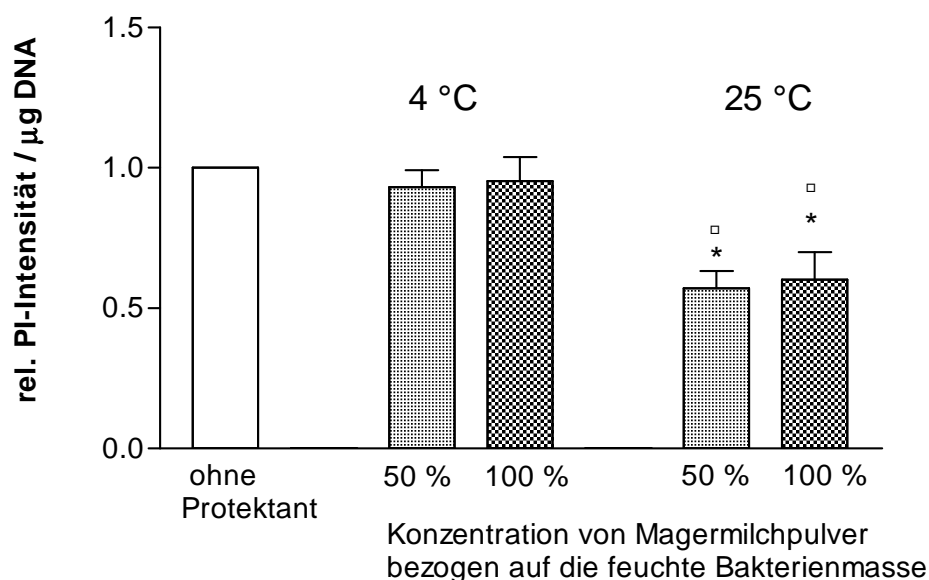


Abb. 57: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g DNA}$  mit Magermilchpulver als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

◻ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

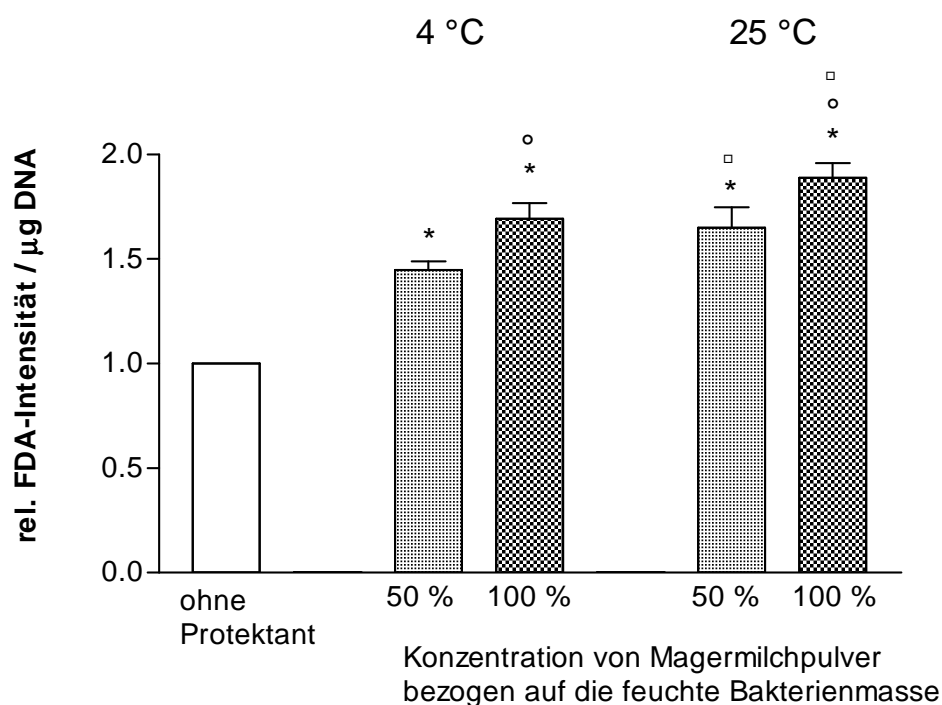
Abbildung 57 zeigt die relative Intensität von PI pro  $\mu\text{g DNA}$  mit Magermilchpulver als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den Proben, die bei 4 °C gelagert wurden, gibt es keine signifikante Änderung der rel. PI-Intensität gegenüber der Probe ohne Protektant. Die Proben mit Protektant in beiden Konzentrationen zeigen etwa die gleichen rel. Intensitäten. Bei den Proben,

die bei 25 °C gelagert wurden, sind die rel. PI-Intensitäten signifikant geringer als die der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Auch hier zeigen die Proben mit Protektant beider Konzentrationen annähernd die gleichen rel. Intensitäten. Bei den bei 25 °C gelagerten Proben sind die PI-Intensitäten geringer als die Intensitäten der bei 4 °C gelagerten Proben.

Bei den frischen Pellets (Abb. 42, S. 53) waren die rel. Intensitäten der Proben mit Protektant signifikant geringer als ohne Protektant, wobei die Intensität der Probe mit einer Konzentration von 100 % signifikant geringer war als mit 50 %.

### Esteraseaktivität



**Abb. 58: Rel. Intensität von FDA / µg DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 58 zeigt die relative Intensität von FDA pro µg DNA mit Magermilchpulver als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

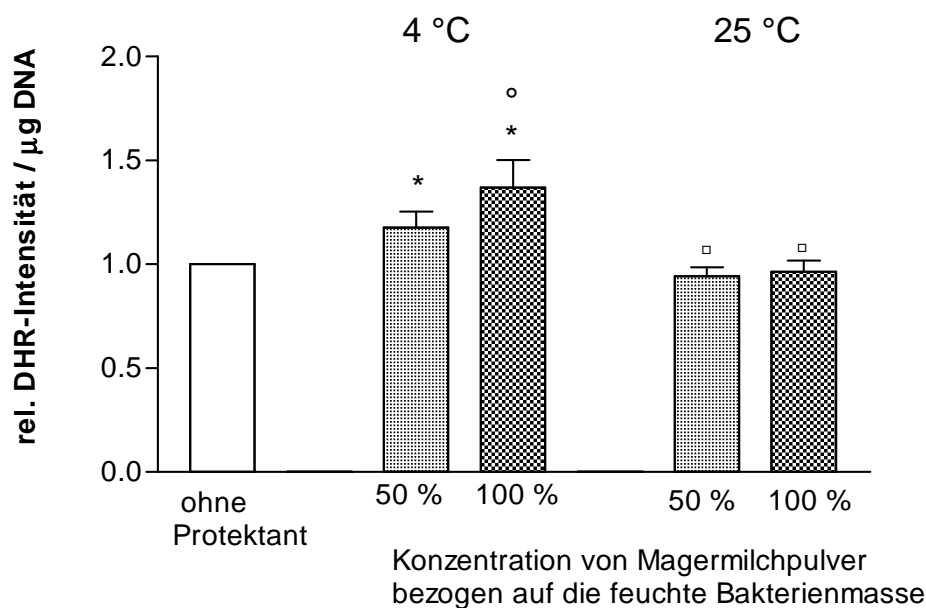
Die rel. FDA-Intensitäten sind sowohl bei den bei 4 °C gelagerten Proben als auch bei den bei 25 °C gelagerten signifikant höher gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Bei den Proben mit 100 % Magermilchpulver sind die rel. Intensitäten signifikant höher gegenüber den Proben mit 50 % Magermilchpulver bei beiden



Lagerungstemperaturen. Die bei 25 °C gelagerten Proben zeigen höhere FDA-Intensitäten als die bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 43, S. 53) waren die FDA-Intensitäten signifikant höher als die Referenz, bei der Probe mit 100 % Magermilchpulver war die Intensität signifikant geringer als bei der mit 50 %.

### Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 59: Rel. Intensität von DHR / µg DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 59 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA mit Magermilchpulver als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Die rel. Intensitäten der bei 4 °C gelagerten Proben liegen signifikant höher gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Bei einer Konzentration von 100 % Magermilchpulver ist die rel. DHR-Intensität signifikant höher als bei der Konzentration von 50 %.

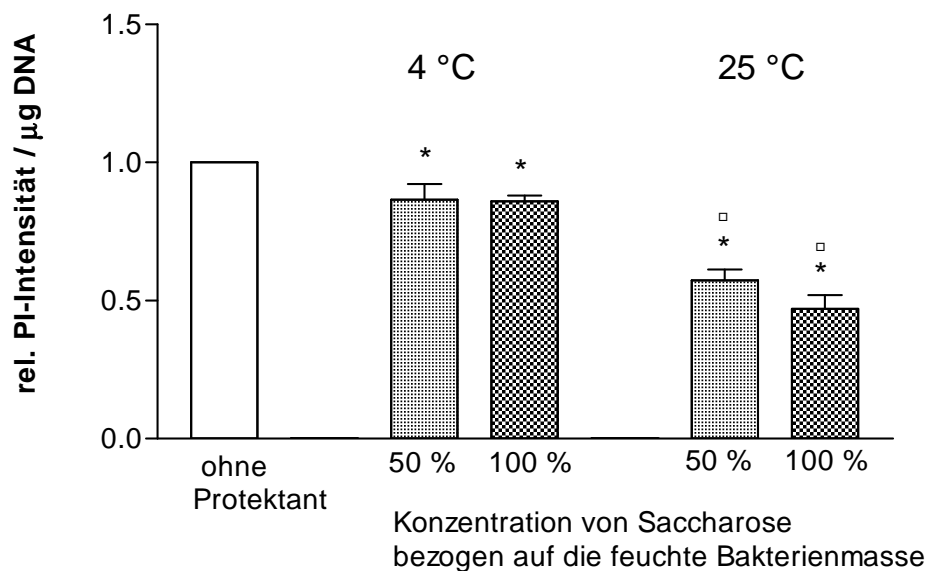
Bei den bei 25 °C gelagerten Proben gibt es keine signifikante Änderung der rel. DHR-Intensität im Vergleich zur Probe ohne Protektant, die Intensitäten beider Konzentrationen sind etwa gleich. Die bei Raumtemperatur gelagerten Proben zeigen geringere DHR-Intensitäten als die bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 44, S. 54) waren die rel. Intensitäten signifikant geringer als die Referenz, bei der Probe mit 100 % Magermilchpulver war die Intensität signifikant geringer als bei der mit 50 %.

### 3.2.3.2 Saccharose

#### Zelluläre Aktivität

##### Membranintegrität



**Abb. 60: Rel. Intensität von PI / µg DNA mit Saccharose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

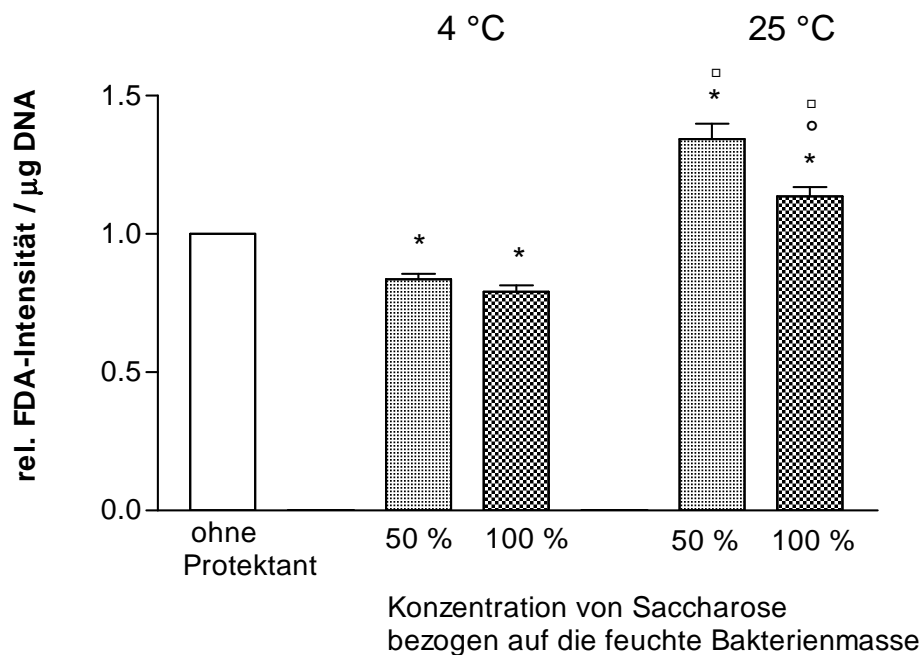
□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 60 zeigt die relative Intensität von PI pro µg DNA mit Saccharose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei allen Proben mit Protektant sind die rel. PI-Intensitäten signifikant niedriger als bei der Probe ohne Protektant. Die bei 25 °C gelagerten Proben zeigen geringere rel. Intensitäten als die bei 4 °C gelagerten. Bei den bei 4 °C gelagerten Proben sind die rel. Intensitäten etwa gleich. Bei den bei 25 °C gelagerten Proben ist die rel. Intensität der Probe mit 100 % Saccharose geringer als bei 50%iger Konzentration.

Bei den frischen Pellets (Abb. 46, S. 55) waren die Intensitäten der Proben mit Protektant signifikant geringer als die Referenz. Die rel. PI-Intensität der Probe mit 100 % Saccharose war signifikant geringer als jene mit 50 %.

### Esteraseaktivität



**Abb. 61: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g DNA}$  mit Saccharose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

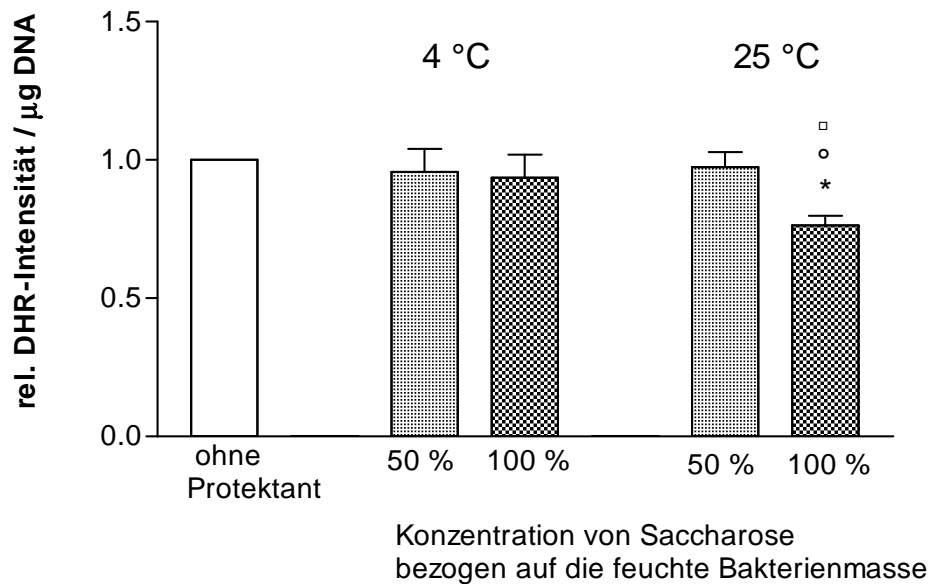
Abbildung 61 zeigt die relative Intensität von FDA pro  $\mu\text{g DNA}$  mit Saccharose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Die rel. FDA-Intensitäten der bei 4 °C gelagerten Proben sind signifikant geringer gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ), die rel. Intensitäten der Proben beider Konzentrationen sind etwa gleich hoch.

Bei den bei 25°C gelagerten Proben sind die rel. Intensitäten signifikant höher gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Die rel. Intensität der Probe mit 100 % Saccharose ist signifikant geringer als jene der mit 50 % Saccharose ( $p < 0,001$ ). Die Intensitäten der bei Raumtemperatur gelagerten Proben sind höher als die der bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 47, S. 56) war die rel. FDA-Intensität der Probe mit 50 % Saccharose signifikant höher, der mit 100 % Saccharose signifikant geringer als die Referenz.

### Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 62: Rel. Intensität von DHR / µg DNA mit Saccharose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 62 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA mit Saccharose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Nur die bei 25 °C gelagerte Probe mit 100 % Saccharose zeigt eine signifikant geringere rel. DHR-Intensität ( $p < 0,001$ ), alle anderen entsprechen etwa der Probe ohne Protektant.

Bei den frischen Pellets (Abb. 48, S. 57) waren die rel. Intensitäten der Proben mit Protektant signifikant geringer, bei 100%iger Konzentration signifikant geringer als bei 50%iger.

### 3.2.3.3 Glucose

#### Zelluläre Aktivität

##### Membranintegrität

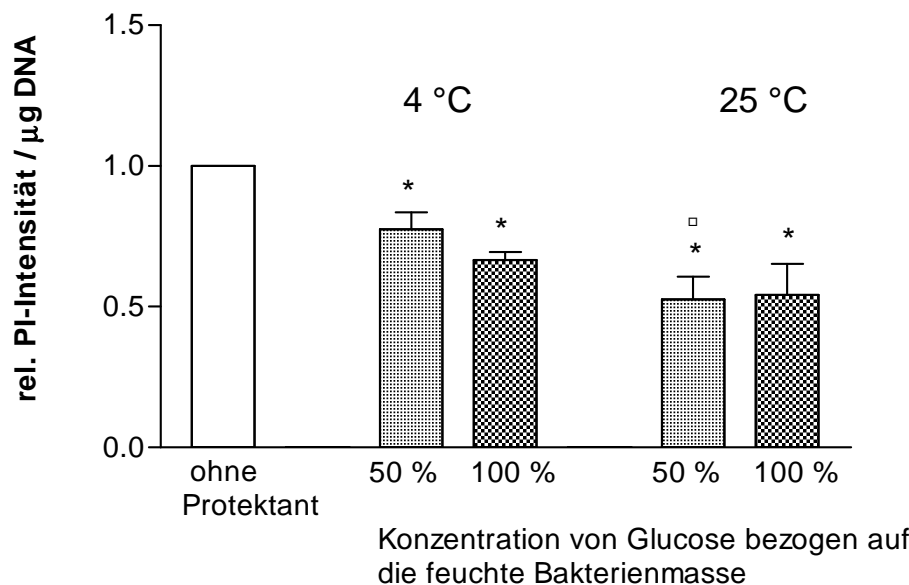


Abb. 63: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g DNA}$  mit Glucose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

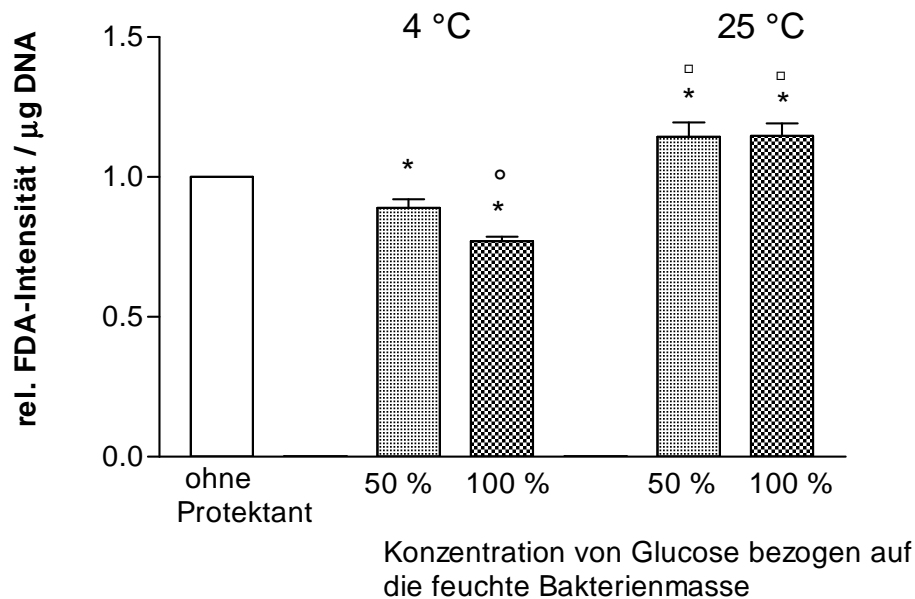
◻ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 63 zeigt die relative Intensität von PI pro  $\mu\text{g DNA}$  mit Glucose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Sowohl bei den bei 4 °C, als auch bei den bei 25 °C gelagerten Proben, kommt es zu einer signifikanten Abnahme der rel. PI-Intensitäten ( $p < 0,001$ ). Bei den bei 4 °C gelagerten Proben ist die Intensität der Probe mit 100 % Glucose etwas geringer als jene der mit 50 %. Bei den bei 25 °C gelagerten Proben sind die rel. Intensitäten etwa gleich hoch. Die PI-Intensitäten sind geringer als die der bei 4 °C gelagerten Proben.

Bei den frischen Pellets (Abb. 50, S. 58) waren die rel. Intensitäten der Proben mit Protektant beider Konzentrationen etwa gleich hoch und signifikant geringer als die Referenz.

## Esteraseaktivität



**Abb. 64: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g DNA}$  mit Glucose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

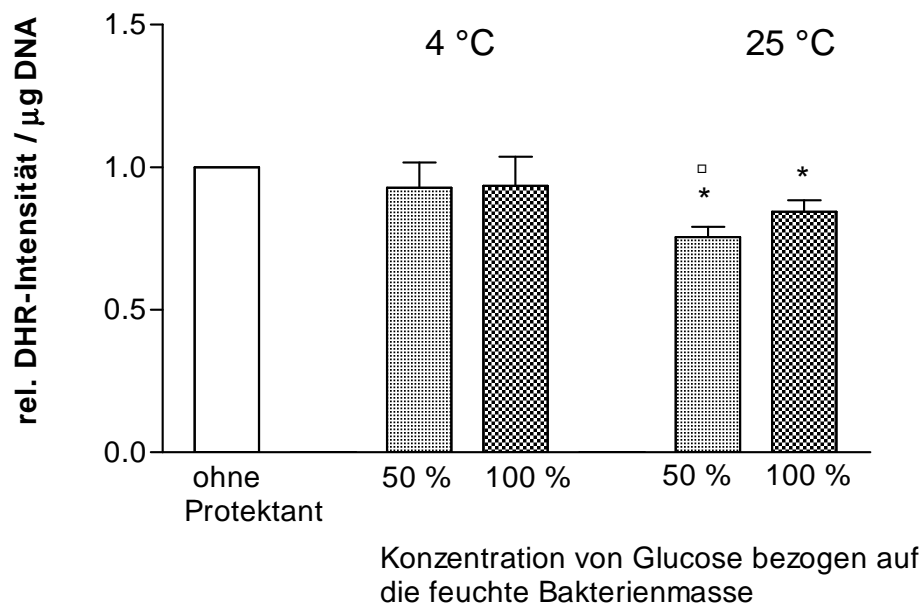
Abbildung 64 zeigt die relative Intensität von FDA pro  $\mu\text{g DNA}$  mit Glucose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Die bei 4 °C gelagerten Proben zeigen geringere rel. FDA-Intensitäten ( $p < 0,001$ ). Die Intensität der Probe mit 100 % Glucose ist signifikant geringer als mit 50 %.

Die bei 25 °C gelagerten Proben haben eine signifikant erhöhte rel. Intensität gegenüber der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ), die Intensitäten der Proben beider Konzentrationen sind etwa gleich. Die FDA-Intensitäten sind höher als die der bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 51, S. 59) waren die rel. Intensitäten der Proben mit Protektant signifikant geringer als die Referenz, bei der Probe mit 100 % Glucose war die Intensität am geringsten.

## Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 65: Rel. Intensität von DHR / µg DNA mit Glucose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 65 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA mit Glucose als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

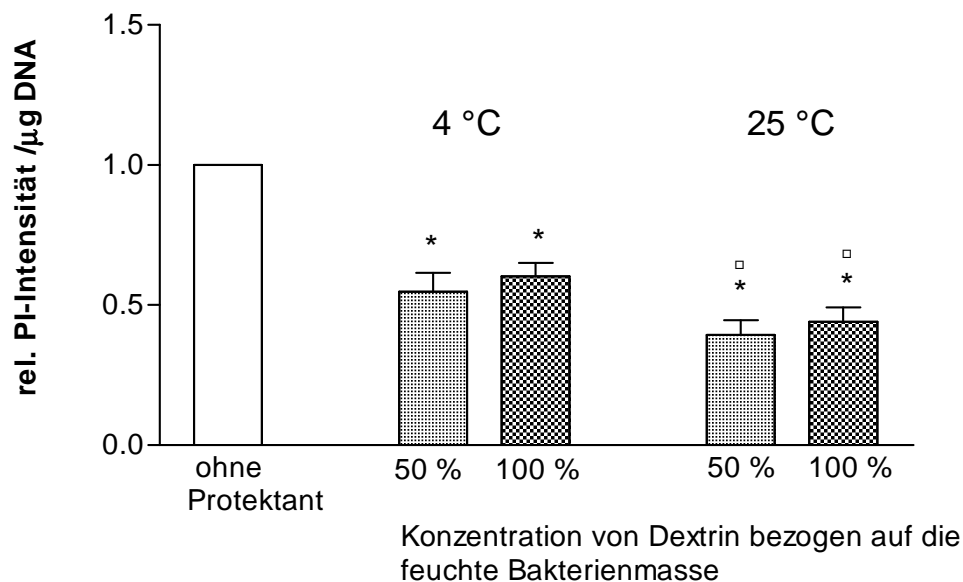
Die bei 4 °C gelagerten Proben zeigen keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Referenz. Bei den bei 25 °C gelagerten Proben sind die rel. DHR-Intensitäten signifikant geringer als die der Probe ohne Protektant ( $p < 0,01$ ). Die bei Raumtemperatur gelagerten Proben zeigen geringere DHR-Intensitäten als die bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 52, S. 59) waren die rel. DHR-Intensitäten der Proben mit Protektant signifikant geringer als jene ohne Protektant, bei der Probe mit 100 % Glucose war die rel. DHR-Intensität signifikant höher als bei der mit 50 %.

### 3.2.3.4 Dextrin

#### Zelluläre Aktivität

#### Membranintegrität



**Abb. 66: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g DNA}$  mit Dextrin als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

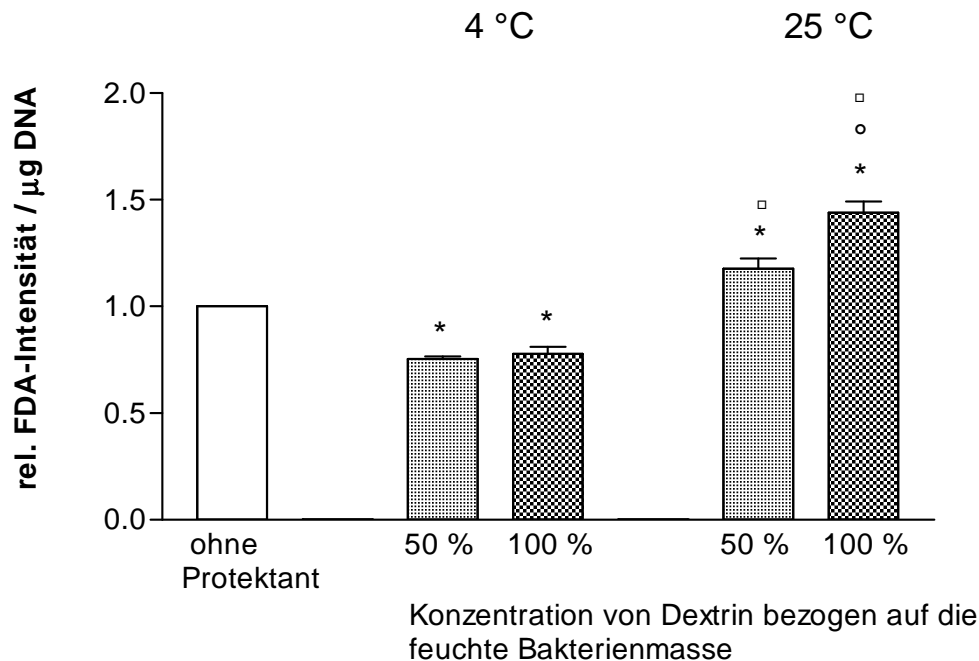
Abbildung 66 zeigt die relative Intensität von PI pro  $\mu\text{g DNA}$  mit Dextrin als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei allen Proben mit Dextrin sind die rel. PI-Intensitäten signifikant geringer als die Intensität der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Bei den bei 25 °C gelagerten Proben sind die Intensitäten geringer als die der bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 54, S. 61) waren die rel. Intensitäten der Proben beider Konzentrationen an Dextrin etwa gleich hoch und signifikant geringer als die Referenz.



## Esteraseaktivität



**Abb. 67: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g DNA}$  mit Dextrin als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

◦ signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

◻ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

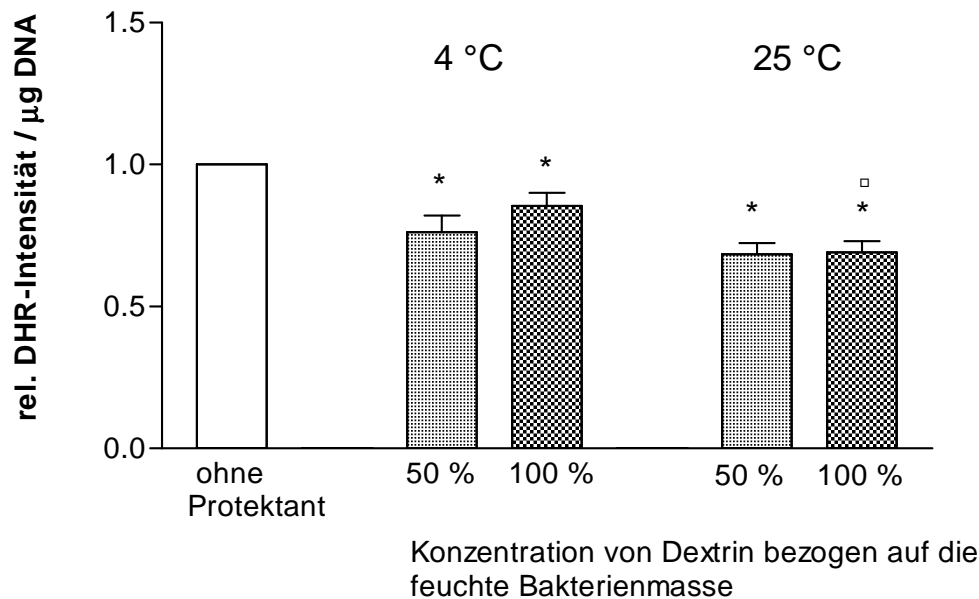
Abbildung 67 zeigt die relative Intensität von FDA pro  $\mu\text{g DNA}$  mit Dextrin als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Bei den bei 4 °C gelagerten Proben sind die rel. FDA-Intensitäten signifikant niedriger als die der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ), die rel. Intensitäten beider Konzentrationen sind etwa gleich hoch.

Bei den bei 25 °C gelagerten Proben sind die rel. Intensitäten signifikant höher als bei der Referenz ( $p < 0,001$ ). Bei der Probe mit einer Konzentration von 100 % Dextrin ist die rel. Intensität signifikant höher als bei jener mit 50 % ( $p < 0,001$ ). Die FDA-Intensitäten sind höher als die der bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 55, S. 61) waren die Intensitäten der Proben mit Protektant etwa gleich hoch und wenig geringer als die Referenz.

## Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 68: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g DNA}$  mit Dextrin als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Probe ohne Protektant

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 68 zeigt die relative Intensität von DHR pro  $\mu\text{g DNA}$  mit Dextrin als Protektant in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse nach der Lagerung bei 4 °C und 25 °C im Vergleich zur Probe ohne Protektant.

Die rel. DHR-Intensitäten sind bei allen Proben mit Protektant signifikant geringer als die Referenz ( $p < 0,001$ ).

Bei den bei 4 °C gelagerten Proben ist die Intensität der Probe mit 100 % Dextrin geringfügig höher als mit 50 %. Die Intensitäten der bei 25 °C gelagerten Proben sind etwa gleich hoch und geringer als die bei 4 °C gelagerten.

Bei den frischen Pellets (Abb. 56, S. 62) waren die rel. Intensitäten der Proben beider Konzentrationen etwa gleich hoch und signifikant geringer als bei der Probe ohne Protektant.

### 3.2.4 Versuchsreihe *L. reuteri*

In einer Versuchsreihe wurde überprüft, ob es durch wiederholten Hitzestress zur Ausbildung von Resistenzen kommt. Als Stress wurde 1 min bei 90 °C gewählt. Die nachfolgende Abbildung 69 gibt einen Überblick über die Versuchsreihe.

Der Versuch wurde über 8 Tage durchgeführt. Kultivierung, Ernte und Waschen der Bakterien erfolgte wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Bakteriensuspension wurde anschließend am Cytometer vermessen und eingestellt auf ca.  $10^8$  Partikel. Am ersten Tag wurde ein Teil der eingestellten Bakteriensuspension durch Hitze gestresst, der andere Teil nicht. Von den so erhaltenen 2 Bakteriensuspensionen wurde jeweils die zelluläre Aktivität bestimmt durch Färben mit PI, FDA und DHR und anschließender fluorimetrischer Messung (siehe Kapitel 2.2), weiters wurde jeweils die Keimzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.2). Beide Proben wurden weitergezüchtet, so dass am nächsten Tag (nach Ernte und Waschen) eine ungestresste Bakteriensuspension und eine gestresste Bakteriensuspension vorlagen. Beide Suspensionen wurden am Cytometer vermessen und eingestellt. Von diesen beiden Suspensionen wurde jeweils ein Teil gestresst, der andere blieb ungestresst. Von den so erhaltenen 4 Proben erfolgten die Bestimmungen der zellulären Aktivität und der Keimzahlen. Weitergezüchtet wurden die ungestresste Probe sowie die gestresste Probe, die erneut durch Hitze gestresst wurde. Außer an den Tagen 6 und 7, an denen die Bakterien nur weitergezüchtet wurden, wurde an allen Tagen so vorgegangen. Es wurden die Tag zu Tag Unterschiede untersucht, v.a. im Hinblick auf mögliche Resistenzbildung. Die Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt und ergab ähnliche Resultate.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden jeweils die relativen Intensitäten berechnet. Dafür wurde die gemessene Intensität der ungestressten Probe = 1 gesetzt und alle Intensitäten darauf bezogen.

Tag 1:

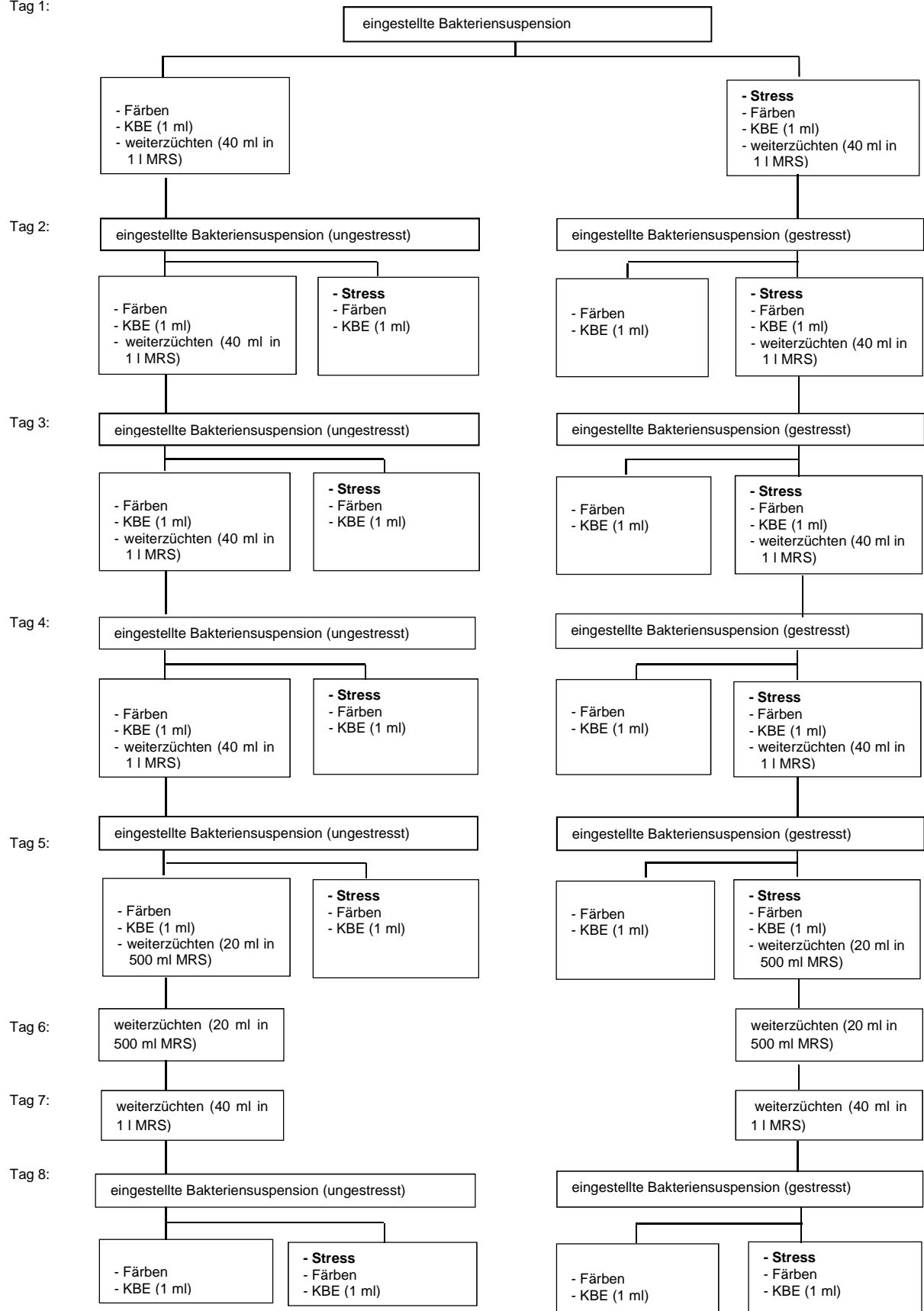
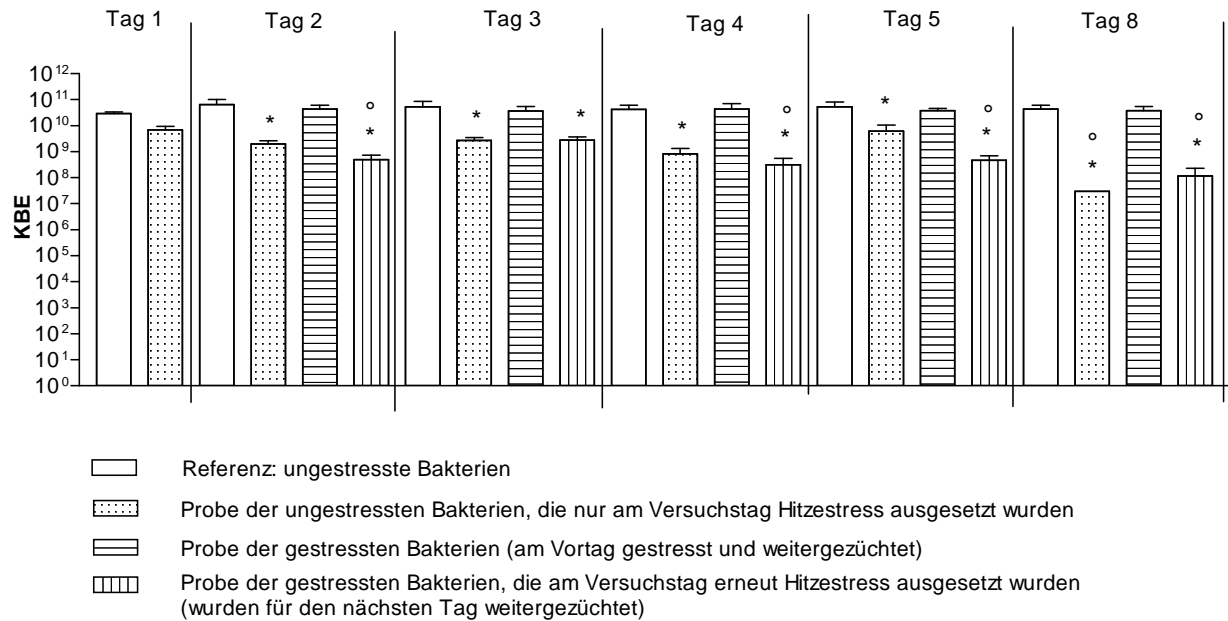


Abb. 69: Übersicht Versuchsreihe *Lactobacillus reuteri*, Streß: 90 °C, 1 min

## Keimzahlbestimmung



**Abb. 70: KBE der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90 °C im Verlauf von 8 Tagen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den ungestressten Bakterien

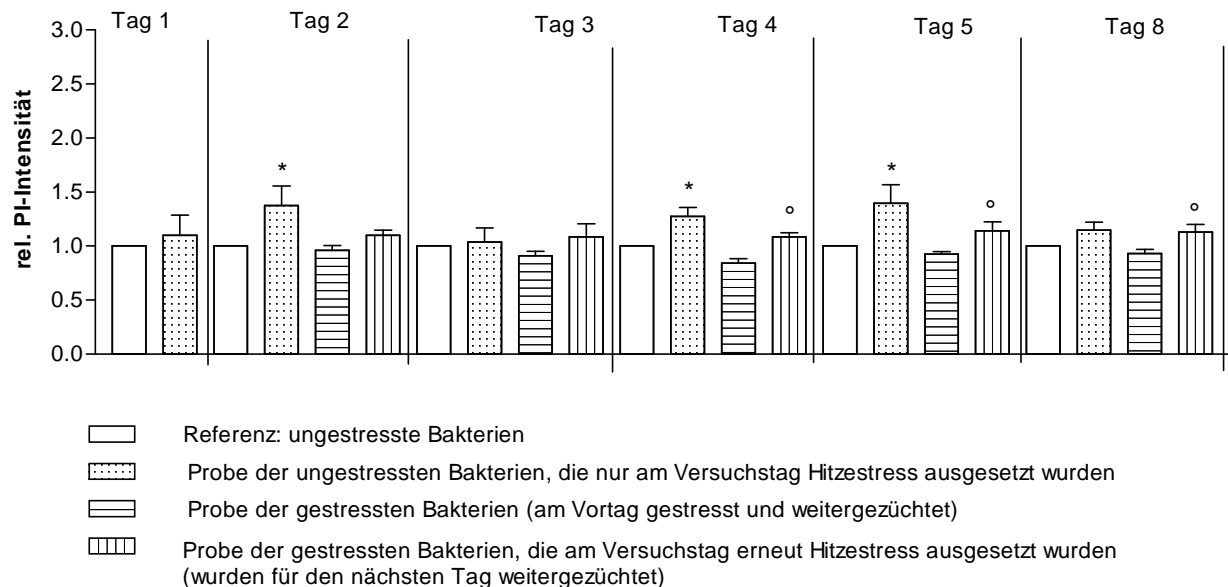
° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den gestressten Bakterien

Abbildung 70 zeigt die koloniebildenden Einheiten (KBE) der ungestressten, gestressten und jeweils erneut gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen, wobei an den Tagen 6 und 7 nur weitergezüchtet wurde.

Es ist ersichtlich, dass durch erneuten Stress die Keimzahl sinkt. Es zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den ungestressten und gestressten Proben.

## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität



**Abb. 71: Rel. PI-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90 °C im Verlauf von 8 Tagen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Referenz

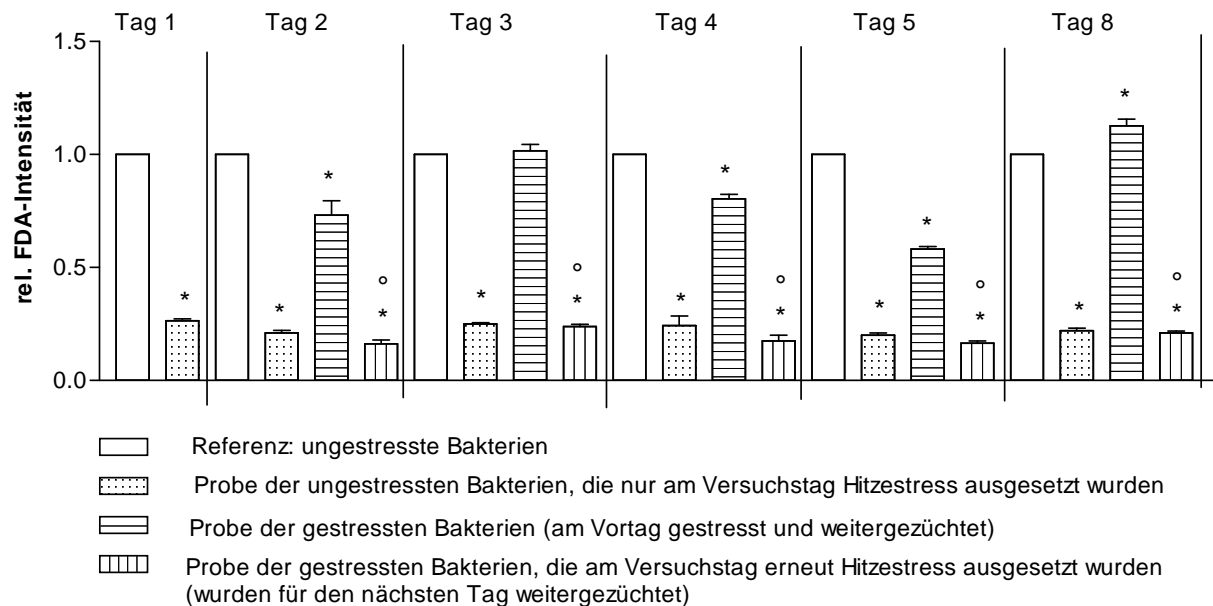
° Signifikanz ( $p < 0,05$ ) der gestressten Bakterien

Abbildung 71 zeigt die relative Intensität von PI der ungestressten, gestressten und jeweils neu gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen. An den Tagen 6 und 7 wurde nur weitergezüchtet.

Die rel. PI-Intensität steigt bei erneutem Stress, sowohl bei den ungestressten als auch den vorher gestressten Bakterien.

Die relativen Intensitäten der Proben der am Vortag gestressten Bakterien entsprechen etwa der der Referenz während der gesamten Versuchsreihe. Es zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den ungestressten und gestressten Bakterien.

## Esteraseaktivität



**Abb. 72: Rel. FDA-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90°C im Verlauf von 8 Tagen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Referenz

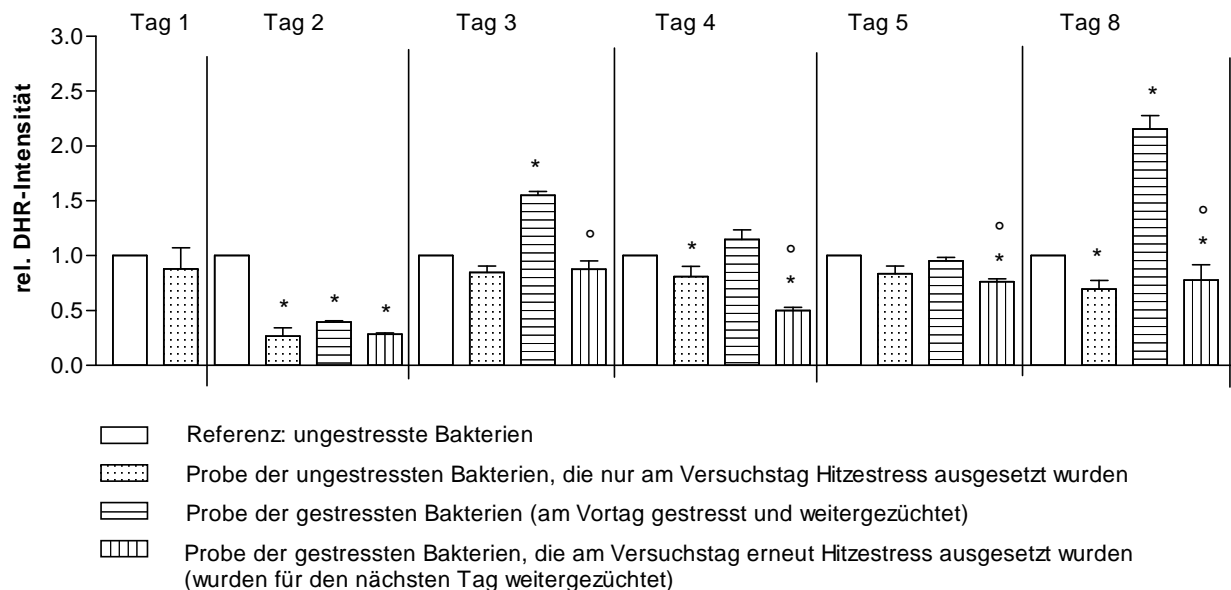
° Signifikanz ( $p < 0,05$ ) der gestressten Bakterien

Abbildung 72 zeigt die relative Intensität von FDA der ungestressten, gestressten und jeweils neu gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen. An den Tagen 6 und 7 wurde nur weitergezüchtet.

Durch Stress sinkt die rel. FDA-Intensität signifikant, sowohl bei den ungestressten als auch den vorher gestressten Bakterien. Dabei sind die rel. Intensitäten der ungestressten Proben, die am Versuchstag Hitzestress ausgesetzt wurden und die der gestressten Proben, die erneut gestresst wurden, während der 8 Tage etwa gleich hoch.

Die Intensität der Probe der am Vortag gestressten Bakterien ist an Tag 2 geringer, an Tag 3 entspricht sie etwa der Referenz, an Tag 4 und 5 ist die Intensität signifikant geringer und an Tag 8 signifikant höher als die Referenz.

## Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 73: Rel.DHR-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90 °C im Verlauf von 8 Tagen**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Referenz

° Signifikanz ( $p < 0,05$ ) der gestressten Bakterien

Abbildung 73 zeigt die relative Intensität von DHR der ungestressten, gestressten und jeweils neu gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen. An den Tagen 6 und 7 wurde nur weitergezüchtet.

Durch erneuten Stress sinkt die DHR-Intensität, sowohl bei den ungestressten als auch den vorher gestressten Bakterien.

Die rel. Intensität der Probe der am Vortag gestressten Bakterien ist an Tag 2 geringer, an Tag 3 und 8 signifikant höher und an den Tagen 4 und 5 etwa so hoch wie die der ungestressten.



### 3.2.5 Fluid-Bed-Trocknung

Die Bakterien wurden mittels Fluid-Bed-Trocknung, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, stabilisiert. Als Untersuchungsproben wurden ungestresste sowie gestresste Bakterien, die 3mal für 1 min bei 90 °C gestresst wurden, verwendet. Es sollte gezeigt werden, ob es Unterschiede zwischen den ungestressten und gestressten Bakterien gibt und weiterhin, ob die gestressten Bakterien für die Fluid-Bed-Trocknung besser geeignet sind.

Als Protektanten wurden bei den ungestressten Bakterien Saccharose, Glucose und Magermilchpulver, bei den gestressten Bakterien Saccharose jeweils in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse eingesetzt.

Nach der Trocknung erfolgte die Untersuchung der Pellets (siehe Kapitel 2.2).

Um die Proben miteinander vergleichen zu können, wurde von allen der DNA-Gehalt bestimmt und die Ergebnisse pro  $\mu\text{g}$  DNA berechnet. Es wurden die relativen Intensitäten angegeben. Dafür wurde jeweils die Intensität/ $\mu\text{g}$  DNA der ungestressten Probe ohne Protektant = 1 gesetzt und alle anderen Intensitäten darauf bezogen.

Auch hier erfolgte die Prüfung mittels Bestimmungen der Keimzahlen und der zellulären Aktivität.

### Keimzahlbestimmung

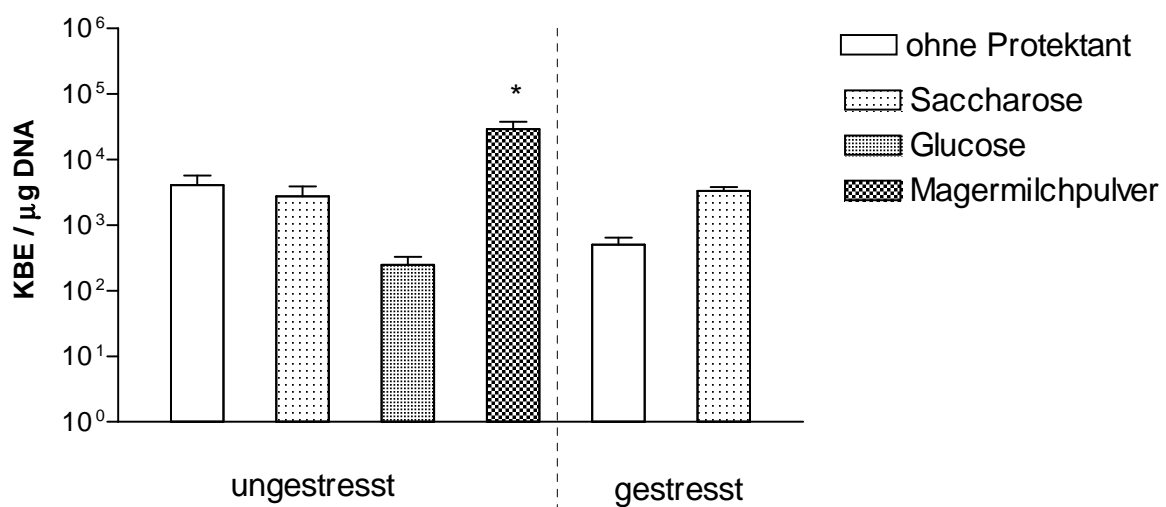


Abb. 74: KBE /  $\mu\text{g}$  DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

Abbildung 74 zeigt KBE pro  $\mu\text{g}$  DNA der ungestressten und gestressten Bakterien mit verschiedenen Protektanten.

Bei den ungestressten Bakterien wurden Saccharose, Glucose und Magermilchpulver jeweils in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse verwendet. Mit Saccharose ändert sich die Keimzahl kaum gegenüber der Probe ohne Protektant, mit Glucose sinkt die Keimzahl, mit Magermilchpulver dagegen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Keimzahl ( $p < 0,001$ ).

Bei den gestressten Bakterien wurde Saccharose in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Bakterienmasse verwendet. Mit Protektant ergibt sich eine höhere Keimzahl.

## Zelluläre Aktivität

### Membranintegrität

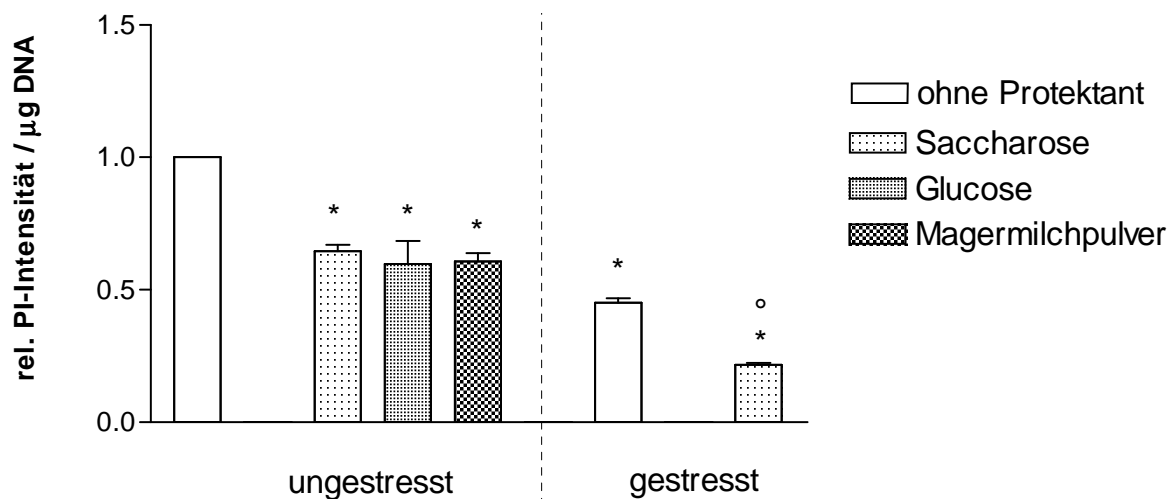


Abb. 75: Rel. PI-Intensität /  $\mu\text{g}$  DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

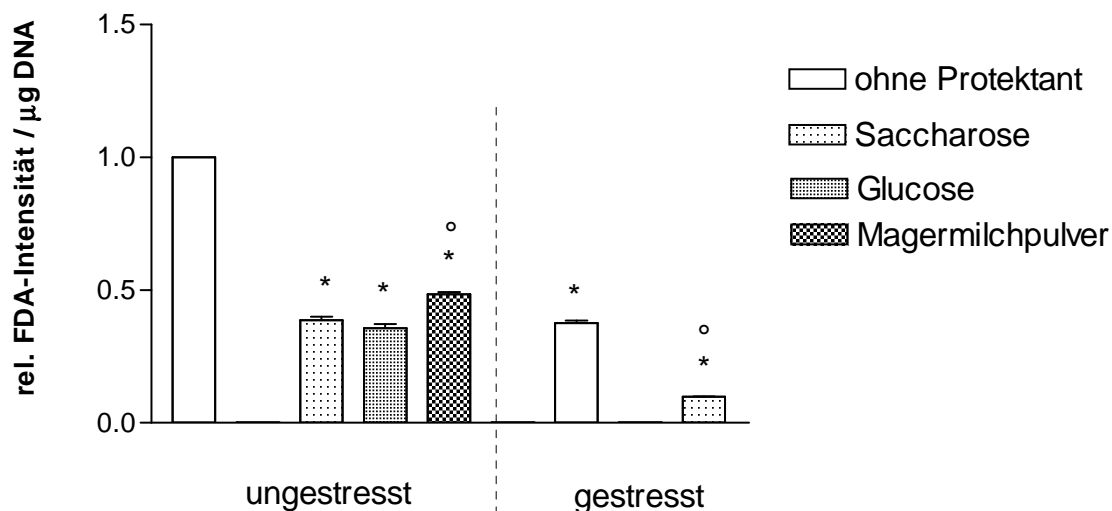
° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 75 zeigt die relative Intensität von PI pro  $\mu\text{g}$  DNA der getrockneten Bakterien mit verschiedenen Protektanten.

Bei den ungestressten Bakterien kommt es mit allen Protektanten zu einer signifikanten Abnahme der PI-Intensität, die Intensitäten sind etwa gleich hoch ( $p < 0,001$ ).

Die rel. PI-Intensität der Probe der gestressten Bakterien ohne Protektant ist signifikant geringer als die der ungestressten Bakterien. Saccharose hat einen protektiven Effekt und führt zu einer signifikanten Verringerung der rel. PI-Intensität ( $p < 0,001$ ).

### Esteraseaktivität



**Abb. 76: Rel. FDA-Intensität / µg DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten**

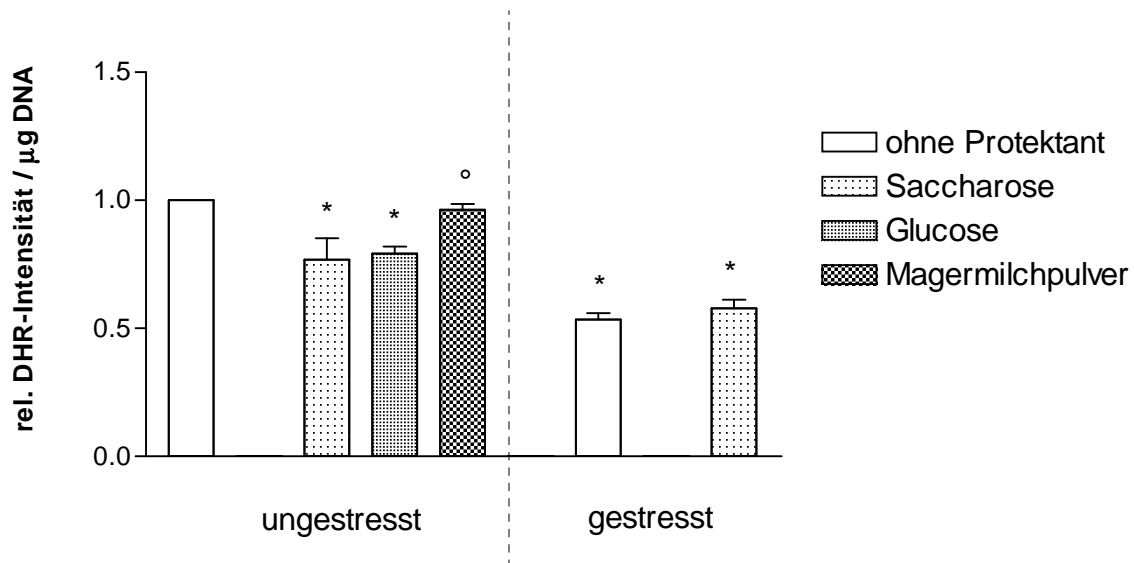
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

In Abbildung 76 ist die relative Intensität von FDA pro µg DNA der getrockneten Bakterien mit verschiedenen Protektanten dargestellt.

Bei den ungestressten Bakterien führen alle Protektanten zu signifikant geringeren FDA-Intensitäten ( $P < 0,001$ ). Dabei haben die Proben mit Saccharose und Glucose etwa die gleichen Intensitäten, bei der Probe mit Magermilchpulver ist die Intensität höher als bei den anderen. Die Intensität der gestressten Probe ohne Protektant ist signifikant geringer als die der ungestressten. Mit Saccharose sinkt die rel. FDA-Intensität ( $p < 0,001$ ).

## Wasserstoffperoxidbildung



**Abb. 77: Rel. DHR-Intensität / µg DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

Abbildung 77 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA der getrockneten Bakterien mit verschiedenen Protektanten.

Bei den ungestressten Bakterien sind die Intensitäten der Proben mit Saccharose und Glucose etwa gleich hoch und sind signifikant geringer als bei der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Mit Magermilchpulver als Protektant ist die rel. Intensität annähernd so hoch wie bei jener ohne Protektant.

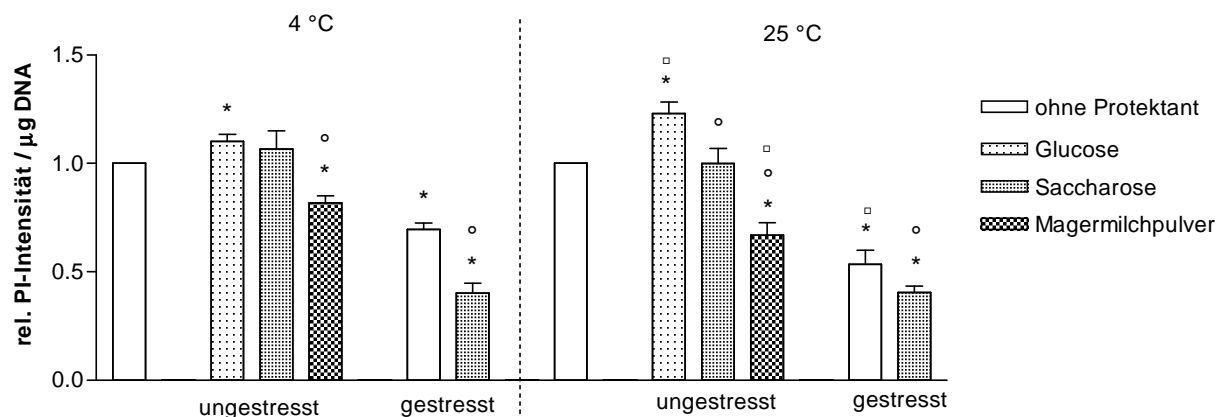
Die Intensitäten der Proben der gestressten Bakterien sind signifikant geringer als die der ungestressten. Saccharose hat kaum einen Einfluss auf die rel. DHR-Intensität.

### 3.2.6 Stabilität nach Lagerung

Nach einer Lagerzeit von ca. 5 Monaten, sowohl bei Raumtemperatur (25 °C) als auch bei 4 °C, wurden die Pellets aus Versuchsteil 3.2.5 erneut bezüglich ihrer zellulären Aktivität untersucht. Die Untersuchungen wurden einmal durchgeführt. Es konnte keine Keimzahl bestimmt werden, da falsche Verdünnungsstufen ausplattiert wurden.

### Zelluläre Aktivität

#### Membranintegrität



**Abb. 78: Rel. PI-Intensität / µg DNA nach Lagerung der Pellets bei verschiedenen Temperaturen und der Einfluss verschiedener Protektanten**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 78 zeigt die relative Intensität von PI pro µg DNA der getrockneten ungestressten und gestressten Bakterien mit verschiedenen Protektanten nach der Lagerung bei 4 °C und bei Raumtemperatur.

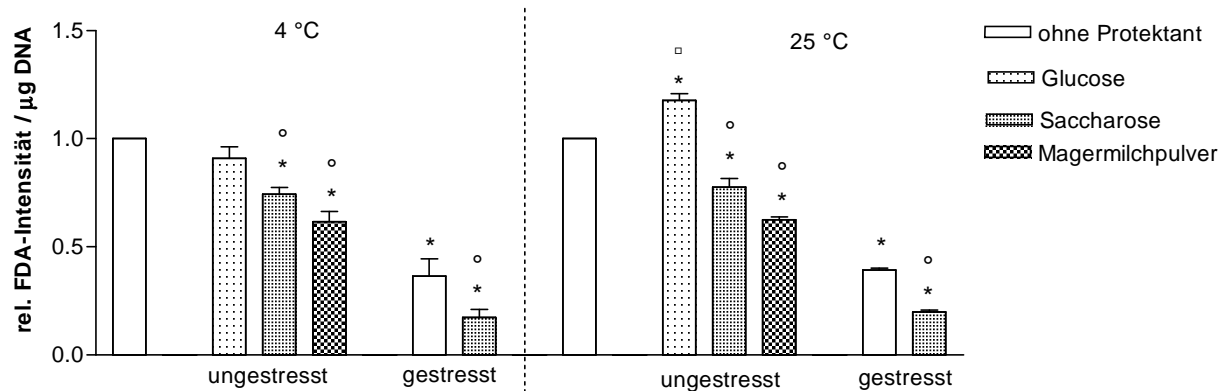
Bei 4 °C ist die rel. Intensität der ungestressten Probe mit Glucose höher als die Referenz ( $p < 0,05$ ), mit Saccharose etwa so hoch wie die Referenz, mit Magermilchpulver ergibt sich eine signifikant geringere PI-Intensität ( $p < 0,001$ ). Bei der gestressten Probe ohne Protektant ist die rel. PI-Intensität signifikant geringer als die der ungestressten. Mit Saccharose als Protektant sinkt die Intensität signifikant ( $p < 0,001$ ).

Bei der Lagerung bei Raumtemperatur zeigen sich kaum Unterschiede gegenüber der Lagerung bei 4 °C. Bei den ungestressten Proben zeigt die Probe mit Glucose

eine höhere PI-Intensität ( $p < 0,001$ ), mit Saccharose ist die Intensität etwa so hoch wie die Referenz und mit Magermilchpulver ergibt sich eine signifikant geringere rel. Intensität ( $p < 0,001$ ). Die Intensitäten der gestressten Proben sind signifikant geringer, bei der Probe mit Saccharose ist die rel. PI-Intensität geringer als ohne Protektant ( $p < 0,01$ ).

Bei den frischen Pellets dagegen (Abb.75, S.82) zeigten die ungestressten Proben mit allen Protektanten annähernd die gleichen Intensitäten und waren alle signifikant geringer als die Referenz. Bei den gestressten Proben war die Intensität der Probe ohne Protektant signifikant geringer als die der ungestressten Probe ohne Protektant, bei der Probe mit Saccharose war die rel. PI-Intensität signifikant geringer als bei der gestressten Probe ohne Protektant. Im Vergleich zu den frischen Pellets sind die Intensitäten höher.

### Esteraseaktivität



**Abb. 79: Rel. FDA-Intensität / µg DNA nach Lagerung der Pellets bei verschiedenen Temperaturen und der Einfluss verschiedener Protektanten**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 79 zeigt die relative Intensität von FDA pro µg DNA der getrockneten ungestressten und gestressten Bakterien mit verschiedenen Protektanten nach der Lagerung bei 4 °C und bei Raumtemperatur.

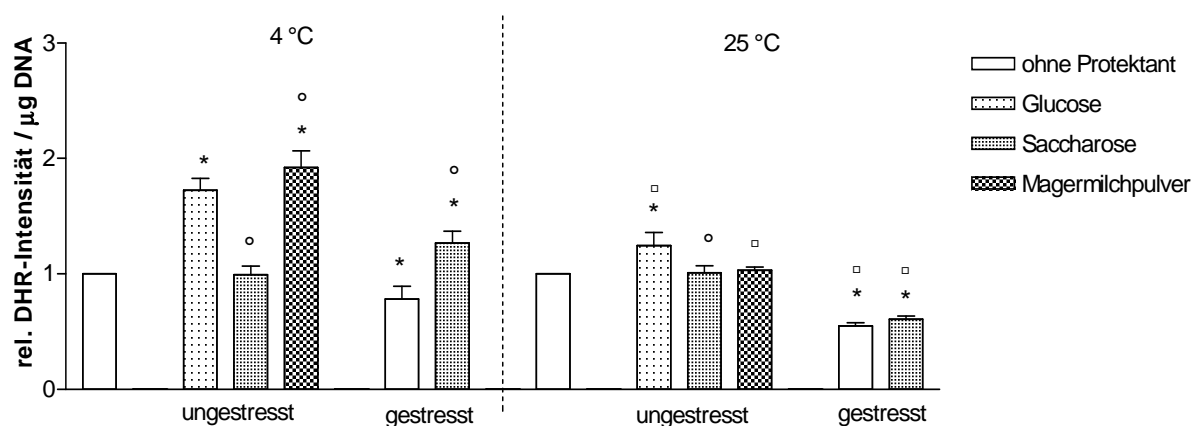
Bei den gekühlt gelagerten Proben entspricht die rel. Intensität der Probe mit Glucose etwa der der Referenz, mit Saccharose zeigt sich eine geringere Intensität ( $p < 0,001$ ) und mit Magermilchpulver ist die rel. FDA-Intensität weiter verringert

( $p < 0,001$ ). Die Intensitäten der gestressten Proben sind signifikant geringer als die Referenz, mit Saccharose als Protektant ist die rel. Intensität der Probe signifikant geringer als ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben ist die rel. Intensität der Probe mit Glucose als Protektant höher ( $p < 0,001$ ), mit Saccharose und Magermilchpulver geringer als die der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Die Intensitäten der gestressten Proben sind signifikant geringer als die Referenz, wobei die Intensität der Probe mit Saccharose niedriger ist als die der Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ). Es gibt nur einen geringfügigen Unterschied zwischen beiden Lagerungstemperaturen.

Bei den frischen Pellets (Abb. 76, S. 83) waren die rel. FDA-Intensitäten der ungestressten Proben mit Saccharose und Glucose etwa gleich hoch, mit Magermilchpulver signifikant höher, aber bei allen Proben mit dem jeweiligen Protektanten betrug die Intensität etwa die Hälfte oder weniger als die Intensität der Referenz. Die Intensitäten der gestressten Proben waren signifikant geringer als die Referenz, mit Saccharose war die Intensität am geringsten. Im Vergleich zu den frischen Pellets sind die Intensitäten nach der Lagerung höher.

### Wasserstoffperoxidbildung



**Abb.80: Rel. DHR-Intensität / µg DNA nach Lagerung der Pellets bei verschiedenen Temperaturen und der Einfluss verschiedener Protektanten**

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber der ungestressten Probe ohne Protektant

° signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem vorherigen Balken

□ Signifikanz ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Lagerungstemperaturen

Abbildung 80 zeigt die relative Intensität von DHR pro µg DNA der getrockneten ungestressten und gestressten Bakterien mit verschiedenen Protektanten nach der Lagerung bei 4 °C und bei Raumtemperatur.

Bei den bei 4 °C gelagerten Proben ist die rel. DHR-Intensität der Probe mit Saccharose als Protektant etwa so hoch wie die Referenz, die Intensitäten mit Glucose und Magermilchpulver sind signifikant höher ( $p < 0,001$ ). Die rel. Intensität der gestressten Probe ohne Protektant ist geringer als die der ungestressten Probe ( $p < 0,01$ ). Mit Saccharose als Protektant ist die rel. Intensität signifikant höher als die der gestressten Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben zeigt die ungestresste Probe mit Glucose eine höhere rel. DHR-Intensität ( $p < 0,001$ ). Die Intensitäten der Proben mit Saccharose und Magermilchpulver sind etwa gleich und entsprechen der Referenz. Die Intensitäten der gestressten Proben sind annähernd gleich und signifikant geringer als die ungestresste Probe ohne Protektant ( $p < 0,001$ ).

Hier zeigen sich größere Unterschiede zwischen beiden Lagerungstemperaturen.

Bei den frischen Pellets (Abb.77, S. 84) waren die rel. Intensitäten der ungestressten Proben mit Saccharose und Glucose annähernd gleich und signifikant geringer als die Referenz, mit Magermilchpulver etwa so hoch wie die Referenz.

Bei den gestressten Proben war die Intensität jener mit Saccharose etwa so hoch wie die Intensität der Probe ohne Protektant, beide waren signifikant geringer als die Referenz. Im Vergleich zu den frischen Pellets sind die Intensitäten nach der Lagerung höher.



## 4 Diskussion

### 4.1 *Enterococcus faecium* M74

Im ersten Teil der vorliegenden Diplomarbeit wurde überprüft, ob es durch wiederholten Hitzestress zur Ausbildung von Resistenzen kommt. Es wurde eine Versuchsreihe über 8 Tage durchgeführt, wobei an den Tagen 6 und 7 nur weitergezüchtet wurde. Als Stressbedingungen wurden 1 min bei 80 °C gewählt. Am ersten Tag wurde ein Teil der Bakteriensuspension gestresst, der andere Teil blieb ungestresst. Beide Proben wurden weitergezüchtet. Ab Versuchstag 2 lagen eine ungestresste und eine gestresste Bakteriensuspension vor. Weitergezüchtet wurde jeden Tag die ungestresste Bakteriensuspension; die gestresste Suspension wurde jeden Tag neu gestresst und dann weitergezüchtet. Am Versuchstag wurde für die Untersuchungen jeweils ein Teil beider Suspensionen Hitzestress ausgesetzt, der andere Teil nicht. Untersucht wurden jeden Tag die ungestressten, gestressten und jeweils neu gestressten Bakterien. Von allen Proben wurden täglich die Keimzahlen bestimmt sowie die zelluläre Aktivität mittels Fluorimetrie nach Färbung mit PI, FDA und DHR.

Wurden die ungestressten Bakterien Hitzestress ausgesetzt, verringerte sich die Keimzahl signifikant. Das zeigte sich an jedem Tag der Versuchsreihe. Bei den gestressten Bakterien dagegen führte erneuter Hitzestress zu einer nicht so starken Verringerung der Keimzahl. Auch an Tag 8, nachdem die Tage zuvor nur weitergezüchtet wurde, führte Hitzestress der ungestressten Bakterien zu einer stärkeren Verringerung der Keimzahl im Vergleich zu den vorher gestressten Bakterien. Betrachtet man nur die Keimzahlen, schienen die gestressten Bakterien ab dem 3. Tag toleranter gegenüber Hitzestress zu sein.

Da Propidiumiodid (PI) nicht die intakte Zellmembran passieren kann, dient die Färbung als Maß der Membranschädigung. Hier zeigte sich, dass durch Hitzestress der vorher ungestressten Bakterien die rel. PI-Intensität signifikant anstieg. Dabei war die Erhöhung der Intensität an jedem Versuchstag etwa gleich. Bei den gestressten Bakterien dagegen bewirkte ab Tag 3 erneuter Hitzestress keine weitere Membranschädigung, die rel. Intensitäten der Proben der am Vortag gestressten und am Versuchstag neu gestressten Bakterien waren etwa gleich hoch. Die Intensitäten waren signifikant geringer als die Referenz. An Tag 8 war die rel. Intensität der neu

gestressten Probe jedoch höher als alle anderen. Auch hier zeigte sich, dass die gestressten Zellen toleranter gegenüber erneutem Hitzestress wurden.

Fluoresceindiacetat (FDA) wird intrazellulär von Esterasen durch Abspaltung der Acetatreste zum fluoreszierenden Fluorescein hydrolysiert. Die Färbung dient dem Nachweis lebender Zellen mit aktivem Stoffwechsel. Eine hohe FDA-Intensität bedeutet eine hohe Enzymaktivität. Es zeigte sich, dass sich nach Hitzestress die Enzymaktivität verringerte, sowohl bei den ungestressten als auch den vorher gestressten Bakterien. An Tag 5 war die Esteraseaktivität der gestressten Bakterien stark erhöht, an Tag 8 dagegen signifikant geringer.

Dihydrorhodamin 123 (DHR) wird innerhalb der Zelle durch Redoxsysteme oder reaktive Spezies zum fluoreszierenden Rhodamin 123 oxidiert. Mit DHR wird die Wasserstoffperoxidbildung gezeigt. Nach Hitzestress verringerten sich die DHR-Intensitäten.

Anhand der vorangegangenen Untersuchungen lässt sich schließen, dass die Bakterien durch mehrmaligen Stress resistenter wurden. Allerdings ging diese Eigenschaft nach mehrfachem Umzüchten wieder verloren.

Der zweite Teil befasste sich mit der Fluid-Bed-Trocknung und dem Einfluss von Protektanten auf die Vermehrungsfähigkeit und zelluläre Aktivität von *E. faecium*. Dafür wurden ungestresste und gestresste Bakterien auf MCC-Pellets gesprüht und getrocknet. Als Protektanten wurden Magermilchpulver und Zitronensäure in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Masse an Bakterien zugesetzt. Im Anschluss an die Trocknung wurden die Bakterien untersucht. Um die Proben vergleichen zu können, wurde der DNA-Gehalt bestimmt und die Werte darauf bezogen. Zitronensäure erwies sich als ungeeignet, da die überzogenen Pellets verklebten.

Die ungestressten Proben wiesen sowohl ohne, als auch mit Protektant, etwa die gleichen Keimzahlen auf. Auch bei der gestressten Probe ohne Protektant ergab sich annähernd die gleiche Keimzahl. Mit Magermilchpulver dagegen ergab sich eine höhere Zahl der koloniebildenden Einheiten.

Die PI-Intensitäten pro  $\mu\text{g}$  DNA der gestressten Proben, sowohl ohne als auch mit Protektant, waren signifikant höher als die der ungestressten. Mit Magermilchpulver als Protektant ergab sich jeweils eine geringere PI-Intensität.

Die FDA-Intensitäten der gestressten Proben waren geringer als die der ungestressten. Mit Magermilchpulver als Protektant stieg die FDA-Intensität signifikant, sowohl bei den ungestressten als auch den gestressten Proben.

Die Färbung mit DHR lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Bei der ungestressten Probe mit Protektant war die rel. DHR-Intensität geringer als die Referenz, bei der gestressten Probe wies diejenige mit Magermilchpulver eine höhere Intensität auf.

Es lässt sich schließen, dass Magermilchpulver einen protektiven Effekt bezüglich der Vermehrungsfähigkeit und zellulären Aktivität der getrockneten Bakterien aufwies. Die gestressten Bakterien zeigten bei der Fluid-Bed-Trocknung keine verbesserten Eigenschaften gegenüber den ungestressten Bakterien.

Nach einer Lagerzeit von ca. 3 Monaten bei 4 °C wurden die getrockneten Bakterien erneut untersucht. Nach der Lagerung waren die Keimzahlen etwas geringer. Es zeigten sich höhere PI-Intensitäten im Vergleich zu den frischen Pellets. Die FDA-Intensitäten waren nach der Lagerung geringer, die DHR-Intensitäten höher als bei den frischen Pellets. Die gestressten Bakterien zeigten keine verbesserten Eigenschaften.

Die Lagerung verursachte Membranschäden und eine verringerte Enzymaktivität. Das wurde nachgewiesen durch geringere Keimzahlen, durch erhöhte PI-Intensitäten und verringerte FDA-Intensitäten. Auch wirkte Magermilchpulver nicht mehr so stark protektiv.

#### **4.2 *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730**

Als erstes wurde der Einfluss von Hitzestress auf die Vermehrungsfähigkeit und zelluläre Aktivität bestimmt. Dafür wurden die Bakterien verschiedenen Temperatur-Zeit-Intervallen ausgesetzt: 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C bei 30 s, 1 min, 90 s, 2 min, 4 min, 6min und 10 min. Die Untersuchung erfolgte durch Bestimmung der Keimzahlen sowie durch fluorimetrische Messung nach Färbung mit PI, FDA und DHR.

Mit steigender Temperatur und Dauer des Hitzestresses sanken die Keimzahlen. Bei 50 °C kam es zu keiner Änderung der KBE, bei 60 °C sank erst bei 10 min die Keimzahl signifikant, bei 70 °C bei 2 min, bei 80 °C ab 1 min und bei 90 °C sank die Keimzahl schon bei 30 s signifikant. Ab 6 min bei 90 °C wurden die Bakterien abgetötet.

Mit steigender Temperatur und Dauer des Hitzestresses stieg die PI-Intensität, d.h. desto mehr wurden die Zellen geschädigt. Bei 50 °C und 60 °C ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei 70 °C stieg die PI-Intensität signifikant ab 4 min, bei 80 °C und 90 °C bereits ab 1 min.

Bei geringeren Temperaturen stieg erst die FDA-Intensität, was auf eine erhöhte Enzymaktivität hinweist. Nach längerer Zeit bei geringeren Temperaturen bzw. schon nach kurzer Zeit bei höheren Temperaturen sank die FDA-Intensität und erreichte schließlich ein Minimum. Bei 50 °C zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, bei 60 °C sank die FDA-Intensität ab 6 min, bei 70 °C schon ab 30 s und erreichte ab 2 min das Minimum. Bei 80 °C war die Intensität bei 30 s erhöht und erreichte ab 1 min das Minimum. Bei 90 °C war die FDA-Intensität bei 30 s geringer und erreichte ab 1 min das Minimum.

Die Färbung mit DHR zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bei 50 °C kam es zu einem Anstieg der Intensität mit zunehmender Stresszeit, bei den anderen Temperaturen zu einer Verringerung der Intensität.

Als nächstes wurde der Einfluss verschiedener Protektanten bei der Fluid-Bed-Trocknung untersucht. Als Protektanten wurden Magermilchpulver, Saccharose, Glucose und Dextrin jeweils in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse an Bakterien verwendet. Es wurden die Keimzahlen sowie die zelluläre Aktivität der Zellen nach der Trocknung bestimmt. Von allen Proben wurde der DNA-Gehalt bestimmt und die Werte darauf bezogen.

Der protektive Effekt zeigte sich v.a. durch die Membranintegrität nach Färbung mit PI. Dabei zeigten die Proben aller Protektanten eine geringere PI-Intensität als die Probe ohne Protektant. Die geringsten PI-Intensitäten ergaben sich mit Glucose und Dextrin in beiden Konzentrationen, dann 100 % Saccharose und Magermilchpulver und 50 % Saccharose und Magermilchpulver.

Betrachtet man die KBE, waren die Keimzahlen der Proben mit allen Protektanten geringer als ohne Protektant. Den besten protektiven Effekt zeigten 50 % Magermilchpulver und 100 % Saccharose. Hier waren die KBE nur wenig geringer als bei der Referenz. Dann folgen 100 % Magermilchpulver, 50 % Saccharose, Dextrin in beiden Konzentrationen, 50 % Glucose und die geringste KBE ergab die Probe mit 100 % Glucose.

Mit Magermilchpulver waren die rel. FDA-Intensitäten signifikant höher als ohne Protektant. Dabei war die Intensität bei 50%iger Konzentration höher als bei 100 %. Auch mit 50 % Saccharose war die rel. FDA-Intensität höher als die Referenz, mit 100 % Saccharose dagegen geringer. Die FDA-Intensitäten der Proben mit Dextrin und Glucose waren geringer als bei der Probe ohne Protektant.

Die rel. DHR-Intensitäten waren bei allen Proben mit Protektant signifikant geringer als bei der Probe ohne Protektant. Die höchsten DHR-Intensitäten ergaben sich für die Proben mit 50% Magermilchpulver, dann 100 % Magermilchpulver, gefolgt von 50 % und 100 % Saccharose, 100 % und 50 % Glucose, die Proben mit Dextrin in beiden Konzentrationen wiesen die geringsten DHR-Intensitäten auf.

Die getrockneten Bakterien wurden bei 25 °C sowie bei 4 °C gelagert und nach ca. 5 Monaten erneut untersucht. Die Bestimmung der rel. PI-Intensität zeigte, dass die Intensitäten aller Proben mit Protektant geringer waren als die Intensität der Probe ohne Protektant. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Intensitäten der verschiedenen Konzentrationen bei der jeweiligen Lagerungstemperatur nur gering variierten. Bei den bei 4 °C gelagerten Proben waren die PI-Intensitäten höher als jene der bei Raumtemperatur gelagerten. Die geringsten Intensitäten zeigten die Proben mit Dextrin, dann Glucose, Saccharose und zuletzt Magermilchpulver.

Die rel. FDA-Intensitäten der bei 25 °C gelagerten Proben waren höher als die der bei 4 °C gelagerten. Bei Magermilchpulver waren die Intensitäten der Proben beider Lagerungstemperaturen höher als die Referenz, bei 100 % jeweils am höchsten. Bei Saccharose, Glucose und Dextrin zeigten die bei Raumtemperatur gelagerten

Proben höhere Intensitäten, die gekühlt gelagerten Proben geringere Intensitäten als die Referenz.

Die rel. DHR-Intensitäten der Proben mit Magermilchpulver waren bei 4 °C höher als die Intensität der Probe ohne Protektant, wobei die Intensität der 100%igen Konzentration am höchsten war. Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben waren die Intensitäten etwa gleich hoch und entsprachen der Referenz. Bei Saccharose war die Intensität der bei 25 °C gelagerten Probe der 100%igen Konzentration geringer, die Intensitäten aller anderen Proben waren so hoch wie die Referenz. Mit Glucose waren die Intensitäten der bei 4 °C gelagerten Proben so hoch wie die Referenz, die Intensitäten der bei Raumtemperatur gelagerten Proben geringer als die Referenz. Die Proben mit Dextrin zeigten geringere DHR-Intensitäten.

Nach den vorausgegangenen Untersuchungen, scheint die Lagerungstemperatur von 25 °C besser geeignet, da die Zellen bei dieser Temperatur geringere Membranschäden und eine höhere Enzymaktivität aufwiesen. Insgesamt führte die Lagerung zu höheren PI-Intensitäten und DHR-Intensitäten sowie zu geringeren FDA-Intensitäten im Vergleich zu frischen Pellets.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob es durch mehrmaligen Hitzestress zur Ausbildung von Resistenzen kommt. Als Stressbedingung wurde 1 min bei 90 °C gewählt. Es wurde eine Versuchsreihe über 8 Tage durchgeführt, wobei an den Tagen 6 und 7 nur weitergezüchtet wurde. Am ersten Tag wurde ein Teil der Bakteriensuspension gestresst, der andere Teil blieb ungestresst. Beide Proben wurden weitergezüchtet. Ab Versuchstag 2 lagen eine ungestresste und eine gestresste Bakteriensuspension vor. Weitergezüchtet wurde jeden Tag die ungestresste Bakteriensuspension; die gestresste Suspension wurde jeden Tag neu gestresst und dann weitergezüchtet. Am Versuchstag wurde für die Untersuchungen jeweils ein Teil beider Suspensionen Hitzestress ausgesetzt, der andere Teil nicht. Untersucht wurden jeden Tag die ungestressten, gestressten und jeweils neu gestressten Bakterien. Von allen Proben wurden täglich die Keimzahlen bestimmt sowie die zelluläre Aktivität mittels Fluorimetrie nach Färbung mit PI, FDA und DHR. Hitzestress führte zu einer Verringerung der KBE. Es zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den ungestressten und den vorher gestressten Bakterien.

Die rel. PI-Intensitäten stiegen nach dem Hitzestress, sowohl bei den ungestressten als auch den gestressten Bakterien. Bei den ungestressten Proben führte Hitzestress zu einem stärkeren Anstieg der Intensität.

Die rel. FDA-Intensitäten aller Proben verringerten sich nach erneutem Hitzestress, An Tag 8 zeigte die gestresste Probe eine erhöhte Enzymaktivität gegenüber der Referenz.

Die rel. DHR-Intensitäten sanken nach Hitzestress. Die gestressten Bakterien zeigten an den Tagen 3, 4 und 8 erhöhte DHR-Intensitäten im Vergleich zur ungestressten Probe.

Anhand der vorangegangenen Untersuchungen lässt sich schließen, dass die Bakterien bei diesen Stressbedingungen nicht resistenter wurden.

Anschließend erfolgte die Fluid-Bed-Trocknung der ungestressten und dreimal gestressten Bakterien. Bei den ungestressten Bakterien wurden Saccharose, Glucose und Magermilchpulver, bei den gestressten Bakterien Saccharose jeweils in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien als Protektanten verwendet. Von allen Proben wurde der DNA-Gehalt bestimmt und die Werte darauf bezogen.

Bei den ungestressten Proben ergab die Probe mit Magermilchpulver eine signifikant höhere Keimzahl, bei der Probe mit Glucose war die Keimzahl geringer und mit Saccharose nur wenig geringer als die KBE der ungestressten Probe ohne Protektant. Bei den gestressten Proben ergab die Probe mit Saccharose eine höhere Keimzahl gegenüber der Probe ohne Protektant.

Bei den ungestressten Proben wiesen die Proben aller Protektanten geringere PI-Intensitäten als die Referenz auf. Die Intensität der gestressten Probe ohne Protektant war geringer als die der ungestressten. Die Probe mit Saccharose hatte eine geringere Intensität.

Die rel. FDA-Intensität war bei allen Proben geringer als die Referenz. Die Intensitäten der Proben mit Protektant waren jeweils geringer als jene ohne Protektant.

Die rel. DHR-Intensitäten der gestressten Proben waren geringer als die Referenz, dabei zeigte die Probe mit Saccharose die gleiche Intensität wie jene ohne Protektant. Bei den ungestressten Proben hatte die Probe mit Magermilchpulver etwa

die gleiche Intensität wie die Referenz, die Intensitäten der Proben mit Saccharose und Glucose waren geringer.

Die gestressten Bakterien zeigen keine besseren Eigenschaften. Von den Protektanten zeigte Magermilchpulver den besten protektiven Effekt.

Nach einer Lagerung von ca. 5 Monaten bei 25 °C sowie bei 4 °C wurden die getrockneten Bakterien erneut untersucht.

Bezüglich der rel. PI-Intensität zeigten sich kaum Unterschiede zwischen beiden Lagerungstemperaturen, die Intensitäten der bei 25 °C gelagerten Proben waren etwas geringer. Im Vergleich zu den frischen Pellets waren die Intensitäten höher. Auch die rel. FDA-Intensitäten variierten kaum. Nur die bei 25 °C gelagerte Probe mit Glucose zeigte eine höhere Intensität als die Referenz, alle anderen waren geringer. Im Vergleich zu den frischen Pellets zeigten die Proben höhere FDA-Intensitäten. Bei der rel. DHR-Intensität zeigten sich größere Unterschiede. V. a. bei den gekühlt gelagerten Proben ergaben sich höhere Intensitäten. Nach der Lagerung ergaben sich höhere DHR-Intensitäten im Vergleich zu den frischen Pellets.



## 5 Zusammenfassung

Probiotika finden in zunehmendem Maße Anwendung in der Medizin und Ernährung. Die Wirksamkeit probiotischer Mikroorganismen wurde anhand zahlreicher Studien belegt. Die Herstellung und Lagerung probiotischer Zubereitungen führt meist zu Verlusten der Zellzahl und zellulären Aktivität. Daher stellt es noch immer eine Herausforderung dar, möglichst schonende Verfahren für die Herstellung zu finden und optimale Bedingungen für die Lagerung zu schaffen.

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde der Einfluss von Hitzestress auf die Viabilität probiotischer Bakterien sowie deren Resistenzbildung untersucht. Als probiotische Mikroorganismen wurden hierfür *Enterococcus faecium* M74 und *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 verwendet. Es sollte überprüft werden, ob die Bakterien durch mehrfachen Hitzestress resistenter werden gegenüber neuerlichem Hitzestress und so den bei der Wirbelschichttrocknung auftretenden Stressbedingungen besser standhalten. Weiters wurden bei der Wirbelschichttrocknung verschiedene Hilfsstoffe eingesetzt und deren protektiver Effekt überprüft. Nach einer Lagerzeit von mehreren Monaten wurden die getrockneten Bakterien erneut untersucht.

Bei den Untersuchungen wurden die Vermehrungsfähigkeit durch Auszählen der koloniebildenden Einheiten (KBE) auf Agar-Platten sowie die zelluläre Aktivität mittels Fluorimetrie nach Färben der Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt. Dabei wurde die Membranintegrität durch Färbung mit Propidiumiodid (PI), die Esteraseaktivität durch Färbung mit Fluoresceindiacetat (FDA) und die Wasserstoffperoxidbildung durch Färbung mit Dihydrorhodamin 123 (DHR) gemessen.

### *Enterococcus faecium*

In einer Versuchsreihe über mehrere Tage wurden die Bakterien mehrfach gestresst und mit ungestressten Bakterien verglichen. Als Hitzestress wurde 1 min bei 80 °C gewählt.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bakterien durch mehrfachen Hitzestress resistenter wurden. Das wurde durch eine geringere Abnahme der KBE

und einen geringeren Grad der Membranschädigung nach Hitzestress im Vergleich zu den ungestressten Bakterien nachgewiesen.

Bei der Wirbelschichttrocknung wurde Magermilchpulver in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Masse an Bakterien verwendet. Auch hier wurden die ungestressten und gestressten Bakterien miteinander verglichen.

Es hat sich gezeigt, dass die gestressten Bakterien dem Prozess der Wirbelschichttrocknung nicht besser standhalten, nachgewiesen durch eine höhere Membranschädigung und geringere Enzymaktivität gegenüber den ungestressten Bakterien. Magermilchpulver erwies sich als protektiv bei der Trocknung.

Die getrockneten Bakterien wurden nach einer Lagerung von ca. 3 Monaten bei 4 °C erneut untersucht. Nach der Lagerung waren die KBE etwas geringer, die Membranschädigung war stärker und die Enzymaktivität geringer als vorher.

#### *Lactobacillus reuteri*

Im ersten Teil wurde der Einfluss von Hitzestress untersucht. Dabei wurden die Bakterien bei verschiedenen Temperatur-Zeit-Intervallen gestresst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit steigender Temperatur und steigender Dauer des Stresses die Zellen immer stärker geschädigt wurden. Bei niedrigen Temperaturen und längerer Stresszeit bzw. bei hohen Temperaturen und schon kurzer Zeit sanken die KBE, die Membranschädigung nahm zu und die Enzymaktivität verringerte sich.

Als nächstes wurde der protektive Effekt verschiedener Hilfsstoffe bei der Wirbelschichttrocknung überprüft. Es wurden Magermilchpulver, Saccharose, Glucose und Dextrin jeweils in Konzentrationen von 50 % und 100 % bezogen auf die feuchte Masse der Bakterien eingesetzt.

Magermilchpulver und Saccharose zeigten den besten Effekt.

Die getrockneten Bakterien wurden 5 Monate bei 25 °C und bei 4 °C gelagert. Hier erwies sich die Lagerung bei Raumtemperatur günstiger.

In einer Versuchsreihe über mehrere Tage wurden die Bakterien mehrfach gestresst und mit ungestressten Bakterien verglichen. Als Hitzestress wurde 1 min bei 90 °C gewählt.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass *L. reuteri*-Keime durch mehrfachen Hitzestress nicht resistenter gegenüber neuem Hitzestress wurden.

Bei der anschließenden Wirbelschichttrocknung wurden bei den ungestressten Bakterien Saccharose, Glucose und Magermilchpulver, bei den gestressten Bakterien Saccharose jeweils in einer Konzentration von 100 % bezogen auf die feuchte Masse an Bakterien als Protektanten eingesetzt. Auch hier wurden die ungestressten und gestressten Bakterien verglichen. Die gestressten Bakterien zeigten eine stärkere Membranschädigung und eine geringere Enzymaktivität. Bei den ungestressten Bakterien zeigte Magermilchpulver den besten protektiven Effekt.

Nach einer Lagerung von 5 Monaten bei 25 °C und 4 °C wurden die getrockneten Bakterien erneut untersucht. Die bei Raumtemperatur gelagerten Proben wiesen eine geringere Membranschädigung und eine höhere Enzymaktivität auf.

Die Untersuchung des Einflusses von Hitzestress auf die Viabilität probiotischer Mikroorganismen und deren Reaktion auf Stress sowie der protektive Effekt verschiedener Hilfsstoffe ermöglicht die Optimierung der Prozesse zur Herstellung und Stabilisierung von Zubereitungen.

## 6 Abstract

In the present study the influence of heat stress on the viability of probiotic bacteria and their resistance was examined. As probiotic bacteria were used *Enterococcus faecium* M74 and *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730.

First was investigated whether the bacterial cells became more resistant by multiple heat stress. After that the bacteria were stabilized by fluid-bed-drying using different protectants to show their protective effect against the stress that occurs during drying process. After a storage period of several months the dried bacteria were examined again. For the investigations culturability and cellular activity were determined. Culturability was performed by determination of colony forming units (CFU) using plate counting method, the determination of cellular activity was performed using fluorimetry after staining with different fluorescent dyes. Membrane integrity was measured after staining with Propidium Iodide (PI), Esterase-activity after staining with Fluorescein Diacetate (FDA) and hydrogen peroxide production after staining with Dihydrorhodamine 123 (DHR).

### *Enterococcus faecium*

In a test series about several days the bacteria were stressed several times and compared to unstressed bacteria. As a heat stress it was chosen 1 min at 80 °C. The investigations have shown that the bacteria became more resistant by multiple heat stress. This was proved by a lower decrease of CFU and a lower degree of membrane damage after heat stress in comparison to unstressed bacteria. For fluid bed drying skimmed milk powder was used as a protectant in a concentration of 100 % based on the wet cell mass of bacteria and compared with unprotected cells. Skimmed milk powder showed a protective effect during drying process. Stressed bacteria showed a higher degree of membrane damage compared to unstressed cells. The dried bacteria were examined after a storage period of 3 months at 4 °C. After storage CFU and enzyme activity were lower, membrane damage was higher than before.

### *Lactobacillus reuteri*

First the influence of heat stress was examined. For this the bacteria were put under stress with different temperature time intervals. The higher the temperature and

duration of heat stress, the more the bacteria were damaged. After that, the protective effect of different excipients during fluid bed drying was investigated. Skimmed milk powder, Saccharose, Glucose and Dextrin were used in concentrations of 50 % and 100 % based on the wet cell mass of bacteria. Skimmed milk powder and Saccharose showed the best protective effect. The dry bacteria were stored at 25 °C and at 4 °C for 5 months. Here the storage at room temperature showed better results. In a test series about several days the bacteria were stressed several times and compared to unstressed bacteria. As a heat stress it was chosen 1 min at 90 °C. The investigations have shown that the bacteria did not become more resistant. After fluid bed drying stressed bacteria showed a higher degree of membrane damage compared to unstressed cells. After a storage at 25 °C and 4 °C for 5 months the dry bacteria were examined again. The samples stored at room temperature showed a lower membrane damage and a higher enzyme activity compared with the samples stored at 4 °C. After storage CFU and enzyme activity were lower, membrane damage was higher than before.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
DHR	Dihydrorhodamin 123
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
FDA	Fluoresceindiacetat
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
g/mol	Gramm pro Mol
h	Stunde
KBE	Koloniebildende Einheiten
l	Liter
<i>L. reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
MCC	Mikrokristalline Cellulose
MRS	de Man, Rogosa, Sharpe
MW	Molekulargewicht
min	Minute
mM	Millimolar
ml	Milliliter
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
PI	Propidiumiodid
s	Sekunde
U/min	Umdrehungen pro Minute

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Enterococcus faecium:

<http://www.qualityhealth.com/colds-infections-articles/7-germs-kill> (20.11.2014)

Abb. 2: Lactobacillus reuteri:

[http://www.kimchitech.co.kr/lab\\_show/Lactobacillus\\_reuteri.jpg](http://www.kimchitech.co.kr/lab_show/Lactobacillus_reuteri.jpg) (20.11.2014)

Abb. 3: Wirbelschichtanlage, Fa. Glatt, entnommen aus R. Voigt (2010)

Pharmazeutische Technologie, S. 326. Deutscher Apotheker Verlag

Abb. 4: Wurster-Verfahren:

<http://www.chemietechnik.de/bildergalerien/anzeigen/1284/5/text/112939/>  
(15.01.2015)

Abb. 5: Propidiumiodid:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p4170> (16.11.2014)

Abb. 6: Fluoresceindiacetat:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f7378> (16.11.2014)

Abb. 7: Dihydrorhodamin 123:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d1054> (16.11.2014)

Abb. 8: Übersicht Versuchsreihe *Enterococcus faecium*, Streß: 80 °C, 1 min

Abb. 9: KBE der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf von 8 Tagen  
und bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C

Abb. 10: Rel. PI-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf  
von 8 Tagen bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C

Abb. 11: Rel. FDA-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf  
von 8 Tagen bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C

Abb. 12: Rel. DHR-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien im Verlauf  
von 8 Tagen bei erneutem Stress von 1min bei 80 °C

Abb. 13: KBE pro µg DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne  
und mit Protektant

Abb. 14: Rel. Intensität von PI pro µg DNA der gestressten und ungestressten  
Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant

Abb. 15: Rel. Intensität von FDA pro µg DNA der gestressten und ungestressten  
Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant

Abb. 16: Rel. Intensität von DHR pro µg DNA der gestressten und ungestressten  
Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant

- Abb. 17: KBE pro  $\mu\text{g}$  DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C
- Abb. 18: Rel. Intensität von PI pro  $\mu\text{g}$  DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C
- Abb. 19: Rel. Intensität von FDA pro  $\mu\text{g}$  DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C
- Abb. 20: Rel. Intensität von DHR pro  $\mu\text{g}$  DNA der gestressten und ungestressten Bakterien, jeweils ohne und mit Protektant, nach einer Lagerung von 3 Monaten bei 4 °C
- Abb. 21: KBE bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 22: KBE bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 23: KBE bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 24: KBE bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 25: KBE bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 26: Rel. Intensität von PI bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 27: Rel. Intensität von PI bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 28: Rel. Intensität von PI bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 29: Rel. Intensität von PI bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 30: Rel. Intensität von PI bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 31: Rel. Intensität von FDA bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 32: Rel. Intensität von FDA bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 33: Rel. Intensität von FDA bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 34: Rel. Intensität von FDA bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses



- Abb. 35: Rel. Intensität von FDA bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 36: Rel. Intensität von DHR bei 50 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 37: Relative Intensität von DHR bei 60 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 38: Relative Intensität von DHR bei 70 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 39: Relative Intensität von DHR bei 80 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 40: Relative Intensität von DHR bei 90 °C bei unterschiedlicher Dauer des Hitzestresses
- Abb. 41: KBE /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 42: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 43: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 44: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 45: KBE /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 46: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 47: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 48: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 49: KBE /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 50: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung
- Abb. 51: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

Abb. 52: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

Abb. 53: KBE /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

Abb. 54: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

Abb. 55: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

Abb. 56: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach der Fluid-Bed-Trocknung

Abb. 57: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 58: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 59: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Magermilchpulver als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 60: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 61: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 62: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Saccharose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 63: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 64: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 65: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Glucose als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 66: Rel. Intensität von PI /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 67: Rel. Intensität von FDA /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 68: Rel. Intensität von DHR /  $\mu\text{g}$  DNA mit Dextrin als Protektant nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

- Abb. 69: Übersicht Versuchsreihe *Lactobacillus reuteri*, Streß: 90 °C, 1 min
- Abb. 70: KBE der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90 °C im Verlauf von 8 Tagen
- Abb. 71: Rel. PI-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90 °C im Verlauf von 8 Tagen
- Abb. 72: Rel. FDA-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90°C im Verlauf von 8 Tagen
- Abb. 73: Rel.DHR-Intensität der ungestressten und gestressten Bakterien und bei erneutem Stress von 1min bei 90 °C im Verlauf von 8 Tagen
- Abb. 74: KBE / µg DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten
- Abb. 75: Rel. PI-Intensität / µg DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten
- Abb. 76: Rel. FDA-Intensität / µg DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten
- Abb. 77: Rel. DHR-Intensität / µg DNA der ungestressten und gestressten Proben mit verschiedenen Protektanten
- Abb. 78: Rel. PI-Intensität / µg DNA nach Lagerung der Pellets bei verschiedenen Temperaturen und der Einfluss verschiedener Protektanten
- Abb. 79: Rel. FDA-Intensität / µg DNA nach Lagerung der Pellets bei verschiedenen Temperaturen und der Einfluss verschiedener Protektanten
- Abb. 80: Rel. DHR-Intensität / µg DNA nach Lagerung der Pellets bei verschiedenen Temperaturen und der Einfluss verschiedener Protektanten

### 7.3 Quellenverzeichnis

1. FAO/WHO (2001) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1482314/table/T1/> (12.05.2015)
3. Schulze J., Sonnenborn U., Ölschläger T., Kruis W. (2008) Probiotika – Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte. Hippokrates Verlag
4. Fuller R. (1991) Probiotics in human medicine. Gut 32 (4): 439–442
5. Goldin B. R., Gorbach S. L. (2008) Clinical indications for probiotics: an overview. Clinical Infectious Diseases; 46 (2): 96–100
6. Brown A. C., Valiere A. (2004) Probiotics and medical nutrition therapy. 7(2):56-68
7. Unger F. M., Viernstein H. (2004) Florale Gesundheit. Verlagshaus der Ärzte GmbH
8. Yan F., Polk D. B. (2006) Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care; 9 (6): 717–721
9. Doron S. I., Hibberd P. L., Gorbach S. L. (2008) Probiotics for prevention of antibiotic-associated diarrhea. Journal of Clinical Gastroenterology; 42 (2): 58–63
10. Mach T. (2006) Clinical usefulness of probiotics against chronic inflammatory bowel diseases. Journal of Physiology and Pharmacology; 57 (9): 23–33
11. Hamilton-Miller J. M. (2003) The role of probiotics in the treatment and prevention of Helicobacter pylori infection. International Journal of Antimicrobial Agents; 22 (4): 360–366
12. Reid G. (2008) Probiotic Lactobacilli for urogenital health in women. Journal of Clinical Gastroenterology; 42 (3): 234–236
13. Borges S., Silva J., Teixeira P. (2014) The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. Archives of Gynecology and Obstetrics; 289 (3): 479–489

14. Näse L., Hatakka K., Savilahti E., Saxelin M., Pönkä A., Poussa T., Korpela R., Meurman J. H. (2001) Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Research*; 35 (6): 412–420
15. Vanderhoof J. A. (2008) Probiotics in allergy management. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 47 (2): 38–40
16. Majamaa H., Isolauri E. (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 99 (2):179–185
17. de Vrese M., Stegelmann A., Richter B., Fenselau S., Laue C., Schrezenmeir J. (2001) Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*; 73 (2): 421-429
18. Tsai Y. T., Cheng P. C., Pan T. M. (2012) The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 96(4): 853-862
19. Lehtoranta L., Pitkäranta A., Korpela R. (2014) Probiotics in respiratory virus infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*; 33 (8): 1289-1302
20. Kumar M., Nagpal R., Kumar R., Hemalatha R., Verma V., Kumar A., Chakraborty C., Singh B., Marotta F., Jain S., Yadav H. (2012) Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*
21. Kiessling G., Schneider J., Jahreis G. (2002) Long term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *European Journal of Clinical Nutrition*; 56 (9): 843–849
22. Khaledi S., Sun J., Buys N., Jayasinghe R. (2014) Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*; 64 (4): 897-903
23. Ettinger G., MacDonald K., Reid G., Burton JP. (2014) The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes*; 5 (6): 719-728
24. Ebel B., Lemetais G., Beney L., Cachon R., Sokol H., Langella P., Gervais P. (2014) Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54 (2): 175-189

25. Zhong L., Zhang X., Covasa M. (2014) Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*; 20 (24): 7878-7886
26. Burns A. J., Rowland I. R. (2000) Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*; 1(1): 13-24
27. [http://de.wikipedia.org/wiki/Enterococcus\\_faecium](http://de.wikipedia.org/wiki/Enterococcus_faecium) (20.11.2014)
28. Blaschek W., Hänsel R., Keller K., Reichling J., Rimpler H., Schneider G. (1998) *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Drogen A-K, Folgeband 2*, 597-606. Springer Verlag
29. Mutters N. T., Mersch-Sundermann V., Mutters R., Brandt C., Schneider-Brachert W., Frank U. (2013) Kontrolle von Vancomycin-resistenten Enterokokken im Krankenhaus: Epidemiologischer Hintergrund und klinische Relevanz. *Deutsches Ärzteblatt*; 110 (43): 725-731
30. <http://de.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus> (20.11.2014)
31. Blaschek W., Hänsel R., Keller K., Reichling J., Rimpler H., Schneider G. (1998) *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Drogen L-Z, Folgeband 3*, 1-14. Springer Verlag
32. Cleusix V., Lacroix C., Vollenweider S., Duboux M., Le Blay G. (2007) Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology*; 7: 101
33. Liu X. T., Hou C. L., Zhang J., Zeng X. F., Qiao S. Y. (2014) Fermentation conditions influence the fatty acid composition of the membranes of *Lactobacillus reuteri* I5007 and its survival following freeze-drying. *Letters in Applied Microbiology*; 59 (4): 398-403
34. Santivarangkna C., Higl B., Foerst P. (2008) Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures. *Food Microbiology*; 25 (3): 429-441
35. Prasad J., Mc Jarrow P., Gopal P. (2003) Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Applied and Environmental Microbiology*; 69 (2): 917-925
36. <http://de.wikipedia.org/wiki/Gefriertrocknung> (15.01.2015)
37. <http://de.wikipedia.org/wiki/Sprühtrocknung> (15.01.2015)
38. <http://www.glatt.com/de/verfahren/> (15.01.2015)
39. <http://de.wikipedia.org/wiki/Durchflussszytometrie> (15.01.2015)

40. <http://www.bio-rad.com/de-de/product/instagene-matrix> (20.04.2015)
41. <http://www.pierce.ctc.edu/staff/rmay/BIOL201/PCRInformation.html>  
(20.04.2015)
42. <http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzspektroskopie> (15.01.2015)
43. <http://www.enzolifesciences.com/ENZ-52403/propidium-iodide-ultra-pure/>  
(16.01.2015)
44. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/F1303> (16.01.2015)
45. <http://www.enzolifesciences.com/ENZ-52302/dihydrorhodamine-123-ultra-pure/>  
(16.01.2015)

## **8 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Birgit Maazouz, geb. Heinrich

Geburtsdatum: 27.04.1980

Geburtsort: Görlitz

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: Deutschland

### **Schulbildung**

1992-1998 Städtisches Gymnasium Rothenburg

Abschluss: Abitur

### **Ausbildung**

1998-2001 Berufsfachschule für Wirtschaft und Soziales Görlitz

Abschluss: Staatlich geprüfte kaufmännische Assistentin

### **Studium**

2001-2007 Pharmaziestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Seit 2008 Pharmaziestudium an der Universität Wien

### **Berufserfahrung**

2002-2007 Aushilfe in der Mohren-Apotheke, Halle/Saale