

Mikroorganismen als Lebensmittelzusätze : Starterkulturen, Schutzkulturen und Probiotika

Autor(en): **Meile, Leo / Niederer, Brigitte / Baumann, Andreas**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene =
Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **96 (2005)**

Heft 1

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981933>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Mikroorganismen als Lebensmittelzusätze: Starterkulturen, Schutzkulturen und Probiotika*

Leo Meile, Brigitte Niederer, Andreas Baumann und Susanne Miescher Schwenninger
Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften, Labor für Lebensmittel-
biotechnologie, ETH Zürich

Einleitung

Die Entwicklung hoch zivilisierter Völker wurde unter anderem durch die Fähigkeit favorisiert, grosse Mengen an Lebensmitteln zu produzieren und haltbar zu machen (zu konservieren) (1). Die Konservierung war durch Entzug von Wasser möglich, aber auch durch Salzen, Zuckern und nicht zuletzt durch Umwandlung von rohen Lebensmitteln mit Hilfe von Mikroorganismen (MO) in weniger verderbliche Produkte durch Fermentationen. Dabei verhinderten verschiedene Metabolite der beteiligten MO das Wachstum oder Überleben der verderbenden Mikroflora. Solche Umwandlungsprozesse, vermutlich schon 6000 Jahre v. Chr. Geburt, führten zu Brot, Bier, Wein, Essig, Sauermilchprodukten, Käse oder Yogurt. Damit konnte neben der längeren Haltbarkeit und Verwertbarkeit von Lebensmitteln wie etwa Milch auch Abwechslung in den Speisezetteln gebracht werden. Die Verhinderung von Lebensmittelverderb durch MO mit Hilfe von Fermentationen, aber auch durch Hitze, begann man erst nach den mikrobiologischen Erkenntnissen von Louis Pasteur (nach 1861) zu verstehen.

Neben Fermentationen von pflanzlichen und tierischen Rohstoffen sind heute Mikroorganismen auch an technisch ausgefeilten Biotransformationen beteiligt, die zu Lebensmittelzusatzstoffen führen (Abbildung 1). Als Beispiel sei hier die Synthese von Vitamin C aus D-Glucose nach Reichstein genannt, die neben chemischen Syntheseschritten auch Mikroorganismen einbezieht, welche einzelne enzymatische Reaktionen katalysieren; die chemischen Schritte im Reichstein-Prozess könnte man heute sogar mit gentechnisch veränderten MO umgehen (2). Beim Lebensmitteleinsatz von Produkten aus Biotransformationen werden beteiligte MO

*Vortrag gehalten an der 37. Arbeitstagung der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH) in Zürich, 29. September 2004

gewöhnlich abgetrennt, so dass der Konsument mit den beteiligten Organismen nicht in direkten Kontakt kommt.

Bei den meisten Fermentationen, wo Starterkulturen als Reifungshilfe Rohprodukten zugesetzt werden, verbleiben die Organismen als Lebendkeime im Endprodukt, ausser dieses wird noch erhitzt (Abbildung 1). Beim Einsatz von Schutzkulturen und probiotischen MO ist es ein Ziel, möglichst aktive Keime im Produkt zu haben, weil von diesen bestimmte Funktionen verlangt werden: Schutzkulturen sollen das Wachstum kontaminierender MO bei einer Weiterreifung eines Produktes oder bei der Lagerung unterdrücken (3) und probiotische Keime sollen im Intestinaltrakt des Konsumenten eine bestimmte Leistung erbringen (4). Unter dem Aspekt der Aufnahme von respektablen Mengen von Lebendkeimen durch den Konsumenten darf und soll die Frage nach der Identität und der Sicherheit solcher Keime gestellt werden.

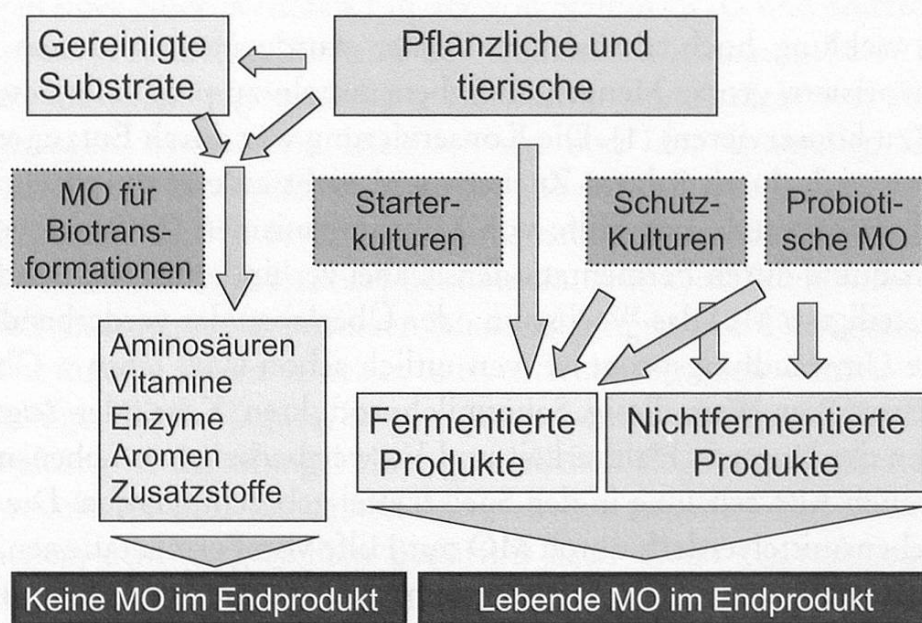


Abbildung 1 Funktion von Mikroorganismen (MO) in Prozessen der Lebensmittel- oder Zusatzstoffherstellung

Starterkulturen

Zu den wichtigsten Rohprodukten, welche traditionell mit Hilfe von MO prozessiert werden gehören Milch, Fleisch, Fisch, Früchte, Gemüse und Getreide. Die Fermentation solcher Rohprodukte kann spontan durch autochthone MO erfolgen, aber auch durch Zugabe eines Inokulums aus einer bereits erfolgten Fermentation (z.B. Sauerteig für Sauerteigbrot) oder durch kommerzielle Starterkulturen (Tab. 1). Die grösste Bedeutung haben Milchsäurebakterien (Lactic Acid Bacteria, LAB) und Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*).

Tabelle 1

Beispiele fermentierter Lebensmittel und ihrer assoziierten Starterkulturen

Produkt	Substrat	Mikroorganismen	Fermentationstyp
Käse (hart)	Milch	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp., <i>Brevibacterium</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	Starterkulturen, kombiniert mit spontanen MO
Weichkäse	Milch	LAB und <i>Penicillium</i> spp. <i>Geotrichum</i> spp.	Starterkulturen
Yogurt	Milch	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Starterkulturen
Butter, Quark, Sauerrahm	Milch	<i>Lactococcus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp.	Starterkulturen
Würste	Fleisch	<i>Pediococcus</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Carnobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Starterkulturen und spontane MO
Oliven, Sauerteigbrot, Sauerkraut	Diverse Pflanzen	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp.	Spontane MO
Sojasauce	Sojabohne	LAB, <i>Aspergillus oryzae</i> und <i>soyae</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Starterkulturen und spontane MO
Bier	Getreide Hopfen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Starterkulturen
Wein	Trauben	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> und andere Hefen; <i>Oenococcus oeni</i>	Starterkulturen und spontane MO

Quellen modifiziert nach Ross et al. (5) und Hansen (6)

Die Funktion der Starterkulturen ist sehr vielfältig, die Bedingungen der Fermentationen ebenso. Deswegen ist die grosse Diversität der Starterkulturen nicht überraschend. Die Hauptaktivität von Starterkulturen ist die Oxidation von Kohlehydraten prinzipiell zu Alkohol, Kohlendioxid und organische Säuren. Diese dienen unter anderem der Konservierung des Produktes, da das Wachstum der Begleitflora durch solche Metabolite oder allein schon durch Absenken des pH-Wertes vermindert oder gar verhindert wird. Sekundärmetaboliten, deren Struktur nicht immer bekannt ist, verleihen dem fermentierten Produkt oft eine bestimmte Geschmacksnote (z.B. Diacetyl und Acetaldehyd) oder eine veränderte und erwünschte Textur (z.B. durch *in situ* produzierte Exopolysaccharide). Eine andere Begleiterscheinung kann ein veränderter Nährwert sein, wenn die Starterkulturen Vitamine, Antioxidantien oder bioaktive Komponenten produzieren oder das Produkt so verändern, dass es für den Konsumenten besser verdaulich wird (Reduktion der Lactose und verändertes Proteinprofil am Beispiel Yogurt).

Am Beispiel Wurstfermentation zeigen sich weitere Aufgaben, welche MO (Starterkulturen und autochthone Flora) zu erfüllen haben. Neben der Absenkung des pH-Wertes durch *Pediococcus*- und *Lactobacillus*-Stämme zur Reduktion Gram-negativer Keime, erfüllen *Micrococcus*- und *Staphylococcus*-Stämme spezifi-

sche Funktionen: Synthese von Katalasen zum Abbau von Peroxiden und Schutz vor Ranzigkeit, von Nitratreduktasen zur Unterstützung der Umrötung (Nitrat-Reduktion zu Nitrit) und von Lipasen zur Bildung von geschmacksaktiven Komponenten aus Fett.

Schutzkulturen

Beim Konzept «Schutzkulturen» will man unerwünschte MO in Lebensmitteln durch den Zusatz von MO unterdrücken, anstatt bewilligte Konservierungsmittel einzusetzen. Deswegen spricht man auch von «Biokonservierung» oder in Englisch «biopreservation». Die eingesetzten MO sollten in der Regel das Produkt nicht verändern ausser es handelt sich um eine Kombination Starterkultur/Schutzkultur, d.h. eine Starterkultur besitzt neben den oben erwähnten generellen antimikrobiellen Wirkungen (vornehmlich durch organische Säuren und Wasserstoffperoxid) noch spezifische antimikrobielle Metabolite, z.B. Bacteriocine (3). Mit beiden Wirkungsmechanismen will man bestimmte pathogene Keime oder Verderber abtöten oder am Wachstum hindern, sei es durch Metabolite oder durch kompetitive Kolonisierung derselben Nischen.

Organische Säuren verändern das Membranpotential, beeinträchtigen den aktiven Stofftransport durch Membranen, reduzieren den internen pH und inhibieren Enzyme in Bakterien und Hefen/Schimmel (7). Als kommerzielle Schutzkulturen haben neben LAB auch Propionibakterien an Bedeutung gewonnen, weil diese das Wachstum von Hefen und Schimmel unterdrücken können. Dies ist eine Eigenschaft, die unter Schutzkulturen sehr gefragt ist. Vorerst hat man bei selektionierten Propionibakterien die antimikrobielle Wirkung vor allem der Propionsäure zugeschrieben. Doch wurden auch Bacteriocine in Propionibakterien entdeckt (8). Zudem konnten wir (und weitere Arbeitsgruppen) beobachten, dass ein synergistischer Effekt von Propionibakterien und LAB bei der Wachstumshemmung von Hefen und Schimmeln auftrat, der durch niedermolekulare Substanzen (und nicht ausschliesslich durch die bekannten Säuren Propionat, Acetat und Lactat) zustande kam (9; unpublizierte Daten). Nach einem ausgedehnten Screening von 200 *Propionibacterium*- und über 1500 *Lactobacillus*-Isolaten fanden wir einige wenige Zweierkombinationen (je ein *Lactobacillus*- und ein *Propionibacterium*-Isolat), welche die Hemmung von Hefen und Schimmeln positiv beeinflussten (Abbildung 2). Diese Hemmung tritt dann nahezu komplett ein, wenn abzentrifugierte Zellen (ca. 5×10^7 Propionibakterien und 1×10^8 Lactobazillen/g Yogurt) dem Yogurt beige-mischt wurden (Abbildung 2). Es scheint, dass die Zellen metabolisch aktiv sein müssen, doch vermehren sie sich nicht während der späteren Lagerung. Im dargestellten Experiment handelte es sich um Hefe/Schimmel-Isolate aus verdorbenen Yogurt-Proben, welche nicht-pasteurisierte Frischfrüchte enthielten. Dieser Art von Yogurt und natürlich anderen Lebensmitteln kann mit Hilfe unserer am weitesten entwickelten Schutzkultur (im Handel als «HoldbacTM YM-C») ein längeres «Shelflife» zugemutet werden.

Weit mehr eingesetzt werden Schutzkulturen, die antimikrobielle Substanzen mit Peptidcharakter, sogenannte Bacteriocine im Lebensmittel *in situ* produzieren; allein von LAB sind über 70 verschiedene Bacteriocine molekular charakterisiert worden (10). Zielorganismen, die erfolgreich unterdrückt werden können, sind meist die pathogenen Bakterien *Clostridium botulinum* und *Listeria monocytogenes*. Das bekannteste Bacteriocin ist Nisin, ein pentacyclisches Peptid von 34 Aminosäuren, das vermutlich Poren in Zellwände setzen kann, u.a. auch in Grampositiven Bakterien (11). Nisin-produzierende *Lactococcus*-Stämme oder dem Lebensmittel zugesetztes Nisin wird seit Jahrzehnten in der Milchindustrie verwendet. In der Schweiz ist Nisin bei Hartkäsen, Schmelzkäsen, Hefekuchen und Griesspudding als Konservierungsstoff (E 234) seit kurzem zugelassen (12).

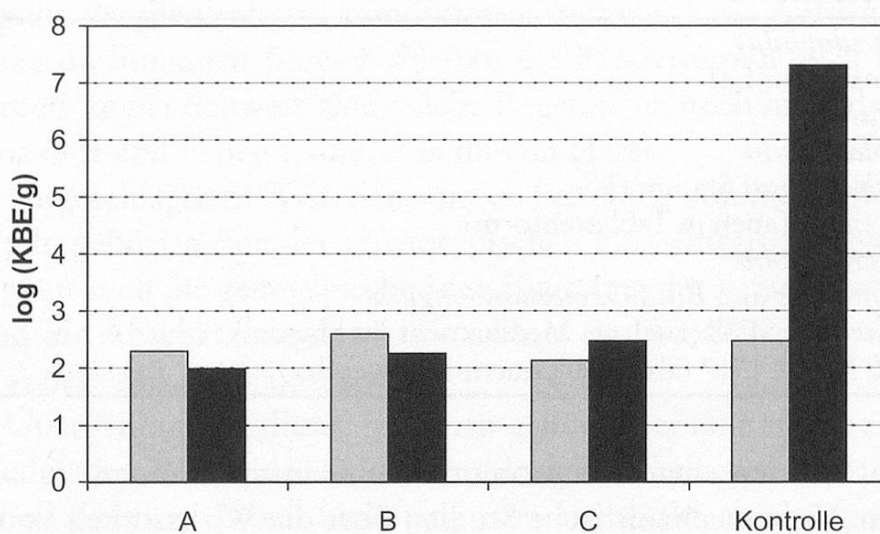


Abbildung 2 Entwicklung von Hefen in 3 Sauermilchproben mit *Propionibacterium-Lactobacillus*-Schutzkultur (A, B oder C) und in einer Kontrollprobe ohne Schutzkultur während einer Lagerung von 28 Tagen bei 6°C (□ Tag 1; ■ Tag 28).

Der Hefecocktail bestand aus je 50 ± 10 Zellen/g von *Candida pulcherrima* 1-50/13, *Candida magnoliae* 1-35/1, *Candida parapsilosis* 4-5/1 und *Zygosaccharomyces bailii* 1-48/1

Probiotika

Eine weitere Gruppe von MO, die in Lebensmitteln in hoher Zahl als Lebendkeime vorkommen, sind Probiotika. Nach dem probiotischen Konzept handelt es sich um Intestinalbakterien menschlichen Ursprungs, welche Lebensmitteln beigegeben werden und lebend den Intestinaltrakt (Magen, Dünndarm oder Dickdarm) des Konsumenten erreichen und dort eine positive Wirkung ausüben sollen, sei es durch Interaktion mit anderen Bakterien, mit der Mucosa oder letztlich dem Immunsystem (4). Probiotische Stämme werden am häufigsten fermentierten Lebensmitteln beigegeben (ohne dass sie an einer Fermentation teilnehmen, z.B.

Bifidobakterien), kommen aber auch in anderen Lebensmitteln (z.B. Riegel) auf dem Markt (Tab. 2).

Das Angebot an Probiotika ist nach wie vor überschaubar, wenig neue Stämme kommen auf den Markt. Weltweit gibt es im Bereich etwa der probiotischen Bifidobakterien nur wenig Stämme, *Bifidobacterium lactis* (13) wird weltweit gebraucht. Gelegentlich werden Probiotika auch in Tabletten- oder Kapselform angeboten oder von Ärzten abgegeben, ein Zeichen, dass die Grenzen zum Medikament verwischt sind. Verglichen mit vielen Starterkulturen hat der Konsument mit den eingesetzten Bakterienstämmen erst eine Kurzzeitkontaktphase hinter sich (Boom in der Schweiz erst in den 1990-er Jahren).

Tabelle 2

Häufigste Arten und Stämme von Probiotika in Schweizer Lebensmitteln oder in Kapseln-/Tablettenform

Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus johnsonii La1

Lactobacillus casei

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus rhamnosus Stamm GG

Lactobacillus reuteri (auch in Tablettenform)

Lactobacillus fermentum

Bifidobacterium lactis und *Bifidobacterium longum*

Enterococcus faecium SF68 (auch als Medikament im Handel)

Escherichia coli Nissle 1917 (als Medikament angewendet)

Einige Funktionen einzelner probiotischer Stämme sind mit *in vivo* Studien belegt worden. Viele mechanistische Studien über die Wirksamkeit von Probiotika sind kontrovers oder etwas mager ausgefallen, weil das Schicksal und die Interaktion von probiotischen MO im menschlichen Intestinaltrakt schwierig zu verfolgen und noch methodische Probleme zu lösen sind. Doch molekulare Methoden, wie etwa die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) kombiniert mit modernen Biopsie-Techniken (beispielhaft in Referenz 14) dürften in naher Zukunft die wissenschaftliche Basis liefern, ob ein Stamm oder ein Bakteriengemisch wissenschaftlich überprüfbare probiotische Eigenschaften *in vivo* (d.h. beim Konsumenten) ausübt. Der Bedarf einer besseren Organismenkenntnis steht an oberster Stelle.

Sicherheitsüberlegungen

Bestimmte Starterkulturen und einzelne Stämme haben eine lange Tradition in Lebensmitteln, weswegen die Sicherheitsfrage weit weniger gestellt wurde als bei den neu auf den Markt kommenden probiotischen MO und Schutzkulturen. Vor allem der Druck der Antibiotika-Resistenzgene hat eine bisher in Lebensmitteln nie da gewesene Dimension geschaffen (15), da transferierbare Antibiotika-Resistenzgene in relativ harmlosen kommensalen Bakterien aus Lebensmitteln gefunden wurden, u.a. in Stämmen von *Lactococcus* (15), *Lactobacillus* (16) und *Enterococcus* (17).

Da Antibiotika-resistente Enterokokken sehr häufig in tierischen Lebensmitteln als Kontaminanten vorkommen, als Drehscheiben für konjugativen Transfer von Resistenzgenen gelten und unter garstigen Lebensbedingungen in der Umwelt und im Intestinaltrakt des Menschen überleben, sind sie auch als Starterkulturen und Probiotika sehr kritisch zu untersuchen (18). Da ein reger Antibiotika-Resistenzgen-Austausch *in vitro* über die Artgrenze hinaus zu beobachten ist, kann man davon ausgehen, dass auch Starterkulturen, Probiotika und Schutzkulturen transferierbare Antibiotika-Resistenzgene tragen könnten, was wohl von niemandem gewünscht wird. Eine weitere ungewollte Dimension stellen Virulenzfaktoren in Enterokokken dar (19, 20).

In der EU ist das Problem der Antibiotika-Resistenzen in Bakterien der Futtermittel-Zusätzen (feed additives) von der SCAN (Scientific Committee on Animal Nutrition) angegangen worden (21). Nach deren Kriterien, die relative streng sind, erfüllen längst nicht alle Probiotika im Futtermittelbereich die Anforderungen. Für die Probiotika im humanen Bereich dürften die EU-Kriterien auch bald bekannt gegeben werden. In der Schweiz sind solche Regelungen noch nicht da (vgl. Beitrag von Christina Gut und Esben Laulund in diesem Heft).

Zu den vorgeschlagenen Kriterien, die es bei einer kommerziellen Kultur zu überprüfen gilt, gehört neben der phänotypischen Charakterisierung von Antibiotika-Resistenzen auch die genotypische Identifizierung der verantwortlichen Resistenzgene und die Abschätzung des Risikos einer Antibiotika-Resistenzgen-Übertragung auf andere Mikroorganismen.

Vor der Überprüfung all dieser Kriterien gehört aber eine saubere Typisierung, auch mit modernsten Methoden. Mit kommerziellen Kulturen ist das bisher nicht immer der Fall gewesen. Dabei kann eine Genomcharakterisierung wie z.B. beim probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 (22) oder mit gewissen Limitierungen auch Daten von Totalgenomsequenzen verwandter Stämme der gleichen Gattung oder Art herangezogen werden, wenn man die Genomsequenz des zu überprüfenden Stammes nicht zur Verfügung hat. Die modernsten Anwendungen aus der «Genomics und Proteomics»-Forschung sind aber immer noch etwas limitiert (23).

Ist ein potentiell anzuwendender Stamm in der ersten Entwicklungsphase, so kann man mit relativ einfachen Methoden eine Typisierung angehen. Mit der Technik der RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) konnten anhand eines DNA-Fragment-Bandenmusters (nach Gelelektrophorese in Agarose) unsere *Lactobacillus casei* und *paracasei*-Stämme klar von *Lactobacillus rhamnosus*-Stämmen differenziert werden (Abbildung 3).

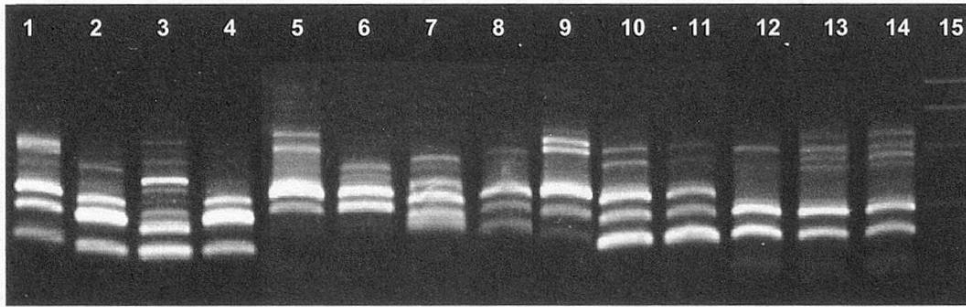


Abbildung 3 RAPD-PCR Fingerprinting von *Lactobacillus*-Stämmen mit Primer OPL-05 (24). 1, *Lb. casei* ATCC334; 2, *Lb. rhamnosus* LC705; 3, *Lb. rhamnosus* LMG18030; 4, *Lb. rhamnosus* DSM20021^T; 5, *Lb. casei* 160; 6, *Lb. zeae* DSM20178^T; 7, *Lb. casei* ATCC393^T; 8, *Lb. casei* SM41; 9, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T; 10, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM66; 11, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM65; 12, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM31; 13, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM30; 14, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* SM28; 15, 1-kb DNA-Leiter

Nach einer Typisierung und taxonomischen Einordnung kommt nun die aufwändige Überprüfung der oben erwähnten SCAN-Kriterien zur Anwendung. Als Beispiel ist hier der erste Schritt einer phänotypischen Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung dargestellt, die wir mit kommerziellen Bifidobakterien aus Yogurt mit probiotischem «Label» durchgeführt haben. Mit der Anwendung des E-Tests (AB Biodesk, Solna, Schweden) (Abbildung 4) haben wir auf MRS-Agar+Cysteinhydrochlorid (0,05 %) in der Anaerobenkammer minimale Memmstoffkonzentrationen (MICs) von Antibiotika unter Stämmen von *Bifidobacterium* bestimmt (Abbildung 4).

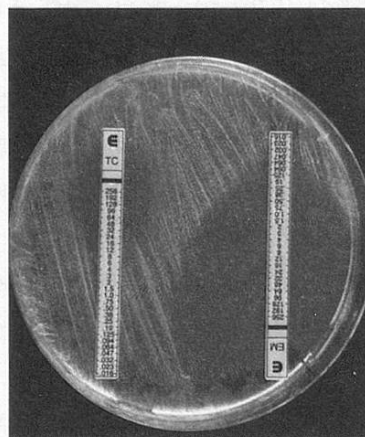


Abbildung 4 Bestimmung der MIC-Werte von Tetracyclin und Vancomycin eines *Bifidobacterium*-Isolates aus einer probiotischen Sauermilch. Streifen links enthält Gradienten mit Tetracyclin, Streifen rechts mit Vancomycin

Dabei zeigte sich, dass mehrere unserer Isolate aus Produkten mit probiotischem «Label» verglichen mit Stämmen von *Bifidobacterium longum* und *Bifidobacterium animalis* Tetracyclin-resistent waren (MIC \geq 16 μ g/ml) (Tab. 3).

Tabelle 3

Minimale Hemmkonzentrationen (MIC) von 6 Antibiotika¹⁾ in *Bifidobacterium* Stämmen

Stamm	Em (μ g/ml)	Gm (μ g/ml)	Km (μ g/ml)	Sm (μ g/ml)	Tc (μ g/ml)	Va (μ g/ml)
<i>B. longum</i> DSM 20219	0,064	192	>256	128	0,25	1,5
<i>B. animalis</i> DSM 20104	0,250	12	>256	32	1	1,5
<i>B. lactis</i> DSM 10140	0,190	>1024	>256	>1024	24	2,0
<i>Bifidobacterium</i> spp.-Isolat ²⁾	0,064	>1024	>256	>1024	16	1,5

¹⁾ Em: Erythromycin; Gm: Gentamycin; Km: Kanamycin; Sm: Streptomycin; Tc: Tetracyclin; Va: Vancomycin; grau unterlegte MIC-Werte liegen über dem MIC-Wert, welcher Resistenz bedeutet.

²⁾ Isolat aus kommerziellem «Bifidus-Yogurt».

Interessanterweise weist *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 (13) ein ähnliches Antibiotika-Empfindlichkeitsmuster auf wie praktisch alle Bifidobakterien-Isolate, die wir aus fermentierten Produkten des Marktes gefunden haben. Es ist bekannt, dass dieser Stamm häufig als Probiotikum verwendet wird. Wir analysieren im Moment, ob dafür eines der vielen bekannten Tetracycline-Resistenzgene für den beobachteten Resistenz-Phänotyp verantwortlich ist oder ob es sich wie im Fall von vermutlich Kanamycin um eine intrinsische Resistenz handelt und ob ein möglicher Transfer allfälliger Resistenzgene auf Rezipienten zu beobachten ist.

Zusammenfassung

Der Einsatz von bewährten und neuen Mikroorganismen in der Lebensmittelverarbeitung steigt ständig, ebenso die Exposition der Konsumenten mit drei Gruppen von Lebendkeimen, die in mehr oder weniger kontrollierter Weise in die Lebensmittel gelangen. Als erste Gruppe gehören Starterkulturen dazu, welche zur Entwicklung und Reifung eines Produktes zugesetzt werden oder die als autochthone Keime unter günstigen Lebensbedingungen ein Endprodukt mitformen. Neben Qualitätsverbesserungen wird durch produzierte Säure ein Schutz vor kontaminierenden Mikroorganismen erzielt. Diesen Schutzeffekt erzielt man auch mit der zweiten Gruppe, den Schutzkulturen, welche organische Säuren und andere niedermolekulare Metabolite oder Peptide, sogenannte Bacteriocine, produzieren und vor allem pathogene Mikroorganismen und verderbende Hefen und Schimmel am Wachstum hindern. Man spricht in diesem Fall von «Biopreservation». Probiotische Mikroorganismen bilden die dritte Gruppe von Lebendkeimen, die unter dem Aspekt «Gesundheitsförderung» Lebensmitteln zugegeben wird.

Die lange Tradition des Gebrauchs einer Kultur oder die taxonomische Zugehörigkeit eines Stammes zu einer bestimmten Spezies sind oft noch immer die einzigen Sicherheitsattribute für Produzenten und Behörden. Allerdings ist im vergangenen

Jahrzent eine neue Dimension für die Beurteilung im Bereich Lebensmittelsicherheit erkannt worden. Die Transferierbarkeit von Antibiotika-Resistenzgenen und Virulenzfaktoren ist nämlich über die Artgrenze von Bakterien hinweg auf fast beliebige kommensale Bakterien beobachtet worden, auch auf Milchsäurebakterien und Bifidobakterien. Dies lässt erwarten, dass vor allem Kulturen, die in neuerer Zeit entwickelt wurden, solche Resistenzgene enthalten könnten. Dank grossen Fortschritten in der molekularbiologischen Analytik wird vermutlich nun in diesem Jahrzehnt jeder einzelne Stamm (bewährt oder neu) besser untersucht werden müssen. Es gibt EU-Konzepte, welche dies fordern. An zwei Beispielen aus unserem Laboratorium wird die Umsetzung solcher Sicherheitsüberlegungen gezeigt und diskutiert.

Résumé

Les applications des microorganismes traditionnels et de nouvelles cultures en production alimentaire sont en expansion. Ainsi les consommateurs ingèrent des quantités croissantes de microorganismes vivants appartenant principalement à trois groupes. Le premier groupe est constitué par les cultures starters et les microorganismes autochtones impliqués dans la production et la maturation des produits alimentaires dont la qualité est ainsi améliorée et le développement de contaminants est prévenu par la production d'acides *in situ*. Un tel effet protecteur, appelé « bioconservation », est apporté par un deuxième groupe de microorganismes vivants regroupant les cultures protectrices. Ces cultures produisent des acides organiques et d'autres composés de faible poids moléculaires, dont des peptides antimicrobiens (bactériocines), qui inhibent les bactéries pathogènes et les contaminants fongiques (levures et moisissures). Les microorganismes probiotiques constituent le troisième groupe de microorganismes vivants qui proviennent principalement de l'intestin humain et qui sont utilisés pour leurs effets bénéfiques spécifiques sur la santé des consommateurs.

L'usage à long terme de certaines cultures spécifiques ou l'appartenance taxonomique des souches à certaines espèces constituent souvent le seul critère pour les producteurs et les organismes de contrôle fédéraux pour estimer la sécurité des microorganismes. A ce sujet, un nouvel aspect a été ajouté dans la dernière décennie : le potentiel de transfert des gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes de virulence de différentes espèces bactériennes à une large gamme de microorganismes commensaux, incluant les bactéries lactiques. Suite à des développements récents, les méthodes analytiques moléculaires permettent maintenant de réinvestir les caractéristiques des cultures industrielles en usage et de caractériser précisément les nouvelles cultures quand à la présence de tels gènes. De nouveaux concepts à cet effet sont en cours de développements dans la CE. Deux exemples sont présentés pour illustrer les premières étapes d'application de cette démarche pour garantir la sécurité des cultures utilisées dans la production des aliments.

Summary "Microorganisms as food additives: starters, protective cultures and probiotics"

There is an expanding range of applications of traditional and novel microorganisms being used in food production. Therefore, the consumers' exposition to living microorganisms belonging to three main groups is also increasing. As a first group, starter cultures and autochthonous microorganisms are involved in the production and ageing of a food product. Thereby, the quality can be improved and *in situ* produced acids prevent the outgrowth of contaminants. A similar protective effect, also called "biopreservation", is achieved by microorganisms from the second group, the protective cultures. They produce organic acids, and other low molecular compounds, such as antimicrobial peptides (bacteriocins), and suppress both bacterial pathogens and contaminating fungi (yeasts and moulds). Probiotic organisms belong to the third group of living microorganisms which are mainly originating from human intestines and which provide specific health benefits to the consumer.

The long-term usage of distinct cultures or the taxonomic position of defined strains within a species are often the single criteria available for safety assessments for producers and federal authorities. Concerning this point, a new dimension was recognized in the last decade: the transferability of antibiotic resistance and virulence genes among different bacterial species to a variety of commensal microorganisms, including lactic acid bacteria and bifidobacteria. Therefore, it can be expected that some traditional or newly developed food cultures contain such resistance genes. Due to recent improvements molecular methods can be used to reassess the characteristics of industrial strains or to accurately characterize new cultures for the presence of such genes. New concepts for this are developing within the EU. We present with two examples the first steps in the implementation of such safety considerations.

Key words

Starter cultures, biopreservation, probiotics, safety, antibiotic resistance

Literatur

- 1 Nissen H.W.: Grundzüge einer Geschichte der Frühzeit des Vorderen Orients, 3. Aufl., Darmstadt (1995)
- 2 Sauer M., Branduradi P., Valli M. and Porro D.: Production of L-ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. Appl. Environ. Microbiol. **70**, 6086–6091 (2004)
- 3 Holzappel W., Geisen R. and Schillinger U.: Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. **24**, 343–62 (1995)
- 4 Tannock G.W.: Probiotics and prebiotics: where we are going? Caister Academic Press, Norfolk, UK (2002)
- 5 Ross R.P., Morgan S. and Hill C.: Preservation and fermentation: past, present and future. Int. J. Food Microbiol. **79**, 3–16 (2002)

- 6 Hansen E.B.: Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* **78**, 119–131 (2002)
- 7 Doores S.: Organic acids. In: *Antimicrobials in foods*. 2nd ed., pp. 95–136, Davidson, P.M., Branen, A.L. (eds.). Marcel Dekker Inc., New York (1993)
- 8 Holo H., Faye T., Brede D.A., Nilsen T., Odegard I., Langsrud T., Brendenbaug J. and Nes I.F.: Bacteriocins of propionibacteria. *Lait* **82**, 59–68 (2002)
- 9 Miescher Schwenniger S. and Meile L.: A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *System. Appl. Microbiol.* **27**, 229–37 (2004)
- 10 Nes I.F. and Holo H.: Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* **55**, 50–61 (2000)
- 11 Dutton C.J., Haxell M.A., McArthur H.A.I. and Wax R.G.: Peptide antibiotics, discovery, modes of action and applications. Marcel Dekker Inc., New York (2001)
- 12 Anonymus: *Chemische Konservierungsmittel in Lebensmitteln*. Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kap. 44, Absatz 9 (2001)
- 13 Meile L., Ludwig W., Rueger U., Gut C., Kaufmann P., Dasen G., Wenige S. and Teuber M.: *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *System. Appl. Microbiol.* **20**, 57–64 (1997)
- 14 Valeur N., Engel P., Carbajal N., Connolly E. and Ladefoged K.: Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1176–1181 (2004)
- 15 Perreten V., Schwarz F., Cresta L., Boeglin M., Dasen G. and Teuber M.: Antibiotic resistance spread in food. *Nature* **389**, 801–802 (1997)
- 16 Gfeller K.Y., Roth M., Meile L. and Teuber M.: Sequence and genetic organization of the 19.3-kb erythromycin- and dalfopristin-resistance plasmid pLME300 from *Lactobacillus fermentum* ROT1. *Plasmid* **50**, 190–201 (2003)
- 17 Giraffa G.: Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:163–171 (2002)
- 18 Franz C.M.A.P., Holzappel W.H. and Stiles M.E.: Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **47**, 1–24
- 19 Eaton T.J. and Gasson M.: Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1628–35 (2001)
- 20 Franz C.M., Muscholl-Silberhorn A.B., Yousif N.M., Vancanneyt M., Swings J., Holzappel W.H.: Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4385–4389 (2001)
- 21 SCAN. Report revised on 24 January 2003.
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out121_en.pdf (2003)
- 22 Grozdanov L., Raasch C., Schulze J., Sonnenborn U., Gottschalk G., Hacker J. and Dobrindt U.: Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **186**, 5432–5441 (2004)
- 23 Nes I.F. and Johnsborg O.: Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 100–104 (2004)
- 24 Miescher Schwenniger S., von Ah U., Niederer B., Teuber M. and Meile L.: Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *J. Food Prot.* (*in press*) (2005)

Korrespondenzadresse: PD Dr. Leo Meile, Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften, ETH Zentrum, CH-8092 Zürich,
E-Mail: leo.meile@ilw.agrl.ethz.ch