

Separation von Starterkulturen nach Hochdruck-Homogenisierung

Florian Häffele^{1,*}, Doris Jaros², Susann Mende², Harald Rohm² und Hermann Nirschl¹

Die Auswirkungen einer mittels Hochdruck Homogenisator induzierten Scherbehandlung auf die Separationseigenschaften von Exopolysaccharid bildenden bakteriellen Starterkulturen wird untersucht. Neben Änderungen seitens der Medienviskosität und der Sinkgeschwindigkeit der Bakterienzellen konnten auch deutliche Unterschiede bei der Kompaktheit des Sediments festgestellt werden. Zusätzlich wird die Skalierbarkeit der im Labor mittels analytischer Zentrifugation gewonnenen Ergebnisse in den Technikums Maßstab mit einem Tellerseparator gezeigt.

Schlagwörter: Exopolysaccharide, Scale up, Scherbehandlung, Separation

Separation of Starter Cultures After High-Pressure Homogenization

The present work demonstrates how shearing through a high pressure homogenizer affects the separation properties of exopolysaccharide producing bacterial starter cultures. In addition to changes in medium viscosity and sedimentation velocity significant differences in the compactness of the cell sediment were observed. The scalability of the laboratory results obtained through analytical centrifugation in larger scale using a stack disc separator is also demonstrated.

Keywords: Exopolysaccharides, Scale up, Separation, Shear treatment

1 Einleitung

Viele bei der Lebensmittelherstellung als Starterkulturen eingesetzte Milchsäurebakterien sind in der Lage, extrazelluläre Polysaccharide (EPS) zu synthetisieren. In Zusammenhang mit fermentierten Milchprodukten (z. B. Joghurt, Quark, Frischkäse) sind vor allem Stämme von Interesse, die Heteropolysaccharide bilden. Diese bestehen aus zu meist 2-5 Bausteinen in sich wiederholender Sequenz, weisen Molekülmassen von ca. 10^6 Da auf und sind aufgrund ihrer molekularen Struktur in der Lage, auch in relativ geringen Mengen von 100 mg kg^{-1} signifikanten Einfluss auf Produkteigenschaften wie Viskosität oder Bereitschaft zur Synerese zu nehmen. Die auftretenden Effekte sind unter anderem auch davon abhängig, ob die EPS nach der Synthese an der Zellwand verbleiben, oder in das umgebende Medium abgegeben werden; die dafür üblichen Bezeichnungen sind *kapsuläre EPS* (cEPS) und *freie EPS* (fEPS) [1, 2].

Bei der Herstellung von Starterkulturen wird versucht, durch Optimierung von Umgebungsgrößen wie pH, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit und Nährstoffangebot möglichst hohe Zelldichten zu erreichen. Anschließend müssen die Zellen ohne Beeinflussung ihrer Vitalität vom Medium abgetrennt und aufkonzentriert werden, um letztlich in eine

vermarktungsfähige Form (z. B. als gefrostete Pellets oder gefriergetrocknet) überführt zu werden. Da die EPS Synthese jedoch wachstumsassoziiert ist und nicht unterdrückt werden kann [3, 4], steht die viskositätserhöhende Wirkung besonders von fEPS einer effektiven Auslegung des Separationsschrittes entgegen.

Diese Arbeit berichtet über Versuche zur Hochdruck Homogenisation von Fermentationsmedien mit Starterkulturen mit dem Ziel, den Separationsprozess positiv im Sinne einer besseren Abtrennbarkeit der Zellen zu beeinflussen.

¹Florian Häffele, Prof. Hermann Nirschl

florian.haeffele@kit.edu

Karlsruher Institut für Technologie, Institut für mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, Straße am Forum 8, 76131 Karlsruhe, Deutschland.

²Dr. Doris Jaros, Dr. Ing. Susann Mende, Prof. Harald Rohm

Technische Universität Dresden, Professur für Lebensmitteltechnik, Bergstraße 120, 01069 Dresden, Deutschland.

2 Experimentelles

Fermentationsmedien aus der industriellen Herstellung von sechs *Streptococcus thermophilus* Einzelstämmen wurden von Chr. Hansen A/S (Hørsholm, DK) zur Verfügung gestellt. Der Gesamt EPS Gehalt in den Medien lag zwischen 412 ± 27 und $1341 \pm 145 \text{ mg kg}^{-1}$; Stämme ST D und ST E produzierten nur freie EPS, alle anderen Stämme auch kapsuläre EPS [5].

Für die Hochdruck Homogenisation der Fermentationsmedien wurde ein EmulsiFlex C5 (Avestin Inc., Ottawa, CA) eingesetzt. Der Homogenisierungseffekt wird dabei durch Querschnittsverengung beim Durchströmen einer Lochblende unter Druck erzielt. Die Behandlung erfolgte bei Raumtemperatur und Drücken von 2 MPa, 4 MPa, $2 \times 2 \text{ MPa}$, $2 \times 4 \text{ MPa}$ oder $2 + 4 \text{ MPa}$. Die unterschiedlichen Homogenisierungsdrücke konnten durch variierende Versorgungsdruücke am Homogenisator (0,2, 0,6 MPa) und den Einsatz unterschiedlicher Blenden (0,1 mm und 0,2 mm Durchmesser) realisiert werden. Nach Wengeler et al. [6] entspricht der erfolgte Energieeintrag in J mL^{-1} direkt dem Homogenisierungsdruck.

Die Zahl der Zellen pro Zellkette und das Vorhandensein von kapsulären EPS wurde vor und nach der Homogenisierung durch Tuschefärbung [7] und einen in ImageJ (<https://fiji.sc>) programmierten Algorithmus nach Auszählung von mindestens 200 Zellketten ermittelt. Die Bestimmung der Viskosität der Medien erfolgte mit einem magnetgelagerten AR G2 Rheometer mit Doppelspaltgeometrie (TA Instruments GmbH, Eschborn; Dreifachbestimmung) durch Aufzeichnung einer schergeschwindigkeitsgesteuerten Fließkurve. Die Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit wurde mithilfe einer optischen analytischen Zentrifuge (LUM GmbH, Berlin) durchgeführt. Für die Aufnahme der zeit- und orts aufgelösten Sedimentationsprofile bei 3600 U min^{-1} ($= 1720 \text{ g}$) wurden die jeweiligen Proben mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis von 1:2 verdünnt. Die Bestimmung des Anteils an lebenden Zellen erfolgte unter Verwendung eines CyFlowCube 6 (Sysmex Partec GmbH, Görlitz) Durchfluss

zytometers nach lebend/tot Doppelfärbung mit Propidiumiodid und Carboxyfluoresceindiacetat [8].

3 Versuchsergebnisse

In Tab.1 sind die Veränderungen von Zellkettenlänge und scheinbarer Viskosität bei einer Schergeschwindigkeit von 10 s^{-1} für alle untersuchten Stämme nach einem Homogenisierungsdruck von 4 MPa und im Vergleich zur Scherbehandlung mit einem Zahnkranzdispargiergerät (24000 U min^{-1} für 2 min, [5]) zusammengefasst. Es ist deutlich erkennbar, dass trotz des um mindestens zwei Größenordnungen geringeren Energieeintrags im Hochdruck Homogenisator die scherinduzierten Veränderungen in einem ähnlichen Bereich liegen. Abb.1 zeigt dies am Beispiel eines *S. thermophilus* Stammes, der cEPS bildet (ST C), sowie eines Stammes, der nur freie EPS synthetisiert

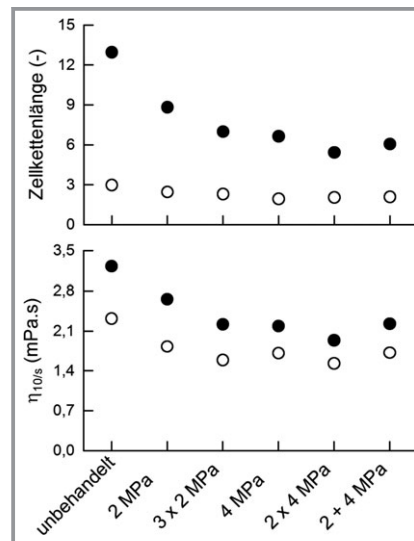


Abbildung 1. Veränderung der Kettenlänge und Medienviskosität als Funktion der Homogenisierungsbedingungen. ○, ST C; ●, ST D.

Tabelle 1. x_{90} der Kokkenzahl pro Zellkette und der scheinbaren Viskosität ($\eta_{10/s}$) nach dem Scheren mit dem Ultra Turrax bzw. Homogenisieren bei 4 MPa.

Stamm	x_{90} Kokken je Zellkette []			$\eta_{10/s}$ [mPa.s]		
	unbehandelt	24 000 U min ⁻¹	4 MPa	unbehandelt	24 000 U min ⁻¹	4 MPa
ST C	2,99	2,77	1,95	2,32	1,60	1,71
ST D	12,96	5,89	6,65	3,23	2,02	2,19
ST E	3,19	2,94	1,70	2,85	1,75	2,01
ST G	4,51	3,78	2,73	1,96	1,77	1,79
ST H	4,75	3,48	2,50	1,83	1,70	1,72
ST I	2,59	2,35	2,28	1,91	1,53	1,70

(ST D). ST D zeichnet sich durch besonders lange Zellverbände sowie durch stark viskositätswirksame freie Exopolysaccharide aus. Bei allen Stämmen ist der nach der Homogenisierung ermittelte Anteil an lebenden Zellen größer als 90 %.

In Abb. 2 ist zusammenfassend dargestellt, wie sich der beim Homogenisieren der Starterkulturen eingesetzte Druck auf die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit v_{SED} auswirkt, und wie diese mit der mittleren Zellkettenlänge und der Medienviskosität in Zusammenhang steht. Für den nur fEPS bildenden Stamm ST D nehmen alle genannten Größen mit zunehmender Beanspruchungsintensität deutlich ab, für ST E ist der Einfluss auf v_{SED} hingegen vernachlässigbar. Im Fall von ST C, ST G, ST H und ST I nimmt die Sedimentationsgeschwindigkeit mit steigender Scherbeanspruchung zu.

Abb. 3 zeigt im Detail den Einfluss der Scherbeanspruchung auf die Sedimentationsgeschwindigkeitsverteilungen von ST C und ST D. Für ST C, der kapsuläre EPS bildet, ist eine deutliche Verschiebung der Verteilungsfunktion zu höheren Sedimentationsgeschwindigkeiten feststellbar. Die Erhöhung von v_{SED} ist als Folge der Abscherung der kapsulären EPS Schicht, die auch durch mikroskopische Aufnahmen bestätigt wurde [9], zu interpretieren. Aufgrund der hohen Wasserbindungskapazität der EPS könnte diese Schicht als eine Art Bremsbelag fungieren und daher zu einer Reduktion der Sedimentationsgeschwindigkeit führen. Durch die Scherbeanspruchung kann eine Steigerung der mittleren Sedimentationsgeschwindigkeit von etwa $85 \mu\text{m s}^{-1}$ (Verteilungsdichtewert: 1,5) auf ca. $110 \mu\text{m s}^{-1}$ (Verteilungsdichtewert: 2,0) erreicht werden. Im Vergleich dazu betrug die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit nach Scherung mit einem Zahnkranzdispersierer (2 min bei $24\,000 \text{ U min}^{-1}$) ca. $140 \mu\text{m s}^{-1}$ (Verteilungsdichtewert: 2,3). Dieser höhere Wert lässt sich durch unterschiedliche Produktchargen erklä-

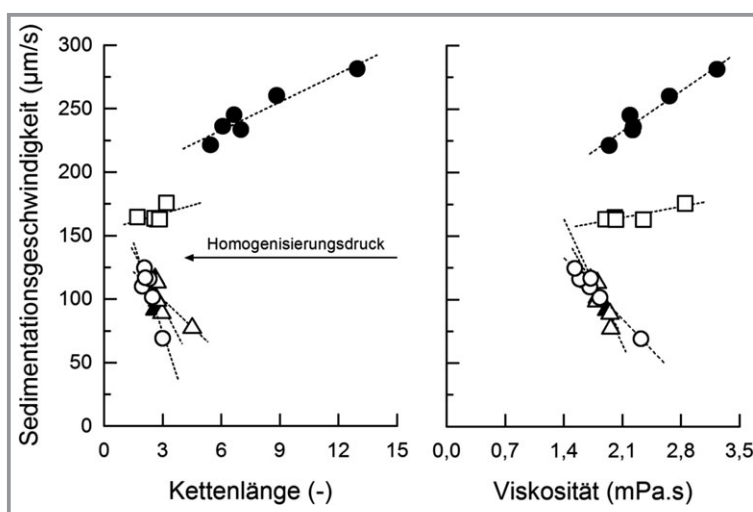


Abbildung 2. Abhängigkeit der Sedimentationsgeschwindigkeit der *S. thermophilus* Zellen von Kettenlänge (x_{90} Wert) und scheinbarer Viskosität (Scher geschwindigkeit: 10 s^{-1}). ○, ST C; ●, ST D; □, ST E; △, ST G; ▲, ST I.

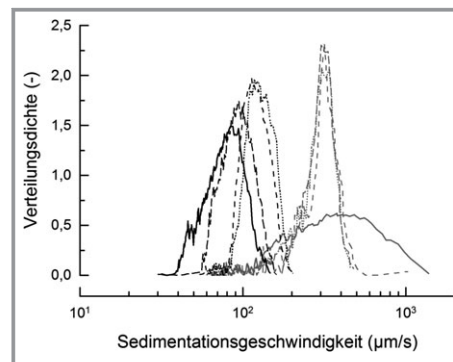


Abbildung 3. Sinkgeschwindigkeitsverteilungen der ungescherten (durchgezogene Linie) Fermentationsmedien mit ST C (kapsuläre EPS, schwarz) und ST D (freie viskositätsrelevante EPS, grau) und nach Scherung bei 2 MPa (lange Striche), 4 MPa (kurze Striche) und 6 MPa (gepunktet).

ren, da die ungescherte Probe bei den Versuchen mit dem Zahnkranzdispersierer im Vergleich zu den Versuchen mit dem Homogenisator längere Zellketten aufwies. Für ST D, der stark viskositätswirksame freie EPS bildet, sinkt aufgrund der Zellkettenzerstörung die mittlere Sedimentationsgeschwindigkeit von anfänglich $400 \mu\text{m s}^{-1}$ auf etwa $300 \mu\text{m s}^{-1}$. Gleichzeitig nimmt auch die Verteilungsbreite stark ab und der Maximalwert der Verteilungsdichte dementsprechend von etwa 0,6 auf ca. 2,4 zu.

In abschließenden Zentrifugationsversuchen mit einem Pathfinder 1 Tellerseparator (GEA Westfalia GmbH; Oelde) wurde über Variation des Feedvolumenstroms ermittelt, welchen Einfluss die Separationsgeschwindigkeit der Bakterienzellen auf die Trübung im Überlauf, die direkt von der Zahl der nicht abgeschiedenen Zellen abhängt, hat. Da der Volumenstrom die Verweilzeit der Zellen im Separator bestimmt, wird die Trübung direkt durch die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen beeinflusst. Folglich ist eine hohe Trübung gleichbedeutend mit einer kurzen Verweildauer (also einem hohen Volumenstrom) oder einer geringen Sinkgeschwindigkeit der Zellen. Bei allen Stämmen stieg die Trübung mit zunehmendem Volumenstrom exponentiell an, was durch die kürzere Verweilzeit der Zellen im Separator zu erwarten war. Bei ST E (bildet fEPS) ist nach der Scherbeanspruchung eine leichte Verschiebung zu geringeren Trübungswerten zu erkennen (Abb. 4). Dies bedeutet, dass die Sinkgeschwindigkeit der Zellen geringfügig gesteigert werden konnte. Da ST E keine kapsulären EPS produziert, kann dieser Anstieg nur durch Änderungen der Viskosität des umgebenden Fermentationsmediums erklärt werden. Es war dabei ein Absinken der Viskosität durch die Scherbeanspruchung um bis zu 40 % zu beobachten. Die geringeren Trübungswerte bei ST C (kapsuläre EPS) waren hingegen wesentlich deutlicher ausgeprägt, so dass

hier etwa der doppelte Volumenstrom nach der Scherbeanspruchung gefahren werden konnte, ohne an den vorher festgelegten Grenzwert der Trübung (0,5) zu gelangen. Dieser sehr deutliche Effekt kann auf das erfolgreiche Abscheren der kapsulären EPS zurückgeführt werden.

Ebenfalls untersucht wurden die Eigenschaften des Partikelsediments durch Beobachtung der Trübung bei konstantem Volumenstrom. Mit zunehmender Versuchsdauer nimmt der Feststoff Füllgrad des Separators zu, bis er schließlich seine maximale Füllmenge erreicht. Dieser Punkt wird in Abb. 4 als erreicht gewertet, sobald die Überlauftrübung >0,5 beträgt. Im Fall von ungeschertem Medium mit ST C ist der Separator bereits nach ca. 80 min voll, während nach Scherung bei 8 MPa Druck bei ansonsten identischen Parametern der Separator bis zu etwa 150 min betrieben werden kann. Dies bedeutet, dass durch die Scherung ein doppelt so dichtes Sediment erreicht wurde.

Ebenfalls erkennbar ist die stark unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit anhand der deutlichen Trübungsunterschiede zwischen den beiden Proben. Die wesentlich geringere Trübung der gescherten Probe spricht für die höhere Sinkgeschwindigkeit der Zellen und daher für die erfolgreiche Abscherung der kapsulären EPS. Der Unterschied ist für ST E nicht so deutlich ausgeprägt und auf den Verlust größerer Zellaggregate bei der Scherung mit dem Homogenisator zurückzuführen. Auffällig ist allerdings die deutlich längere Versuchsdauer bei ST E (bis zu ca. 260 min). Somit kann durch die Scherbeanspruchung die Sedimenthöhe des cEPS bildenden Stammes ST C um bis zu 50 % reduziert werden. Vergleicht man die ungescherten Medien der beiden Stämme, so fällt auf, dass die Versuchslänge bei ST C (78 min) nur 30 % der Versuchslänge von ST E (260 min) beträgt. Folglich bildet der fEPS bildende Stamm ST E ein deutlich kompakteres Sediment als der cEPS bildende ST C. Diese Verhältniswerte konnten auch in den Laborversuchen bestätigt werden [9].

4 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Scherbeanspruchung der Starterkulturen drei wesentliche Effekte auf die Sedimentationsgeschwindigkeit der Bakterienzellen hat:

- 1) Erhöhung der Sedimentationsgeschwindigkeit durch Abscheren der bremsenden EPS Schicht von der Zellwand,
- 2) Senkung der Medienviskosität, was ebenfalls zu einem Anstieg der Sedimentationsgeschwindigkeit führt, und
- 3) Verkürzung von Zellketten, was aufgrund der kleineren Partikelgrößen zu niedrigeren Sedimentationsgeschwindigkeiten führt.

Weiterhin konnte eine Verdichtung des Sediments der Bakterienkulturen um bis zu 50 % durch die Scherbeanspruchung beobachtet werden. Versuche am Tellerseparator bestätigen die Skalierbarkeit der im Labormaßstab gewonnenen Ergebnisse.

Das IGF Vorhaben 18605 BG der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert. Unser Dank geht auch an Chr. Hansen A/S für die Bereitstellung der Starterkulturen und an das Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik, Bereich Lebensmittelverfahrenstechnik, des Karlsruher Instituts für Technologie für die Bereitstellung des Hochdruck Homogenisators und die Ermöglichung der Versuche im Technikum des Instituts.

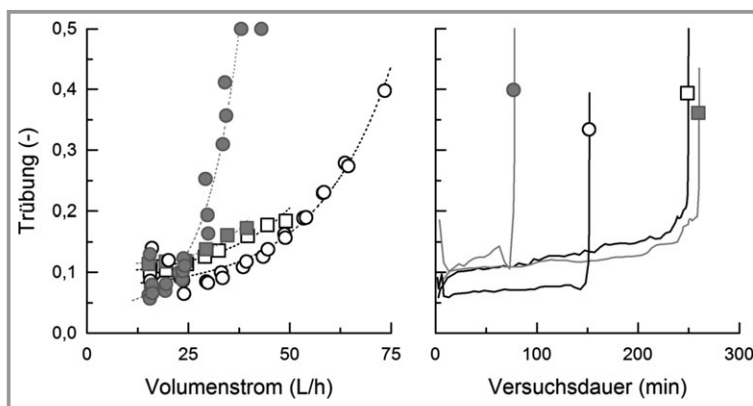


Abbildung 4. Abhängigkeit der Überlauftrübung vom Feedvolumenstrom im Tellerseparator (links) und Abhängigkeit der Überlauftrübung von der Versuchsdauer bzw. dem Feststoffgehalt im Tellerseparator (rechts). cEPS produzierender Stamm ST C (Kreissymbole) und freie viskositätsrelevante EPS produzierender Stamm ST E (Quadrat) in ungeschertem (grau) und bei 8 MPa geschertem Zustand (schwarz).

Formelzeichen

v_{SED}	$[\mu\text{m s}^{-1}]$	Sedimentationsgeschwindigkeit
x_{90}	[]	90 % Wert der Zellkettenlänge
$\eta_{10/s}$	$[\text{mPa s}]$	scheinbare Viskosität bei Scherrate von 10 s^{-1}

Abkürzungen

cEPS	kapsuläre EPS
EPS	Exopolysaccharide
fEPS	freie EPS
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i>

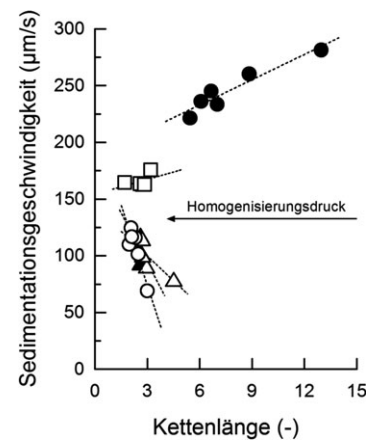
Literatur

- [1] S. Mende, H. Rohm, D. Jaros, *Int. Dairy J.* **2016**, *52*, 57–71.
- [2] D. M. Waters, A. Mauch, A. Coffey, E. K. Arendt, E. Zannini, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, *55*, 503–520.
- [3] S. Mende, L. Krzyzanowski, J. Weber, D. Jaros, H. Rohm, *J. Biosci. Bioeng.* **2012**, *113*, 185–191.
- [4] P. Ruas Madiedo, C. G. de los Reyes Gavilan, *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 853–866.
- [5] D. Jaros, S. Mende, F. Häföfe, C. Nachtigall, H. Nirschl, H. Rohm, *Eng. Life Sci.* **2018**, *18* (1), 62–69. DOI: 10.1002/elsc.201700121
- [6] R. Wengeler, F. Ruslim, H. Nirschl, T. Merkel, *Chem. Ing. Tech.* **2004**, *76* (5), 659–662. DOI: 10.1002/cite.200403391
- [7] N. E. Costa, L. Wang, M. E. Auty, J. A. Hannon, P. L. H. McSweeney, T. Beresford, *Dairy Sci. Technol.* **2012**, *92*, 219–235.
- [8] A. Gandhi, N. Shah, *Food Microbiol.* **2015**, *49*, 197–202.
- [9] F. Häföfe, S. Mende, D. Jaros, H. Rohm, H. Nirschl, *Sep. Pur.* **2018**, *202*, 21–26

Separation von Starterkulturen nach Hochdruck-Homogenisierung

F. Häftele*, D. Jaros, S. Mende, H. Rohm, H. Nirschl

Kurzmitteilung: Der Einfluss einer mechanischen Scherbehandlung auf die Sinkgeschwindigkeit und Sedimentkompression von verschiedenen Exopolysaccharid produzierenden Milchsäurebakterien wird gezeigt. Die Skalierbarkeit der im Labormaßstab gewonnenen Ergebnisse konnte bestätigt werden. XXX



Repository KITopen

Dies ist ein Postprint/begutachtetes Manuskript.

Empfohlene Zitierung:

Häffele, F.; Jaros, D.; Mende, S.; Rohm, H.; Nirschl, H.
[Separation von Starterkulturen nach Hochdruck-Homogenisierung](#).
2018. Chemie - Ingenieur - Technik, 90.
[doi:10.5445/IR/1000088468](https://doi.org/10.5445/IR/1000088468)

Zitierung der Originalveröffentlichung:

Häffele, F.; Jaros, D.; Mende, S.; Rohm, H.; Nirschl, H.
[Separation von Starterkulturen nach Hochdruck-Homogenisierung](#).
2018. Chemie - Ingenieur - Technik, 90 (7), 1016–1020.
[doi:10.1002/cite.201700166](https://doi.org/10.1002/cite.201700166)

Lizenzinformationen: [KITopen-Lizenz](#)