

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Phylogenetische und taxonomische Stellung des Genus *Lactobacillus*

Das Genus *Lactobacillus* umfaßt eine phänotypisch heterogene Gruppe von Gram-positiven, meist Katalase-negativen, stäbchenförmigen oder kokkoiden, nicht sporenbildenden Bakterien. Diese Gruppe ist der Ordnung *Eubacteriales*, der Familie *Lactobacillaceae* und dem Tribus *Lactobacilleae* zuzuordnen. Die meisten Laktobazillen-Spezies bevorzugen ein mikroaerophiles Milieu, einige wenige sind obligat anaerob. Da Laktobazillen Glukose zu Milchsäure abbauen können, werden sie der Gruppe der Milchsäurebakterien zugeordnet, die allerdings keine taxonomische Einheit darstellt.

Basierend auf 16S- und 23S rRNA-Sequenzierungsdaten lassen sich *Eubacteria* aufgrund ihres unterschiedlichen Anteils der Purinbase Guanin bzw. der Pyrimidinbase Cytosin in der DNA (G/C-Anteil) in zwei Untergruppen einteilen. Laktobazillen gehören in die sogenannte *Clostridium*-Untergruppe, die sich durch einen G/C-Anteil von unter 50 mol% auszeichnet, während Mikroorganismen mit einem G/C-Anteil von über 50 mol% der *Actinomycetes*-Untergruppe zugeordnet werden (SCHLEIFER und LUDWIG, 1995). Neben den Laktobazillen stellen *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* und *Bifidobacterium* wichtige Genera der Milchsäurebakterien dar (KLEIN, 1998). Nach Angaben von HAMMES und VOGEL (1995), setzt sich das Genus *Lactobacillus* aus 65 Spezies zusammen, wobei die zunehmende Anwendung moderner mikrobiologischer Untersuchungsmethoden die Beschreibung weiterer neuer Spezies in der Zwischenzeit beschleunigt hat und jährlich ca. 5 neue Spezies hinzukommen (KLEIN, 2001). Typ-Spezies für das Genus *Lactobacillus* ist *Lactobacillus delbrueckii* Leichmann 1896 (KANDLER und WEISS, 1986).

Auf der Grundlage klassischer mikrobiologischer Methoden wurde innerhalb des Tribus *Lactobacilleae* das eigene Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901 gebildet, welches sich aus den drei phänotypisch unterschiedlichen Subgenera „*Thermobacterium*“, „*Streptobacterium*“ und „*Betabacterium*“ zusammensetzte (ORLA-JENSEN, 1919; SHARPE et al. 1966; REUTER, 1973; STACKEBRANDT und TEUBER, 1988; HAMMES et al., 1992, POT et al., 1994), bzw. Gruppen I, II und III (KANDLER und

WEISS, 1986). Obwohl diese taxonomische Einteilung in Subgenera nach der Etablierung moderner molekularbiologischer Identifizierungsmethoden nicht mehr verfolgt wird, stellt sie dennoch eine gute Möglichkeit dar, Laktobazillen entsprechend ihrer phänotypischen Merkmale in Gruppen zusammenzufassen. Teilweise ist auf diesem Wege sogar eine Identifizierung bis auf Spezialebene möglich und für Routineuntersuchungen hat sich die Kombination von klassischen phänotypischen und neuen genotypischen Untersuchungstechniken bewährt (REUTER et al., 2000a, 2000b).

Vertreter des klassischen Subgenus „**Thermobacterium**“ (Gruppe I) verwerten Glukose homofermentativ, wobei der Abbau ausschließlich zu Milchsäure erfolgt. Als weitere kennzeichnende Eigenschaft wird kein Gas gebildet. Thermobakterien können bei 45°C und auch höheren Temperaturen wachsen, während unter 15°C kein Wachstum stattfindet. Als typische, z.T. auch biotechnologisch genutzte Vertreter dieses Subgenus sind die Spezies *L. delbrueckii* mit ihren drei Subspezies *delbrueckii*, *bulgaricus* und *lactis*, *L. helveticus* sowie die Spezies der *L. acidophilus*-Gruppe (*L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*) zu nennen.

Die ebenfalls Glukose homofermentativ bzw. fakultativ heterofermentativ verwertenden Vertreter des Subgenus „**Streptobacterium**“ (Gruppe II), sind durch eine niedrigere Wachstumsgrenztemperatur gekennzeichnet. Streptobakterien wachsen durchaus bei Temperaturen unter 15°C. Diesem Subgenus gehören u.a. die Spezies der *L. casei*-Gruppe (*L. zaeae*, *L. casei*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus*), *L. plantarum* sowie einige neuere Spezies wie *L. farciminis* und *L. alimentarius* an. Die Abgrenzung sogenannter atypischer Streptobakterien (*L. sake* und *L. curvatus*) von anderen Streptobakterien gelingt nach REUTER (1970a) durch eine verminderte Säuretoleranz (unterer pH-Grenzwert 3,9).

Kennzeichnend für das Subgenus „**Betabacterium**“ (Gruppe III) ist die Heterofermentation von Glukose. Bei den heterofermentativen Laktobazillen können außer Milchsäure auch Kohlendioxid, Äthanol und/oder Essigsäure als weitere Stoffwechselprodukte des Glukoseabbaues gebildet werden (KANDLER, 1983). Die Beobachtung, daß unterschiedliche Endprodukte bei der Glykolyse gebildet werden, machte bereits ORLA-JENSEN (1919). Bei allen Subgenera können nach REUTER (1971a) auch Endprodukte wie Aldehyde, Ketofettsäuren und andere organische

Fettsäuren (Ameisen- oder Propionsäure) auftreten. Während einheitliche Wachstumsgrenztemperaturen für die Betabakterien als Gruppe nicht kennzeichnend sind, ermöglicht hingegen die Bildung teilweise erheblicher Mengen CO₂ die leichte Differenzierung dieses Subgenus von den beiden anderen Subgenera. Typische Vertreter dieses Subgenus sind *L. reuteri* und *L. fermentum*, die in der Lage sind, bei 45°C zu wachsen, wohingegen die psychrotrophen Vertreter *L. buchneri* sowie *L. brevis* bei dieser Temperatur kein Wachstum zeigen.

Eine neuere Einteilung in phänotypisch/molekularbiologische Gruppen (Gruppen A, B und C) haben HAMMES und VOGEL (1995) zusammenfassend dargestellt. Sie versuchen die Gruppen-Einteilung von KANDLER und WEISS (1986) mit einer weiteren Aufteilung in Untergruppen entsprechend der phylogenetischen Verwandtschaftsgrade zwischen den Spezies zu kombinieren. Bei diesen Unterteilungen wird ebenfalls Bezug auf den Fermentationsweg (homo- oder heterofermentativ) genommen, wobei allerdings neben Glukose auch der Abbau von Pentosen berücksichtigt wird. Ferner wird der anhand von Zellwandanalysen festgestellte Peptidoglycantyp als Differenzierungskriterium einbezogen. Anderen klassischen Differenzierungskriterien sowie ökologischen Gesichtspunkten zum Vorkommen von Laktobazillen wird bei dieser Einteilung jedoch offenbar keine Bedeutung zugemessen.

Nachfolgend soll die Historie der Spezies *L. acidophilus*, die zusammen mit *L. delbrueckii* (und ihren Subspezies *delbrueckii*, *bulgaricus* und *lactis*) jeweils eine Untergruppe der obligat homofermentativen Spezies (Gruppe I resp. A) darstellen, näher erläutert werden.

2.1.1 *L. acidophilus*-Gruppe

Die Spezies *L. acidophilus* sensu stricto ist bereits von MORO (1900) beschrieben worden, wobei er sie „*Bacillus acidophilus*“ nannte. Das von ihm aus Säuglingsstuhl isolierte Gram-positive, aerob wachsende, nicht sporenbildende Bakterium konnte in angesäuertem Bouillon kultiviert werden, was zur Namensgebung führte. Es folgten Arbeiten von ORLA-JENSEN (1919, 1943), dessen besonderes Interesse der Beschreibung von Milchsäurebakterien in Milchprodukten aber auch im Darmtrakt des Menschen galt und dessen Untersuchungen die Grundlage für die Beschreibung der oben erwähnten Subgenera darstellen. Die Bedeutung der Verwertung von

unterschiedlichen Kohlenhydraten als Differenzierungskriterium für Laktobazillen stellten schon KULP und RETTGER (1924) heraus. Ein auf dieser Basis von KUNDRAT (1958) entwickeltes Untersuchungsschema wurde von LERCHE und REUTER (1960) übernommen und erweitert. Das in den Untersuchungen von ROGOSA et al. (1953) beschriebene Vorkommen von 4 verschiedenen Typen bei *L. acidophilus* konnte von LERCHE und REUTER (1962) bestätigt werden. REUTER (1964) führte die Untersuchungen an thermophilen Laktobazillen fort und erweiterte die Einteilung in 4 Biotypen für die Mikroflora des Menschen, während MITSUOKA (1969) das von KUNDRAT (1958) beschriebene Prüfschema auf die Mikroflora bei verschiedenen Haustieren ausdehnte und bis zu 10 unterschiedliche Biotypen beschrieb.

Da die taxonomische Einordnung des von MORO (1900) beschriebenen Bakteriums aufgrund einiger abwegiger Reaktionen erhebliche Probleme bereitete, wurde von HANSEN und MOCQUOT (1970) entsprechend den geltenden Nomenklaturregeln der Stamm ATCC 4356 als Neo-Typstamm festgelegt.

Durch DNA-DNA-Homologiestudien zweier voneinander unabhängiger Arbeitsgruppen (JOHNSON et al., 1980; LAUER et al., 1980) erfuhr die *L. acidophilus*-Gruppe eine neue Spezies-Einteilung in 6 Homologiegruppen. Dabei wurden 2 Homologiehauptgruppen (Genotypen) gebildet, wobei die erste Gruppe in 4 und die zweite Gruppe in 2 weitere Untergruppen unterteilt werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt waren allerdings lediglich die beiden Spezies *L. acidophilus* sensu stricto (MORO, 1900; HANSEN und MOCQUOT, 1970) und *L. gasseri* beschrieben. *L. gasseri* war bereits unmittelbar zuvor innerhalb des Subgenus „*Thermobacterium*“, ebenfalls auf der Grundlage von DNA-Homologieuntersuchungen (LAUER und KANDLER, 1980), als eigenständige Spezies benannt worden. Die Erweiterung um 4 weitere Spezies wurde von JOHNSON et al. (1980) und LAUER et al. (1980) zu diesem Zeitpunkt vorweggenommen. Ihre Beschreibung bzw. Benennung als eigenständige Spezies bzw. Zuordnung zu bestimmten Homologiegruppen der *L. acidophilus*-Gruppe erfolgte erst später. Eine dieser Spezies ist die ursprünglich „*Eubacterium crispatum*“ benannte, erstmalig von BRYGOO und ALADAME (1953) beschriebene Spezies. Die Zuordnung der später als *L. crispatus* bezeichneten Spezies zur *L. acidophilus*-Gruppe erfolgte allerdings erst auf der Grundlage der Untersuchungen von CATO et al (1983). Sie stellten fest, daß eine vollständige DNA-Homologie zu einer von JOHNSON et al. (1980) und LAUER et al. (1980) beschriebenen Homologieuntergruppe bzw. zu dem entsprechenden Referenzstamm „*Lactobacillus acidophilus*“ Gruppe A 2

(ATCC 33197) vorlag. Ein von NAKAMURA (1981) erstmalig beschriebenes Isolat aus dem Gastrointestinaltrakt eines Rindes wurde Anfang der neunziger Jahre von FUJISAWA et al. (1992) aufgrund biochemischer Eigenschaften und DNA-Reassoziationsversuchen einer weiteren DNA-Homologieuntergruppe zugeordnet. Im Rahmen derer Untersuchungen erfolgte auch die Neubeschreibung der Spezies *L. gallinarum* und *L. johnsonii*, die ebenfalls spezifischen Homologieuntergruppen nach JOHNSON et al. (1980) und LAUER et al. (1980) zugeordnet werden konnten. Eine Übersicht der taxonomischen Beschreibungen der Spezies der *L. acidophilus*-Gruppe gibt Tab. 1.

Tab. 1: Taxonomische Beschreibung und DNA-Homologiegruppen der *L. acidophilus*-Gruppe

Spezies	Erstbeschreibung	DNA-Homologiegruppe	
		JOHNSON et al. (1980)	LAUER et al. (1980)
<i>L. acidophilus</i> * sensu stricto	MORO (1900); HANSEN & MOCQUOT (1970)	A 1	I a
<i>L. crispatus</i> *	BRYGOO & ALADAME (1953); CATO et al. (1983)	A 2	I b
<i>L. amylovorus</i>	NAKAMURA (1981)	A 3	I c
<i>L. gallinarum</i>	FUJISAWA et al. (1992)	A 4	I d
<i>L. gasserii</i> *	LAUER & KANDLER (1980)	B 1	II a
<i>L. johnsonii</i> *	FUJISAWA et al. (1992)	B 2	II b

*: Spezies, deren Stämme in Probiotika eingesetzt werden

Betrachtet man die chronologische Reihenfolge der Speziesbeschreibungen der *L. acidophilus*-Gruppe, so liegt die von KLEIN (1998) und KLEIN et al. (1998a) geäußerte Vermutung nahe, daß es sich bei der Identifizierung von *L. acidophilus*-Stämmen vor 1992 mit hoher Wahrscheinlichkeit auch um andere Spezies aus der *L. acidophilus*-Gruppe gehandelt haben könnte, nicht um *L. acidophilus* sensu stricto.

2.1.2 *L. casei*-Gruppe

Um die gegenwärtigen Probleme der taxonomischen Einordnung von Stämmen aus der *L. casei*-Gruppe darzustellen, soll auch hier ein Überblick zur Historie dieser Gruppe gegeben werden. Wie bereits weiter oben erwähnt, sind die Vertreter der *L. casei*-Gruppe den Streptobakterien zuzuordnen. Nachdem ORLA-JENSEN (1916) die Spezies *L. casei* zunächst als „*Caseobacterium vulgare*“, „*Bacterium casei*“ bzw. „*Streptobacterium casei*“ beschrieben hatte, erfolgte eine Einteilung in lediglich 2 Spezies, namentlich *L. casei* und *L. plantarum* (ORLA-JENSEN, 1919). Erstere Spezies stellte ein „typisches Käsebakterium“ dar, während *L. plantarum* als „typisches Pflanzenbakterium“ angesehen wurde. Die Abgrenzung anderer Spezies dieser Gruppe erfolgte erst später (z.B. *L. sake* von KATAGIRI et al. (1934), *L. coryniformis* von ABO-ELNAGA und KANDLER (1965) und *L. farciminis* und *L. alimentarius* von REUTER (1970b)). Die Beschreibung dreier Subspezies zur Spezies *L. casei* (ssp. *casei*, *alactosus* und *rhamnosus*) erfolgte auf der Grundlage spezifischer Kohlenhydrat-Fermentationsmuster (ROGOSA et al., 1953). Nachfolgend wurden die Subspezies *tolerans* (Toleranz von 72°C für 40 min.) sowie *pseudoplantarum* (keine Vergärung von Raffinose und Melibiose) durch ABO-ELNAGA und KANDLER (1965) beschrieben. Da die Beschreibung der Spezies *L. casei* von ORLA-JENSEN (1916) jedoch nicht den Regeln des Bakteriologischen Codes entsprach (SNEATH, 1992), erfolgte die Neubezeichnung der Spezies von HANSEN und LESSEL (1970) folgerichtig als *L. casei* comb. nov. Sie designierten den Stamm ATCC 393 als Typstamm. Die Wahl dieses Stammes ist hinsichtlich der weiteren taxonomischen Entwicklung der *L. casei*-Gruppe von besonderer Bedeutung.

Von DELLAGLIO et al. (1975) durchgeführte DNA-Homologieuntersuchungen zeigten, daß der *L. casei*-Typstamm ATCC 393^T mit anderen *L. casei*-Stämmen nur eine geringe Übereinstimmung aufweist. Ferner stellten sie dar, daß zwischen *L. casei* ssp. *casei*, ssp. *alactosus*, ssp. *pseudoplantarum* und ssp. *tolerans* ein hoher genetischer Verwandtschaftsgrad besteht, während *L. casei* ssp. *rhamnosus* zu den anderen Subspezies von *L. casei* lediglich eine geringe DNA-Homologie aufweist. Auch wurde in den Untersuchungen eine fast vollständige Homologie der DNA von „*Lactobacterium zeae*“ (ATCC 15820) und *L. casei* ssp. *casei* (ATCC 393) festgestellt. Dies ist bedeutsam, da der Stamm ATCC 393 noch immer den gegenwärtigen, jedoch kontrovers diskutierten Typstamm von *L. casei* darstellt und der ursprünglich „*Lactobacterium zeae*“ (KUZNETSOV, 1959) benannte Stamm

ATCC 15820 heute als Typstamm der Spezies *Lactobacillus zeae* (DICKS et al., 1996) geführt wird. Der hohe Verwandtschaftsgrad dieser beiden Stämme wurde auch bereits von MILLS und LESSEL (1973) aufgezeigt, die im Rahmen phänotypischer Untersuchungen fast identische Fermentationsmuster ermittelten. Obwohl der Stamm ATCC 15820 Rhamnose-positiv reagierte und die Zuordnung zu *L. casei* ssp. *rhamnosus* diskutiert wurde, beschränkten sich MILLS und LESSEL (1973) auf die Aussage, daß es sich bei der Einteilung in Subspezies in der *L. casei*-Gruppe um ein komplexes taxonomisches Problem handelt. Folge ihrer Untersuchungen war jedoch, daß sich die Bezeichnung „*Lactobacterium zeae*“ nicht halten konnte und bei der Neubeschreibung durch DICKS et al. (1996) die Speziesbezeichnung *L. zeae* als nom. rev. (Nomen revictum) wieder auflebte.

Ebenfalls auf der Grundlage von DNA-Homologieuntersuchungen erfolgte dann eine Aufteilung der Spezies *L. casei* mit ihren fünf Subspezies in die neu definierte Spezies *L. casei* ohne Subspezies sowie in *L. paracasei* mit zwei Subspezies und in *L. rhamnosus* (COLLINS et al., 1989). Die Spezies *L. casei* wurde dabei aus der ehemaligen Subspezies *L. casei casei* gebildet ebenso wie *L. rhamnosus* aus der Subspezies *L. casei rhamnosus*. Die Spezies *L. paracasei* wurde mit ihren beiden Subspezies *L. paracasei paracasei* und *L. paracasei tolerans* neu beschrieben, wobei *L. paracasei* ssp. *paracasei* aus den ehemaligen Subspezies *L. casei alactosus* und *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* gebildet wurde und *L. paracasei* ssp. *tolerans* aus der ehemaligen Subspezies *L. casei tolerans* hervorging (Tab. 2).

Tab. 2: Taxonomie der *L. casei*-Gruppe vor bzw. nach der Revision durch COLLINS et al. (1989)

<i>L. casei</i> -Gruppe nach ABO-ELNAGA und KANDLER (1965)		<i>L. casei</i> -Gruppe nach COLLINS et al. (1989)
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	⇒	<i>L. casei</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>alactosus</i>	⇒	<i>L. paracasei</i> ssp.
<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudoplantarum</i>	⇒	<i>paracasei</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>tolerans</i>	⇒	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	⇒	<i>L. rhamnosus</i>

Kurz darauf wurde durch genotypische Untersuchungen von Stämmen aus der *L. casei*-Gruppe deutlich, daß die von COLLINS et al. (1989) vorgenommene Speziesenteilung nicht mit natürlich vorkommenden und in probiotischen Produkten eingesetzten Stämmen in Einklang zu bringen war (DELLAGLIO et al., 1991). Die bereits von COLLINS et al. (1989) gemachte Feststellung, daß zu *L. casei*-Subspezies zuzuordnende Stämme einen geringen genotypischen Verwandtschaftsgrad zum *L. casei*-Typstamm aufweisen, konnte auch von DELLAGLIO et al. (1991) bestätigt werden. In deren Untersuchungen zeigten ursprünglich als *L. casei* ssp. *alactosus* und *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* klassifizierte Stämme eine große Ähnlichkeit zum Stamm ATCC 334, so daß dieser als Neo-Typstamm für *L. casei* vorgeschlagen wurde. Des weiteren stellte sich im Rahmen der Untersuchungen von DELLAGLIO et al. (1991) heraus, daß *L. paracasei* ssp. *paracasei*-Stämme (inklusive des Typstammes) den Stämmen der *L. casei*-Subspezies genotypisch sehr ähnlich sind. Dies führte zu dem Vorschlag, die Speziesbezeichnung *L. paracasei* zurückzuweisen. Die Präsentation dieser Untersuchungsergebnisse machte eine taxonomische Revision der *L. casei*-Gruppe unumgänglich, jedoch waren die vorgeschlagenen Änderungen (Tab. 4) nicht mit den Regeln des Bakteriologischen Codes (SNEATH, 1992) des International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) vereinbar. Die Judicial Commission des ICSB lehnte die Vorschläge von DELLAGLIO et al. (1991) ab, obwohl die wissenschaftlich fundierten Daten eine Revision für angebracht oder gar notwendig erschienen ließen. Die Verwirrung in der *L. casei*-Gruppe nahm ihren weiteren Verlauf, als sich herausstellte, daß der bereits erwähnte *L. casei*-Typstamm (ATCC 393^T) nicht mehr mit der Erstbeschreibung des

Stammes von ORLA-JENSEN (1916) übereinstimmte und somit nicht mehr als repräsentativ für die Spezies *L. casei* angesehen werden konnte (DICKS et al., 1996). Die Untersuchungen von DICKS et al. (1996), die sich auch auf die Ergebnisse von früheren Untersuchungen (DELLAGLIO et al., 1975) stützten, führten dann jedoch zu einer weitergehenden Revision der *L. casei*-Gruppe. Wie bereits erwähnt, wurde *L. zeae* fortan als eigenständige Spezies geführt.

Auch MORI et al. (1997) widmeten sich den nomenklatorischen Problemen in der *L. casei*-Gruppe und führten partielle Sequenzierungen der für die 16S rRNA codierenden Gene von Typ- und Referenzstämmen durch. In Übereinstimmung mit Vorschlägen von DELLAGLIO et al. (1991) und DICKS et al. (1996) kommen auch sie zu dem Schluß, daß der Stamm ATCC 334 als Neo-Typstamm für *L. casei* designiert werden sollte und eine Reklassifizierung des gegenwärtigen *L. casei*-Typstammes (ATCC 393^T) als *L. zeae* angebracht sei. Auch wird gemäß den taxonomischen Vorschlägen von MORI et al. (1997) die Spezies *L. paracasei* mit dem vorgeschlagenen Neo-Typstamm von *L. casei* (ATCC 334) als eine nicht näher bezeichnete Spezies zusammengefaßt.

Tab. 3: Taxonomievorschläge der *L. casei*-Gruppe nach Dicks et al. (1996) und MORI et al. (1997)

Taxon	Typstamm	Änderungen/Vorschläge
<i>L. zeae</i>	ATCC 15820 ^T ⇒	Aufnahme des gegenwärtigen <i>L. casei</i> -Typstammes (ATCC 393 ^T)
<i>L. casei</i>	ATCC 393 ^T ⇒	Zusammenfassung aller <i>L. paracasei</i> -Stämme und des Stamms ATCC 334
<i>L. rhamnosus</i>	ATCC 7469 ^T ⇒	keine Änderung

Von CHEN et al. (2000) durchgeführte Sequenzanalysen der sogenannten Spacer-Regionen von Genen, die für die 23S und 5S rRNA codieren, unterstützen ebenfalls die Auffassung von DICKS et al. (1996), daß der Stamm ATCC 334 als Neo-Typstamm von *L. casei* bestimmt werden sollte.

Stämme der Spezies *L. casei* werden in vielerlei Produkten als probiotische Komponenten eingesetzt (VESCOVO et al., 1995), so daß diesen Revisionsversuchen eine nicht unerhebliche praktische Relevanz beizumessen ist. Taxonomische

Änderungen bei kommerziell eingesetzten Stämmen können zu bedeutenden Konsequenzen in der industriellen Mikrobiologie führen.

Betrachtet man die verwirrende Entwicklung in der *L. casei*-Gruppe, so wird deutlich, daß die frühe Aussage von MILLS und LESSEL (1973), daß die *L. casei*-Gruppe ein komplexes taxonomisches Problem darstellt, durchaus zutreffend war und auch gegenwärtig noch nicht zufriedenstellend gelöst ist.

2.2 Ökologische Bedeutung von Laktobazillen

2.2.1 Natürliches Vorkommen

Laktobazillen sind in vielfältigen Habitaten anzutreffen. Ausführliche Untersuchungen zum physiologischen Vorkommen von *Lactobacillus* spp. wurden in der Vergangenheit durchgeführt. Einige Spezies wie z.B. *L. brevis* und *L. plantarum* sind in und auf Pflanzen weit verbreitet (VANDENBERGH, 1993), und auch in Lebensmitteln und Futtermitteln pflanzlichen Ursprungs (z.B. Sauerkraut bzw. Silage) lassen sich Laktobazillen nachweisen (REUTER 1965a; DELLAGLIO et al., 1984). Andere Spezies wie *L. delbrueckii* ssp. *lactis* und ssp. *bulgaricus* kommen physiologischerweise in Milch vor. Einen detaillierten Überblick der vielfältigen natürlichen Habitate von Laktobazillen geben HAMMES et al. (1992).

Besondere Beachtung findet seit langem der **Intestinaltrakt** von Mensch und Tier. Laktobazillen sind dort zur Aufrechterhaltung eines mikroökologischen Gleichgewichtes von besonderer Bedeutung (REUTER, 1965a). Nach Angaben von GOLDIN (1986), befinden sich im menschlichen Gastrointestinaltrakt ca. 10^{14} Mikroorganismen, von denen der größte Teil im Colon angesiedelt ist (10^{10} - 10^{12} /g). Die Intestinalflora des Menschen setzt sich aus 400-500 unterschiedlichen Spezies und Subspezies zusammen, wobei die meisten Bakterien, insbesondere im Dickdarm, nicht-sporenbildende, anaerobe Vertreter der Genera *Bacteroides*, *Bifidobacterium* und *Eubacterium* darstellen (GIBSON und MACFARLANE, 1995). Dabei weist SAVAGE (1977) bezüglich des untersuchten Probenmaterials auf die Bedeutung der differenzierten Betrachtung und Bewertung von Untersuchungsergebnissen hin. Nach seinen Erkenntnissen erlaubt die Untersuchung von Faeces von

Versuchstieren (z.B. Mäusen) keine verlässlichen Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Darmflora des Menschen. Zumindest gibt aber eine sofort und unter strikt anaeroben Bedingungen aufgearbeitete Stuhlprobe einen Einblick in die Mikroflora des unteren Colons des Menschen (REUTER, 1963a; MITSUOKA, 1969). Leider können Stuhlproben des Menschen nur unter experimentellen Bedingungen so sachgerecht untersucht werden.

Der zum Zeitpunkt der Geburt sterile Darmtrakt von Säugetieren und vom Menschen wird unmittelbar post-partum mikrobiell besiedelt, wobei die Laktobazillen bereits nach kurzer Zeit die dominierenden mikroaeroben Mikroorganismen darstellen (KNOKE und BERNHARD, 1986). Eine graduelle Stabilisierung der intestinalen Bakterienpopulation erfolgt im Verlauf des ersten Lebensjahres und weist dann die typische Zusammensetzung eines adulten Organismus auf (STARK und LEE, 1982). Bei Hühnern erfolgt die mikrobielle Besiedlung des Kropfes nach Untersuchungen von FULLER (1973) streng wirtsspezifisch, d.h. nur von anderen Vögeln isolierte Laktobazillenstämme können auf dem Epithel des Hühnerkropfes haften. Untersuchungen von LERCHE und REUTER (1962) und REUTER (1965b) haben ergeben, daß zumindest die Zusammensetzung der menschlichen Laktobazillen- und Bifidobakterienflora individuell geprägt ist und für eine längere Lebenszeit stabil bleibt. Von der autochthonen Laktobazillenflora sind die passageren Laktobazillen, die durch die Nahrungsaufnahme in den Verdauungstrakt gelangen, abzugrenzen. Diese vorübergehend an der Mukosa des Darmes haftenden Laktobazillen können die autochthone Laktobazillenflora zahlenmäßig übertreffen. Als Vertreter der autochthonen Darmflora, insbesondere im mittleren und unteren Dünndarm des Menschen, sind vor allem Spezies aus der *L. acidophilus*-Gruppe sowie *L. salivarius* und *L. reuteri* vorhanden (LERCHE und REUTER, 1962; REUTER, 1965a; MITSUOKA, 1969, 1992; FUJISAWA et al. 1996). Tab. 4 gibt einen zusammenfassenden Überblick der nach REUTER (1997a) zur autochthonen *Lactobacillus*-Flora des Menschen zuzuordnenden Spezies.

Tab. 4: Autochthone *Lactobacillus*-Gruppen in der Körperflora des Menschen nach REUTER (1997a)

I. Homofermentativ^a

L. acidophilus

L. acidophilus (sensu stricto)

L. gasseri

L. crispatus

L. johnsonii

L. salivarius

L. salivarius ssp. *salivarius*
ssp. *salicinus*

L. casei

L. casei/paracasei

L. rhamnosus

II. Heterofermentativ^b

L. reuteri

(früher *L. fermentum* II) einschließlich *L. oris* und *L. vaginalis*

^a: überwiegend Milchsäurebildung und keine Gasbildung aus Glukose

^b: außer Milchsäurebildung auch andere organische Säuren (Essig- und Ameisensäure) sowie reichlich CO₂ aus Glukose

Im Rahmen mikroökologischer Untersuchungen von Darminhalt des Menschen und unterschiedlicher Tierarten wurden von MITSUOKA (1992) vorwiegend folgende *Lactobacillus*-Spezies isoliert: *L. acidophilus* (Mensch, Ratte), *L. amylovorus* (Schwein, Rind), *L. crispatus* (Mensch, Huhn), *L. gallinarum* (Huhn), *L. gasseri* (Mensch, Rind), *L. johnsonii* (Mensch, Rind, Huhn), *L. salivarius* (Mensch, Schwein, Huhn).

Als immer wiederkehrende Komponente der Laktobazillen-Spezies bei untersuchten Tierarten wurde *L. reuteri* ermittelt. Diese wahrscheinlich dominierende *Lactobacillus*-Spezies im Gastrointestinaltrakt des Menschen und der meisten Tiere (REUTER, 1965; KANDLER und WEISS, 1986; SARRA et al., 1985) hat ähnliche physiologische Merkmale wie die von anderen Autoren aus dem Intestinaltrakt des Menschen und verschiedener Tierarten vor der Beschreibung der neuen Spezies *L. reuteri* als *L. fermentum* beschriebenen Stammvarianten (LERCHE und REUTER, 1962; MITSUOKA, 1969; MITSUOKA und OHNO, 1976; JONSSON und CONWAY, 1992). Eine genetische

Verwandtschaft zwischen *L. reuteri* und *L. fermentum* existiert jedoch nicht (KANDLER und WEISS, 1986). Die Spezies *L. fermentum* ist weit verbreitet in Lebensmitteln und Futtermitteln, z.B. in Sauerkraut, naturgereiftem Käse sowie Silage (REUTER, 1965a). Der 1962 von REUTER aus dem menschlichen Intestinum isolierte Stamm F 275 wurde als *L. fermentum* Ilb definiert und als Referenzstamm in den Kultursammlungen der American Type Culture Collection (ATCC 23727) und der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ 20016) hinterlegt (HANSEN, 1968). Auf der Grundlage von DNA-DNA Homologieuntersuchungen erlangte dieser Biotyp als *L. reuteri* den Status einer eigenen Spezies der heterofermentativen Laktobazillen (KANDLER et al., 1980).

Nach Angaben von ROGOSA et al. (1953) sind *L. casei* und *L. fermentum* als hauptsächliche Vertreter in der **Mundhöhle** des Menschen zu finden. *L. reuteri* war zu der Zeit noch nicht beschrieben, so daß einzelne *L. fermentum*-Anteile auch mit *L. reuteri* gleichzusetzen sind. Seltener kommen auch *L. acidophilus* und *L. salivarius* sowie die heterofermentativen *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum* sowie *L. cellobiosus* vor. REUTER (1965a) rechnet sowohl *L. acidophilus* als auch *L. salivarius* zur autochthonen Mundhöhlenflora. Vor allem auch *L. casei* und *L. rhamnosus* kommen natürlicherweise in der Mundhöhle vor, wobei diese Spezies insbesondere aus Zahnbelägen bzw. Zahnstein isoliert werden können. Eine aus menschlichem Speichel isolierte obligat heterofermentative *Lactobacillus*-Spezies, *L. oris*, wurde erst 1988 von FARROW und COLLINS beschrieben. Auch hier ist die Identität mit der von KANDLER et al. (1980) beschriebenen Spezies *L. reuteri* anzunehmen (pers. Mitteilung, REUTER, 2001). Laktobazillen sind in der Mundflora des Menschen jedoch nur zu einem relativ kleinen Anteil vorhanden (MARSH, 1980). Nach LONDON (1976) beträgt dieser Anteil lediglich 1% der gesamten Bakterienpopulation. Als dominierende Vertreter in diesem Habitat werden *Streptococcus* spp. angesehen.

Bereits vor über 100 Jahren wurde festgestellt, daß Laktobazillen physiologischerweise in der **Vaginalflora** dominant vorkommen (DÖDERLEIN, 1892). ROGOSA und SHARPE (1960) nennen *L. acidophilus*, *L. fermentum* sowie *L. rhamnosus* als vorherrschende Spezies. Für *L. fermentum* gilt das bereits bei der Mundflora gesagte. Aber auch die von GASSER (1970) aus Scheidensekret isolierte Spezies *L. jensenii* wurde später als Teil der physiologischen Vaginalflora der Frau beschrieben (CARLSSON und GOTHEFORS, 1975). Neuere Untersuchungen von GIORGI

et al. (1987) zeigten *L. gasseri*, *L. jensenii* und *L. crispatus* als am häufigsten vorzufindende Spezies. HAMMES et al. (1992) gaben zu bedenken, daß die taxonomischen Beschreibungen der Spezies *L. gasseri* und *L. crispatus*, bzw. die taxonomische Neugliederung der *L. acidophilus*-Gruppe erst zu Beginn der achtziger Jahre erfolgte (LAUER und KANDLER, 1980; LAUER et al., 1980; CATO, 1983) und zuvor vorgenommene Identifizierungen von „*L. acidophilus*“ als überwiegender Bestandteil der Vaginalflora differenziert zu betrachten sind. In ihren Untersuchungen wird deutlich, daß ca. 60% der zuvor mittels phänotypischer Methoden als *L. acidophilus* identifizierte Laktobazillen tatsächlich den Spezies *L. gasseri* und *L. crispatus* zuzuordnen sind. Auch in einer Übersichtsarbeit von CHARTERIS et al. (1997a) werden die Spezies *L. gasseri* und *L. crispatus* als in der Vaginalflora überwiegende Spezies aufgeführt. Mittels DNA-DNA Hybridisierungen identifizierten auch SONG et al. (1999) *L. crispatus* und *L. gasseri* als Hauptvertreter der Laktobazillen in der Vaginalflora bzw. auch im Darm Neugeborener. Eine auf der Grundlage von DNA-DNA Hybridisierungen durchgeführte Untersuchung der weiblichen Vaginalflora zeigt auch *L. crispatus* als dominierende vaginal-Spezies mit einem Anteil an der gesamten Laktobazillenflora von 32% (MAY et al., 1999). Die Spezies *L. jensenii* und *L. gasseri* waren im Rahmen dieser Untersuchungen mit einem Anteil von 23% bzw. 5% vertreten. Als weitere Spezies wurden *L. fermentum* (0,3%), *L. oris* (0,3%), *L. reuteri* (0,3%), *L. ruminis* (0,3%) und *L. vaginalis* (0,3%) nachgewiesen. Weiterhin nennen MCGROARTY et al. (1992) auch *L. casei* als Bestandteil. Die aus klinischem Material an Trichomoniasis erkrankter Frauen isolierte Spezies *L. vaginalis* wurde erst unlängst von EMBLEY et al. (1989) beschrieben. Wiederum ist auch bei dieser Speziesbeschreibung die Identität zu *L. reuteri* anzunehmen. In Untersuchungen von Kolvonien et al. (1998) vor allem *L. reuteri* isolieren, gefolgt von Vertretern aus der *L. acidophilus*-Gruppe und anderen *Lactobacillus*-Spezies (*L. paracasei*, *L. rhamnosus* und *L. fermentum*). Erst kürzlich wurde die ebenfalls aus der Vagina isolierte Spezies *L. fornicalis* beschrieben (DICKS et al., 2000).

Eine wichtige Eigenschaft der meisten *Lactobacillus*-Spezies in der Vagina ist die Fähigkeit, Peroxide zu bilden. Insbesondere die Spezies *L. crispatus* und *L. jensenii* sind nach Angaben von MAY et al. (1999) zur H₂O₂-Produktion fähig. ESCHENBACH et al. (1989) beobachteten, daß in ihrer Studie 96% der gesunden Frauen peroxidproduzierende, fakultativ anaerobe *Lactobacillus*-Spezies als Bestandteil der

Vaginalflora beherbergten, während bei Frauen, die an unspezifischer bakterieller Vaginose erkrankt waren, lediglich 6% H₂O₂-produzierende Laktobazillen aufwiesen. Diese Tatsache deutet die auch therapeutisch genutzte Funktion peroxidproduzierender Laktobazillen im Rahmen eines unspezifischen, antimikrobiellen Abwehrsystems an (siehe Kap. 2.2.4.3). Einen Überblick der physiologisch vorkommenden *Lactobacillus*-Spezies aus der *L. acidophilus*-Gruppe in unterschiedlichen Habitaten beim Menschen gibt die nachfolgende Tab. 5.

Tab. 5: In der Körperflora des Menschen vorkommende Spezies aus der *Lactobacillus acidophilus*-Gruppe (REUTER et al., 2000a)

Heutige Spezies	Früherer Biotyp (REUTER, 1962/64)	Vorkommen in		
		Mund	Darm	Vagina
<i>L. acidophilus</i> (sensu stricto)	II, III, IV	(+)	(+)	(+)
<i>L. gasseri</i>	I	?	++	+
<i>L. crispatus</i>	I, III	(+)	?	+
<i>L. johnsonii</i>	II, III	(+)	?	?

++ nahezu regelmäßig; + häufig; (+) gelegentlich; ? fraglich

2.2.2 Laktobazillenkulturen in der Lebensmittelproduktion

Die Fähigkeit, größere Mengen von Lebensmitteln zu produzieren und entsprechend zu lagern bzw. zu konservieren, kann als eine der Grundlagen in der Entwicklung der Zivilisation angesehen werden. Durch Fermentation konservierte Nahrungsmittel sind seit Jahrtausenden bekannt, wobei die Bedeutung von Bakterienkulturen erst zur Geburtsstunde der Mikrobiologie vor ca. 150 Jahren erkannt wurde (CAPLICE und FITZGERALD, 1999). Bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel kommt der originär vorhandenen Bakterienflora eine große Bedeutung zu. Diese **Spontanflora** entsteht zum einen durch ursprünglich im Ausgangssubstrat vorhandene Keime, wird andererseits jedoch auch durch im Verlauf der Herstellung stattfindende Kontamination verursacht. Bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs, insbesondere von Fleisch und Fleischerzeugnissen, setzt sich diese Mikroflora zum großen Teil aus Keimgruppen, die Bestandteil der originären Mikroflora der jeweiligen Tierart sind, zusammen. Andere Mikrofloraanteile stammen hingegen aus den Herstellerbetrieben

und von Personal, das mit dem Lebensmittel in Kontakt gekommen ist (REUTER, 1996). Zu der vielgestaltigen originären Mikroflora vieler Lebensmittel gehören auch Laktobazillen, für die mit der allgemeinen Einführung der Vorverpackung ein besonders geeignetes Habitat geschaffen wurde. So stellen ein mikroaerobes Milieu, konstante Feuchtigkeit sowie durch die Evakuierung ausgetretener Fleischsaft bei vorverpackten Fleischerzeugnissen elektive Wachstumsbedingungen dar (REUTER, 1970b). Auch das Lebensmittel Milch unterliegt einer raschen mikrobiellen Kontamination mit Umgebungskeimen (HAMMES et al., 1992). Einige Rohmilchkäse werden aber traditionsgemäß mit nicht pasteurisierter Milch hergestellt und verdanken ihre produktspezifische Zusammensetzung und den Geschmack ausschließlich der originären Mikroflora. Eine detaillierte Übersicht der in verschiedenen Nahrungsmitteln vorkommenden Mikroorganismen gaben CAPLICE und FITZGERALD (1999).

Schon seit langem ist bekannt, daß einzelne Spezies oder Gruppen der Lebensmittelmikroflora eine antagonistische Wirkung auf andere Mikroorganismen ausüben (REUTER, 1970b, 1972). Vertreter der Familie *Lactobacillaceae* stellen in dieser Hinsicht eine besonders aktive Gruppe dar und weisen in manchen Lebensmitteln hohe Vermehrungsraten auf. Durch ihre Stoffwechselaktivitäten können sie z.B. die Beschaffenheit und Haltbarkeit von **Fleischerzeugnissen** beeinflussen. Neben günstigen technologischen Eigenschaften wie dem Antagonismus gegenüber unerwünschten Keimgruppen, der Reifungsbeschleunigung und der Aromabildung, können Laktobazillen jedoch auch zu Verderbniserscheinungen, Verfärbungen, Schleimbildung sowie Geschmacksbeeinträchtigungen von Fleischerzeugnissen führen (REUTER, 1970b, 1972, 1997b; KANDLER und WEISS, 1986).

Eine besonders große Bedeutung haben Laktobazillen bei der Bereitung von **Milcherzeugnissen**. So bewirken mesophile Laktobazillen weltweit in vielen Erzeugnissen haltbare und schmackhafte Lebensmittel, wie z.B. die normale Sauermilch. Falls eine Pasteurisierung stattfindet, die zur Abtötung bzw. Inaktivierung der ursprünglich vorhandenen Mikroflora führt, müssen für die Produktion von z.B. gereiftem Emmentaler Käse thermophile *Lactobacillus*-Kulturen zugesetzt werden. (HAMMES et al., 1992). Auch die Produktion von Joghurt ist nur durch spezifische Bakterienkulturen mit geeigneten technologischen Eigenschaften möglich. Bei der Herstellung von Kefir werden die natürlicherweise in der Kefirknolle vorhandenen

heterofermentativen Laktobazillen-Spezies *L. kefir* und *L. kefiranofaciens* (KANDLER und KUNATH; 1983; FUJISAWA et al., 1988) verwendet. Einen detaillierten Überblick der in fermentierten Milchprodukten eingesetzten Mikroorganismen sowie deren taxonomische Zuordnung gibt HAYAKAWA (1992) in einer Übersichtsarbeit.

Auch **Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs** (z.B. Saure Gurken und Sauerkraut) werden durch das Vorkommen der Spezies *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. buchneri* und manchmal *L. fermentum* charakterisiert (REUTER, 1965a). Das Vorkommen und die Stoffwechselprodukte von auf anderem Gemüse sowie auf Obst natürlicherweise vorhandenen Mikroorganismen, einschließlich der Laktobazillen, stellten BUCKENHÜSKES und HAMMES (1990) ausführlich dar.

2.2.3 Laktobazillenkulturen als Futtermittelzusatzstoffe

Das natürliche Vorhandensein von Milchsäurebakterien in Tierfutter ist seit langem bekannt und hat bei der Konservierung von Futtermitteln eine alte Tradition. Laktobazillen sind in überwiegendem Maße für die erwünschte Fermentation und der damit einhergehenden pH-Wert-Absenkung in Silage verantwortlich. Insbesondere das unerwünschte Wachstum von Clostridien und *Listeria* spp. wird durch Säuerung verhindert. Als vorherrschende Vertreter der Laktobazillen in Silage fanden DELLAGLIO et al. (1984) *L. plantarum* und *L. brevis*. Aber auch die Spezies *L. buchneri*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. curvatus*, *L. acidophilus* und *L. salivarius* konnten aus diesem Habitat isoliert werden (ABO-ELNAGA und KANDLER, 1965; GRAZIA und SUZZI, 1984; DELLAGLIO und TORRIANI, 1986). Der Einsatz von probiotischen Mikroorganismen-Kulturen als Futtermittelzusatzstoffe hat vor ca. 30 Jahren Einzug in die Tierernährung gefunden. Zahlreiche Spezies aus der Gruppe der Laktobazillen aber auch anderer Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp.) werden verwendet (Kap. 2.2.4.3).

2.2.4 Weiterer biotechnologischer Einsatz von Laktobazillenkulturen

Neben der klassischen Verwendung als Starterkulturen für fermentierte Lebensmittel und Futtermittel, werden Laktobazillenkulturen auch in der Therapie bzw. Prophylaxe von Erkrankungen bei Mensch und Tier eingesetzt (siehe Kap. 2.2.4.3). Im Lebensmittelbereich werden derzeit probiotische Stämme vermehrt auch in anderen Erzeugnissen als Milcherzeugnissen industriell genutzt (SVENSSON, 1999). Als weiterer zukunftsreicher Anwendungsbereich für Laktobazillen kommt nach MERCENIER (1999) der Einsatz der Kulturen als Vektoren im Rahmen von oralen Vakzinationen in Betracht (s. Kap. 2.2.4.3), ein völlig neuartiges Forschungsgebiet, bei dem gentechnisch modifizierte Kulturen zum Einsatz kommen sollen.

2.2.4.1 Starter- und Schutzkulturen

Starterkulturen sind Bakterien, die zur gezielten Fermentation von Lebensmitteln eingesetzt werden. Der auf eine Säuerung zurückzuführende konservierende Effekt wird von Stoffwechselleistungen milchsäurebildender Mikroorganismen hervorgerufen, wobei von heterofermentativen Laktobazillen auch andere organische Säuren, wie Essig- oder Ameisensäure, gebildet werden. Bakterienkulturen, die eine besondere antagonistische Aktivität gegenüber saprophytären, infektiösen oder toxinbildenden Keimgruppen aufweisen, ein Produkt also vor ungünstigen Einflüssen aus der Umgebung bzw. aus dem nativen Mikroorganismenmilieu schützen, werden auch als **Schutzkulturen** bezeichnet. Eine strikte Trennung der beiden Begriffe Starter- und Schutzkultur ist nicht möglich, da eine als Starterkultur genutzte Bakterienkultur auch protektive Eigenschaften gegenüber unerwünschten Keimgruppen entfalten und somit als „Schutzkultur“ fungieren kann (HOLZAPFEL et al., 1995). Schutzkulturen haben nach GÄNZLE (1998) jedoch keine wesentlichen Auswirkungen auf die sensorische Qualität von Lebensmitteln. Die Schutzwirkung gegenüber Verderbnis- und Infektionserregern beruht auf der Bildung antagonistisch wirkender Substanzen, wie z.B. organischen Säuren, Peroxiden, Enzymen, Bakteriozinen oder anderen antimikrobiell wirksamen Substanzen (STILES, 1996). Besondere Bedeutung erlangte die Spezies *L. reuteri* nach der Beschreibung einer Substanz (*Reuterin*), die sich durch eine antagonistischen Aktivität gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen auszeichnet und von bestimmten Stämmen dieser Spezies synthetisiert wird (AXELSSON et al., 1989; CHUNG et al., 1989). Neben *L. reuteri* bilden auch andere *Lactobacillus*-Spezies spezielle Metaboliten, die für

biotechnologische Anwendungen von besonderem Interesse sind. Eine weiteres, erst kürzlich erforschtes Stoffwechselprodukt einiger *L. reuteri*-Stämme ist das *Reutericyclin*, dessen chemische Struktur erst kürzlich aufgeklärt wurde (HÖLTZEL et al., 2000). Das antibakterielle Spektrum dieser Substanz birgt nach GÄNZLE et al. (2000) sowohl ein therapeutisches Potential als auch vielversprechende Anwendungen im Lebensmittelbereich.

Der Einsatzbereich von Starter- bzw. Schutzkulturen in der Lebensmittelindustrie ist vielfältig. Da immer mehr Lebensmittel im verzehrfertigem Angebotszustand auf dem Markt erscheinen, kommt der Konservierung derartiger Produkte durch Mikroorganismen mit protektiven Eigenschaften eine bedeutende Rolle zu. So konnte von TORRIANI et al. (1997) gezeigt werden, daß durch Anwendung einer *L. casei*-Kultur bei verzehrfertig zubereiteten Salatmischungen die mesophile Gesamtkeimzahl um 5 log-Stufen reduziert werden konnte. Des weiteren werden derartige Mikroorganismen-Kulturen z.B. bei der Herstellung von Frucht- und Gemüsesäften, Brot, Wein und Bier, aber auch bei der Produktion von Milch- bzw. Fleischerzeugnissen, auf die näher eingegangen werden soll, verwendet.

2.2.4.1.1 Milchprodukte

Als klassische Starterkultur bei herkömmlichen Joghurtprodukten findet meist eine Kombination von *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* bzw. *-lactis* und Streptokokken (*Streptococcus thermophilus*) Verwendung, wobei aber auch andere Milchsäurebakterien bei der Herstellung fermentierter Milchprodukte zum Einsatz kommen (REUTER, 1973, 1990; BONAPARTE und REUTER, 1997; CAPLICE und FITZGERALD, 1999). So werden in neueren Joghurts in zunehmendem Maße Kulturen eingesetzt, die auch sogenannte probiotische Eigenschaften aufweisen (s. Kap. 2.2.4.3). Mildere Joghurtprodukte enthalten eine Kombination aus *L. acidophilus*, Bifidobakterien (*Bifidobacterium longum*) und *Streptococcus thermophilus*.

Auch bei der Herstellung von Käse ist der Einsatz von Starterkulturen gängige Praxis. Nach HERTEL et al. (1993) werden bei der Käseproduktion vorwiegend *L. helveticus* und *L. delbrueckii* ssp. *lactis* als Starterkulturen eingesetzt. REUTER (1965a) fand in europäischem Käse vorwiegend die schon von ORLA-JENSEN (1919) als „typisches Käsebakterium“ bezeichnete Spezies *L. casei*. Ferner kommen nach REUTER (1965a, 1973) auch *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* sowie

gelegentlich *L. brevis* in Käse vor. Die zum Teil erst unlängst gemachten signifikanten Fortschritte in der Erforschung technologischer Eigenschaften bestimmter Bakterien sind von DALY et al. (1998) näher beleuchtet worden und verdeutlichen die enorme Bedeutung, die der verstärkte biotechnologische Einsatz von Bakterienkulturen zukünftig mit sich bringen wird.

2.2.4.1.2 Fleischprodukte

Definierte Bakterienkulturen finden in der Fleischwirtschaft hauptsächlich bei der Produktion von Rohwurst Anwendung. Neben verschiedenen *Lactobacillus*-Spezies (*L. plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. pentosus*) werden auch Pediokokken (*P. acidilactici* und *P. pentosaceus*) als Starterkulturen eingesetzt (REUTER, 1970a; GEISEN et al., 1991; JUNKER et al. 1993). Geeignete Kulturen bestehen meist aus Laktobazillen, die aus Fleischprodukten isoliert wurden. Neben der Aromabildung bewirken Starterkulturen durch die Bildung von Milchsäure eine verkürzte Reifungszeit sowie eine verlängerte Haltbarkeit des Endprodukts. Weitere besondere Eigenschaften sind Protease-, Peptidase- oder Lipase-Aktivitäten oder die Bildung von Wasserstoffperoxid (REUTER, 1970b, 1972), die auch bei einer Reihe von Stämmen der atypischen Streptobakterien, neuerdings als *L. sake* und *L. curvatus* identifiziert, feststellbar sind. Diese Enzymaktivitäten können sowohl zur gewünschten Aromabildung eines Produktes beitragen als auch zu unerwünschten Farbabweichungen oder Ranzigkeit führen (REUTER, 1971b, 1971c). Vertreter der Genera *Staphylococcus* (*S. xylosus* und *S. carnosus*) sowie *Micrococcus* (*M. varians*) bilden das Enzym Nitratreduktase und werden in der Fleischwarenindustrie zur Rötung und Stabilisierung von Rohwürsten eingesetzt (COMI et al., 1993). Schutzkulturen werden in erster Linie erhitzten Produkten, wie Kochschinken und Brühwurst, in der Verpackung zugesetzt und dienen der Unterdrückung von Gram-negativen Bakterien, insbesondere *Enterobacteriaceae* (KNAUF, 1998). HUGAS (1999) stellte fest, daß durch die Anwendung eines *L. sakei*-Stammes (CTC494) das Wachstum von *Listeria* spp. gehemmt wurde. Im Vergleich mit einem nicht-bakteriozinbildenden Kontrollstamm wurde eine Reduzierung der *Listeria*-Gesamtkeimzahl um mehr als eine log-Stufe erreicht. Weitere technologisch genutzte Eigenschaften von Laktobazillen wurden in Arbeiten von HOLZAPFEL et al. (1995) und KNAUF (1998) dargelegt.

2.2.4.2 Probiotika

Eine der ersten Definitionen des Begriffes **Probiotikum** stammt von FULLER (1989) und beschreibt ein Probiotikum als einen „Futterzusatzstoff mit lebenden Mikroorganismen, der durch die Verbesserung des mikroökologischen Gleichgewichts der Intestinalflora nützliche Wirkungen auf das Wirtstier hat“. Diese Definition wurde von HAVENAAR et al. (1992) erweitert. Sinngemäß definieren sie ein Probiotikum als jegliche Mono- oder Mischkultur, die nach Applikation beim Menschen oder beim Tier günstige Effekte durch die positive Beeinflussung der Mikroflora des jeweiligen Wirtsorganismus hervorruft. Auch nach REUTER (1997b) beschränkt sich der Einsatz von Probiotika nicht nur auf den Gastrointestinaltrakt von (Nutz-) Tieren. Vielmehr umfasst der Begriff zusätzlich auch den Einsatz von probiotischen Kulturen in Lebensmitteln und in pharmazeutischen Präparaten.

In probiotischen Produkten kommt ein breites Feld von Mikroorganismen zum Einsatz, insbesondere Vertreter der Genera *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* (s. Tab. 6).

Tab. 6: Einsatz von Probiotika als Mono- oder Mischkulturen bei Mensch und Tier modifiziert nach REUTER (1997b) und HOLZAPFEL et al. (1998)

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	andere Laktobazillen	andere MO**
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. pseudolongum</i> *	<i>E. faecium</i>	<i>Bac. cereus</i> *
<i>L. crispatus</i>	<i>B. thermophilum</i> *	<i>E. faecalis</i> *	<i>Bac. cereus var. toyoi</i> *
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum/animalis</i>	<i>Lacto. lactis</i>	<i>Bac. licheniformis</i> *
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. breve/infantis</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> *	<i>Bac. subtilis</i> *
<i>L. casei/paracasei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ped. acidilactici</i> *	<i>Cl. butyricum</i> *
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ped. cerevisiae</i> *	
<i>L. lactis</i> *		<i>Str. thermophilus</i>	
<i>L. plantarum</i> *		<i>Str. infantarius</i>	
<i>L. farciminis</i> *		<i>Sporolactobacillus inulinus</i> *	
<i>L. murinus</i> *			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i> *			

*: Einsatz vorwiegend bei Nutztieren; *Bac.*: *Bacillus*; *Cl.*: *Clostridium*; *E.*: *Enterococcus*; *Lacto.*: *Lactococcus*; *Leuc.*: *Leuconostoc*; *Ped.*: *Pediococcus*; *Str.*: *Streptococcus*; **: Mikroorganismen

Ferner enthalten probiotische Erzeugnisse auch Hefen und Schimmelpilze aus den Genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulopsis* und *Aspergillus*, die überwiegend in Form von Arzneizubereitungen oder in speziellen Futtermittelzusatzstoffen für Wiederkäuer zur Anwendung kommen (FULLER, 1992, 1999; DELLAGLIO, 1997; REUTER, 1997b; HOLZAPFEL et al., 1998). Auch ein nicht-pathogener *Escherichia coli*-Stamm (DSM 6601), dessen besondere Eigenschaften in der Therapie chronischer Obstipationen bereits von NISSLE (1929) beschrieben wurde, wird als Probiotikum eingesetzt (SONNENBORN und SCHULZE, 1997).

Nach REUTER (1997b) bedarf der sinnvolle Einsatz von Probiotika der richtigen Auswahl der probiotischen Kulturen, wobei den Kriterien der Wirksamkeit, der biologischen Unbedenklichkeit sowie der genetischen Stabilität besondere Beachtung beizumessen ist. So müssen alimentär zugeführte Mikroorganismen die Magen-Dünndarmpassage unbeschadet überstehen können, um sich im Dickdarmbereich vermehren und eine entsprechende Wirkung entfalten zu können. Insbesondere für *Bifidobacterium*-Stämme und Vertreter der Spezies *L. acidophilus* wurde eine hohe Überlebensrate oral aufgenommener Mikroorganismen

nachgewiesen (MARTEAU et al., 1993). Aber auch für die seit geraumer Zeit in probiotischen Erzeugnissen eingesetzten Stämme *L. casei* „Shirota“, *Lactobacillus* „GG“ und den *L. johnsonii*-Stamm „LA1“ sind eine Säuretoleranz und Gallensaftstabilität beschrieben worden (SALMINEN et al., 1996a). Einen Überblick wissenschaftlich anerkannter Auswahlkriterien bezüglich des Einsatzes probiotischer Kulturen in Lebensmitteln gaben KLAENHAMMER und KULLEN (1999) in einer Zusammenstellung aus der Literatur (Tab. 7).

Tab. 7: Auswahlkriterien für den Einsatz probiotischer Stämme in Lebensmitteln (modifiziert nach KLAENHAMMER und KULLEN (1999))

Grundsätzliche Kriterien

- korrekte taxonomische Identifizierung
- Spezies muß physiologisch beim Zielorganismus vorkommen
- keine Toxizität und Pathogenität (GRAS-Status / generally-recognized-as-safe)

Technologische Eigenschaften

- zur Massenproduktion und -lagerung geeignet (geeignetes Wachstumsverhalten)
- Lebensfähigkeit in großen Populationen
- Stabilität erwünschter Eigenschaften während Kultivierung, Lagerung und Auslieferung
- Erzeugung erwünschter organoleptischer Qualitäten (bzw. keine unerwünschten Qualitäten) nach Einbringen in Lebensmittel bzw. in Fermentationsprozesse
- genetische Stabilität

kompetitive Eigenschaften (Konkurrenzfähigkeit)

- Gallensaft- und Säureresistenz
- Fähigkeit am Zielort zu überleben, sich zu vermehren und metabolische Leistungen zu vollbringen
- vorzugsweise Adhärenz- und Kolonisierungsfähigkeit
- Durchsetzungsfähigkeit gegen die normale Mikroflora und gegen Vertreter der eigenen oder ähnlichen Spezies, potentielle Resistenz gegen Bakteriozine, Säuren und andere von der residenten Mikroflora gebildete antimikrobielle Substanzen

Leistung/Wirkung/Funktionalität

- Fähigkeit, eine oder mehrere klinisch dokumentierte gesundheitsbegünstigende Leistungen zu erbringen („health benefit“)
- Antagonismus gegen pathogene/toxinogene Bakterien
- Produktion antimikrobiell wirksamer Substanzen (Bakteriozine, H₂O₂, organische Säuren)
- Immunstimulation, anti-mutagene und anti-karzinogene Wirkung
- Bildung bioaktiver Komponenten (Enzyme, Peptide)

Zusammenstellung nach CROWELL (1998) aus: KLAENHAMMER (1982, 1995); JOHNSON et al. (1987); CONWAY (1989); FULLER (1989); GILLILAND (1990); HAVENAAR und HUIS IN'T VELD (1992); SANDERS (1993); SALMINEN et al. (1996b); TANNOCK (1997); COLLINS et al. (1998); KULLEN und KLAENHAMMER (1999)

Die Wirkungen von Probiotika sind vielfältig und zum Teil gut untersucht. Spezielle Eigenschaften einiger besonders tiefgründig erforschter *Lactobacillus*-Stämme der Spezies *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* und *L. fermentum* stellten SALMINEN et al. (1996b) und REID (1999) in Übersichtsarbeiten dar. Da beschriebene probiotische Effekte aber zum Teil noch nicht in ausreichendem Maße wissenschaftlich überprüft worden sind, bedarf es sorgfältig geplanter klinischer Studien, um postulierte Wirkungen validieren zu können (ROLFE, 2000). Die nachfolgende Tab. 8 faßt einige in der Literatur beschriebene Anwendungsgebiete von Probiotika zusammen und ergänzt die bereits in der vorherigen Tabelle aufgeführten erwünschten Wirkungen probiotischer Kulturen.

Tab. 8: Beschriebene Anwendungsgebiete für Probiotika modifiziert nach HUIS IN'T VELD und HAVENAAR (1997) und GOLDIN (1998)

Intestinale Störungen

- Diarrhoe
- Obstipation
- Colitis
- *Salmonella* und *Shigella*-Infektionen (Competitive Exclusion-Effekt)
- Laktose-Intoleranz
- Blähungen

andere Gesundheitsstörungen

- Vaginitis
- Alkohol-induzierte Lebererkrankungen
- Krebs
- Hypercholesterinämie

andere Anwendungen

- Stabilisierung der autochthonen Mikroflora (v.a. Gastrointestinal- u. Vaginalflora)
 - Rekolonisierung des Darmes nach Antibiotika-Therapie
 - Reduktion bakterieller Enzyme (β -Glucuronidase, Nitroreduktase, Azoreduktase)
 - humorale Effekte
 - Behandlung bzw. Prophylaxe von Lebensmittelallergien
 - Adjuvanz von Impfstoffen
 - erhöhte Gewichtszunahme (vornehmlich bei Nutztieren)
-

Weitere Indikationen bzw. Wirkungen für den Einsatz von Probiotika sowie mögliche Wirkungsmechanismen wurden von PACK (1997) und SANDERS (2000) aufgezeigt.