

Entwicklung und Qualitätsmerkmale von Probiotika

Prof. Wolfgang Kneifel (Wien)

1. Probiotika in Futter- und Lebensmitteln – gemeinsame Geschichte, viele Parallelen

Auch wenn die oft zitierten, historischen Wurzeln der humanernährungsrelevanten Probiotika bereits bis an den Anfang des 20. Jahrhunderts zurückreichen, so kommt der eigentlich erst viel später erfolgten Anwendung probiotischer Mikroorganismen in der Tierernährung dennoch eine gewisse „Geburtsheiferfunktion“ für probiotische Lebensmittel zu. Dies ist dadurch begründbar, dass die Wiederentdeckung des probiotischen Konzepts für die Tierfütterung gegen Ende der sechziger Jahre, nach den dort beobachteten Erfolgen, etwa in der Mitte der achtziger Jahre auch die Anwendung in Lebensmitteln stimuliert hat. In beiden Bereichen zeichnet sich heute nach wie vor ein starkes Wachstums- und Anwendungspotenzial ab.

Die Parallelen der Entwicklung von Probiotika besitzen aber nicht nur eine historische, sondern auch eine biologische Relevanz, denn zunehmend kristallisiert sich heraus, dass bestimmte Gattungen und Spezies von Milchsäurebakterien sowohl im humanen als auch im tierischen Anwendungsbereich positive Wirkungen besitzen (REUTER, 2001). Auf der anderen Seite verlieren jene in Tierfutter verwendeten Bakteriengattungen an Bedeutung, die aufgrund aktueller Sicherheitsüberlegungen einer kritischen Betrachtung unterzogen werden (BECQUET, 2003; VON WRIGHT, 2005). Neuere Studien liefern wiederum interessante Hinweise darüber, dass Milchsäurebakterien bei Mensch und Tier nicht nur eine positive Bedeutung für den Darm, sondern aufgrund antagonistischer Effekte auch generell für Schleimhautsysteme besitzen können (MAGNUSSON et al., 2003; OUWEHAND et al., 2003).

In diesem Zusammenhang ist es daher nahe liegend, auch die Definition des Begriffes „Probiotikum“ neu zu überdenken. Die Bezeichnung „probiotisch“ stammt ursprünglich aus dem Griechischen („*pro bios*“ bedeutet „für das Leben“) und wurde vor ca. vierzig Jahren erstmals geprägt. Einerseits lässt dieser Name berechtigte Hinweise in Richtung eines besonderen biologischen Nutzens, andererseits aber auch zu verschiedenen gesundheitsrelevanten Eigenschaften zu. Versucht man die im Laufe der Jahre wissenschaftlich dokumentierten positiven Eigenschaften zusammenfassend zu aktualisieren, so bietet sich aufgrund der derzeitigen Sachlage folgende allgemeine Definition an: „Probiotika sind Mikroorganismen, die das Wohlbefinden von Tier und Mensch fördern bzw. einen gesundheitlichen Nutzen besitzen.“ Auf den ersten Blick erscheint diese Erklärung möglicherweise zu allgemein, unterscheidet sie sich doch von den ursprünglichen, wesentlich konkreteren Erklärungen wie z. B. „...lebende Mikroorganismen, die bei regelmäßiger Zufuhr das Wohlbefinden fördern, indem sie die intestinale Mikroflora beeinflussen...“ deutlich. Dennoch erscheint obiger, allgemein gehaltener Definitionsvorschlag aus folgenden Gründen als sinnvoll:

1. Zahlreiche Studien haben inzwischen gezeigt, dass bestimmte probiotische Eigenschaften nicht nur von einer aktiven, lebenden Mikroflora initiiert werden, sondern (vor allem im immunologisch relevanten Bereich) auch von inaktivierten oder autolytierten Bakterienzellen ausgehen können. Hierzu liegen vor allem Erfahrungen mit Präparaten aus der medizinischen Praxis vor.

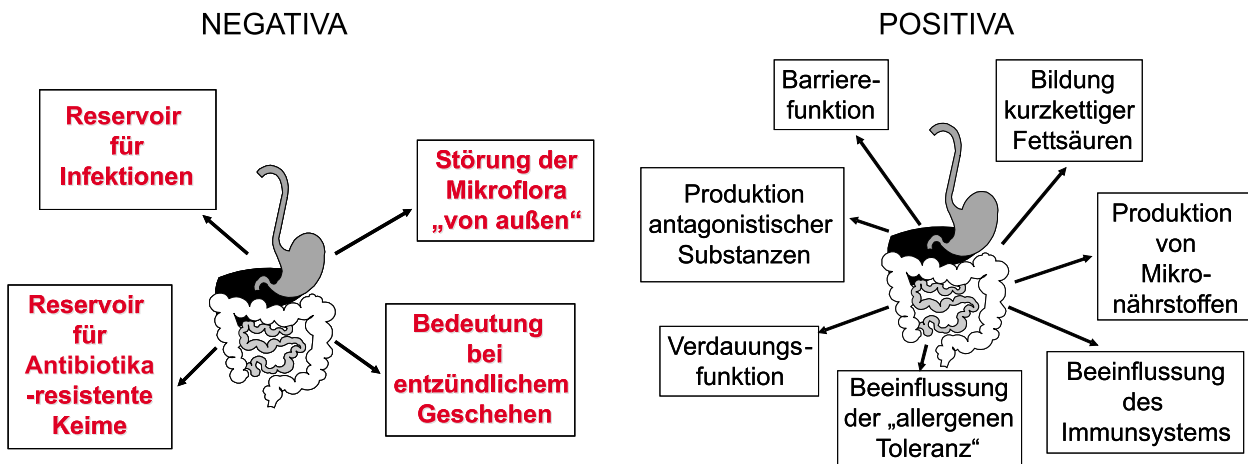
2. Auch die regelmäßige Zufuhr ist nicht für alle probiotischen Effekte zwingend erforderlich, weil manche der immunologisch relevanten Reaktionen auch durch einmalige Gaben (auch im Sinne von Booster-Effekten) initiiert werden können.
3. Die intestinale Mikroflora, die nach neuerer wissenschaftlicher Auffassung als „Mikrobiota“ zu bezeichnen ist, stellt zwar die im Zusammenhang mit Probiotika wichtigste „Wirkungsadresse“ dar, dennoch eröffnen sich zunehmend auch andere, darmunabhängige Anwendungsgebiete (z. B. im gynäkologischen oder dermatologischen Bereich).

Jenen für eine allgemeinere Definition sprechenden Gründen kann dennoch entgegen gehalten werden, dass die engere Definition eventuell als Vorgabe zu sehen ist und tatsächlich nur jene Produkte als Probiotika in Betracht zu ziehen sind, die oral verabreicht ihre Wirkung in lebender Form im Darm erzielen. Fraglich ist nur, ob eine solche Einschränkung aus praktischer Sicht Sinn macht und nicht auch andere Wirkungen und Anwendungsgebiete ihre Berechtigung für eine besondere Bezeichnung oder Auslobung haben sollten. Trotz einer allgemeinen Definition sollte schließlich auch konkret nach den unterschiedlichen Effekten und Wirkmechanismen, die durch einschlägige klinische Studien (nicht nur mit dem Bakterienstamm, sondern auch mit dem als Vektor fungierenden Anwendungsprodukt) zu belegen sind, unterschieden werden. Beispielsweise wären dann unter anderem spezifische Attribute wie „darmflorastabilisierend“ oder „wachstumsfördernd“ im Futtermittelbereich, „immunsystemstimulierend“ oder ebenfalls „darmflorastabilisierend“ bzw. „darmtransitzeitbeschleunigend“ bei Lebensmitteln gerechtfertigt.

2. Die Darmflora von Mensch und Tier – die „Spitze des Eisbergs“

Der Darm von Mensch und Tier zählt bekanntlich zu den kompliziertesten mikrobiellen Ökosystemen, die wir kennen. Obwohl die Vielfalt an Funktionen, die die Darmflora erfüllen kann, weitgehend bekannt ist (vgl. Abb. 1), ist die Identität und die Zusammensetzung der Mikrobiota noch immer nicht ausreichend geklärt (DOHMS, 2004). Gemessen an der Tatsache, dass der Darminhalt von Mensch und Tier zu mindestens 30 % aus Bakterienmasse besteht und dies letztlich eine mit der modernen Biotechnologie praktisch nicht zu übertreffende Zellzahl von bis zu 10^{14} repräsentiert, kann davon ausgegangen werden, dass die bislang geschätzte Anzahl von ca. 400 Spezies *in vivo* noch bei weitem überschritten wird. Andererseits ist aber auch nicht auszuschließen, dass es z. B. während oder nach einer Antibiotikabehandlung zu einer Verarmung der Mikroorganismenpopulation und -diversität im Darm kommt, was zu Mangel- oder Fehlfunktionen führen kann. Ebenfalls größtenteils ungeklärt ist die Frage, in welcher Form Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen untereinander (z. B. „Quorum Sensing“) sowie zwischen Mikrobiota und Wirtsorganismus möglich sind. Erwiesenermaßen tragen hier die so genannten Implizitfaktoren einen wesentlichen Beitrag zur mikrobiologischen Situation bei, indem komplexe Synergismen und Antagonismen ermöglicht werden, die teilweise eine Voraussetzung für die Nährstoffnutzung des Körpers sind (FREITAS et al., 2003; NEISH, 2002).

Abbildung 1: Eigenschaften und Funktionen der Darmflora – Überblick



3. Probiotika – wertvolle Nahrungs- bzw. Futtermittelbestandteile und interessante Alternative

Vor dem Hintergrund aktueller Krisen in der Futter- und Lebensmittelindustrie wie z. B. Rinderwahn, Antibiotika, Dioxin, Acrylamid etc.) und der dadurch zunehmenden Verunsicherung der Konsumenten sind hochwertige Lebensmittel zu einem in der Öffentlichkeit heftig diskutierten Thema geworden. Zwangsläufig entwickelten sich in den letzten Jahren neue Marktsegmente, von denen der Bereich des Functional Food, unter ihnen vor allem die probiotischen Milchprodukte, die größte wirtschaftliche Bedeutung und Produktvielfalt erlangt haben. Auch in der Tierernährung wurden durch die Einführung der Probiotika neue Wege beschritten, um über die Stabilisierung und Förderung der Darmflora wichtige Beiträge zur Tiergesundheit und zu deren Wachstum zu leisten. Demzufolge wäre in Analogie zur Lebensmittelbranche dort die Bezeichnung „Functional Feed“ durchaus gerechtfertigt. Probiotische Futtermittel werden bereits als natürliche Alternative zur widersprüchlich diskutierten, präventiven Anwendung von Antibiotika angesehen und werden diese vermutlich nach deren gesetzlich geregelter Abschaffung ersetzen. Einige Unternehmen haben diese wichtige Bedeutung bereits erkannt und investieren seit Jahren ein hohes Forschungspotenzial in die Entwicklung und die Qualitätsverbesserung solcher Produkte. Auf diese Weise soll dem weltweit wachsenden Bedarf an natürlichen, aber dennoch wirksamen Futtermitteln begegnet werden.

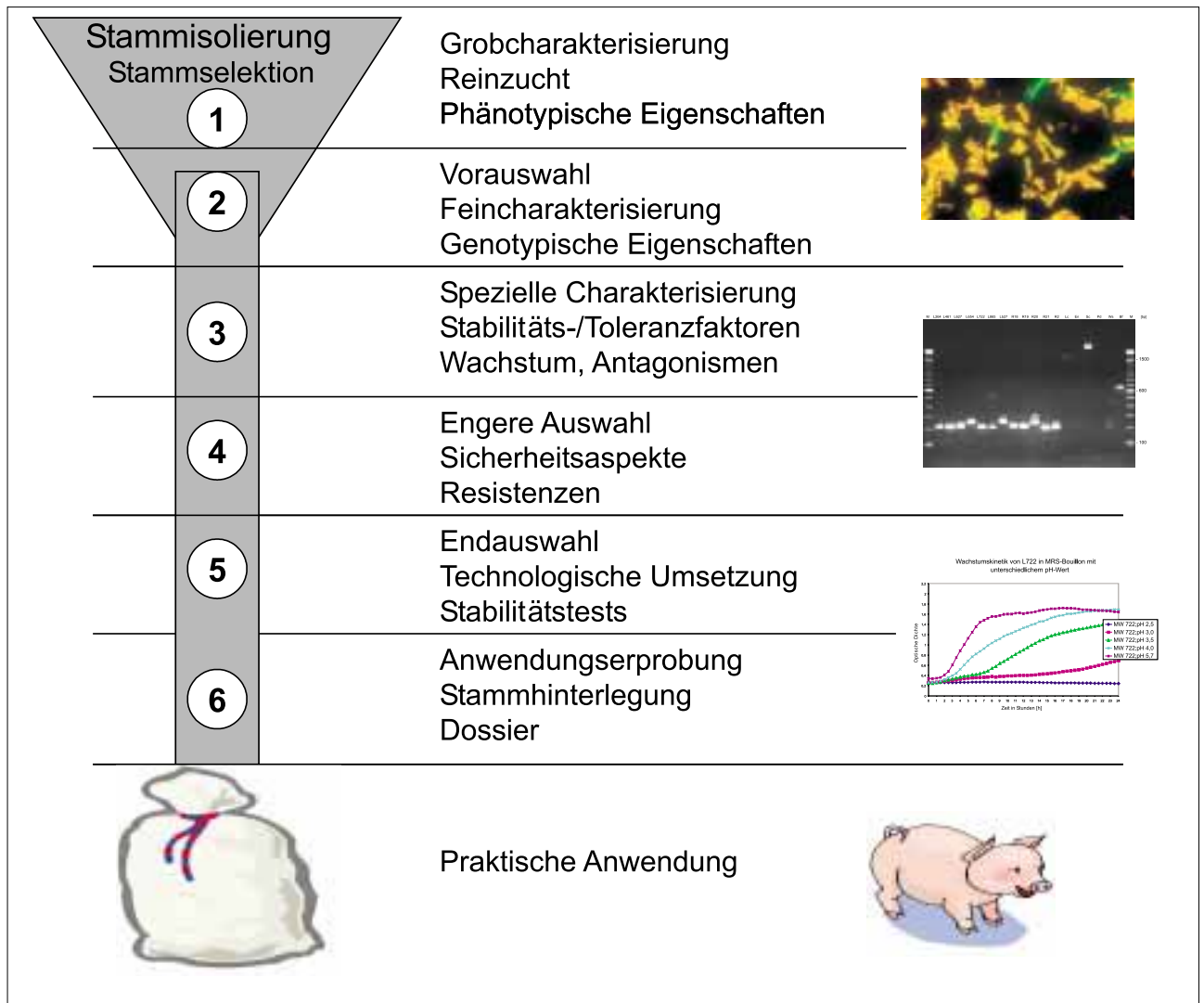
4. Die Entwicklung probiotischer Futtermittel – Bakterien aus dem Darm für den Darm

Die Strategie der Entwicklung probiotischer Futtermittel ist der bei Lebensmitteln angewandten sehr ähnlich. In beiden Bereichen wird es als vorteilhaft erachtet, wenn die gesuchten Bakterienstämme physiologisch sind, d. h. im jeweiligen Verdauungstrakt typisch und natürlich vorkommen. Diese Eigenschaft kann mehr oder weniger als Garantie dafür angesehen werden, dass der betreffende Keim an den Ziel- bzw. Wirtsorganismus angepasst oder für diesen zumindest nicht fremd ist. Die meisten der heute verwendeten probiotischen Futtermittelkeime stammen aus dem Darm ausgewählter, gesunder Jungtiere. Isolate werden entweder im natürlichen Umfeld der Tiere oder im Schlachthof gewonnen. Abbildung 2 gibt eine allgemeine Übersicht über die einzelnen Phasen der Forschung und Entwicklung probiotischer Keime für den Einsatz in Futtermitteln.

Zu Beginn erfolgt ein umfassendes Selektionsverfahren auf der Basis selektiver Isolierungs- und Reinzuchtverfahren. Bereits der lokale Ursprung, genauer gesagt die Frage, ob das Isolat aus dem Darminhalt bestimmter Segmente oder aus dem Geschäbel der Mucosa stammt, bedeutet ein wichtiges selektives Kriterium und lässt unter Umständen auch Rückschlüsse auf dessen physiologische Eigenschaften zu. Die eindeutige Klärung der Identität der Bakterienstämme ist heute unumgänglich. Zu diesem Zweck werden mit den Isolaten biochemische und molekularbiologische Analysen durchgeführt und die Resultate mit jenen von zertifizierten Referenzstämmen aus internationalen Stammsammlungen verglichen. Wie erwähnt, sind die meisten probiotischen Bakterienstämme heute der heterogenen Gruppe der Milchsäurebakterien zuzuordnen. Ob sie letztlich auch probiotische Funktionen erfüllen oder nicht, hängt davon ab, welche besonderen positiven Eigenschaften ihnen attestiert werden können. Diese Besonderheiten werden in umfangreichen Testreihen ermittelt und unterscheiden die Bakterienstämme von den übrigen, die z. B. als reine Fermentationskeime - etwa in der Silagebereitung - verwendet werden. Selbst dort konzentriert man sich bereits zunehmend auf zusätzliche „Mehrwerteigenschaften“ der Säuerungsflora wie etwa auf die Hemmwirkung gegenüber Verderbs- oder pathogenen Keimen.

Während für Humanapplikationen die in Übersicht 1 aufgelisteten Eigenschaften relevant sind (Anm.: probiotische Stämme erfüllen immer nur bestimmte, nicht alle dieser Kriterien), wird in der Tierernährung in erster Linie auf die Wachstumsförderung der Nutztiere und die Sicherung bzw. präventive Unterstützung des Gesundheitszustandes Wert gelegt (VANBELLE et al., 1990). Solche Aspekte spielen in der Tierhaltung bekanntlich vor und während der Absetzphase eine wichtige Rolle (SIMON et al., 2001). Diese gesundheitlich relevanten bzw. fütterungsspezifischen Kriterien sind aber nicht die einzigen Parameter, die im Rahmen der Produktentwicklung Berücksichtigung finden müssen. In einer kürzlich verfassten Arbeit präsentierten WEISS und Mitarbeiter (2005) einen Überblick und eine exemplarisch dargestellte Anwendung der Vielzahl an Selektionskriterien für Probiotika. Neben erwünschten Resistenzfaktoren wie der Säure- und Gallensalzstabilität nehmen unter anderem auch Aggregationsphänomene, Wechselwirkungen mit der Mucosa und wirtsspezifische Faktoren eine wichtige Bedeutung bei der Stammaswahl ein. Häufig werden *in vitro* Tests und Zellkulturmodelle angewendet, um solche Kriterien zu überprüfen. Probiotische Bakterien können ihre Wirkung

Abbildung 2: Generelle Phasen der Isolierung und Entwicklung probiotischer Bakterien für Futtermittel



nur dann entfalten, wenn sie nach der Futteraufnahme durch das Tier in ausreichender Zahl bestimmte Regionen im Verdauungstrakt erreichen. Man ist heute in der Lage, das Schicksal der Keime im Verdauungstrakt in computergesteuerten Verdauungsreaktoren zu studieren, noch bevor deren Darmpassage im Tierversuch monitiert wird. Zur Aufklärung dieser Phänomene und ihrer Überlebensfähigkeit wurden vor allem in den letzten Jahren neue molekularbiologische Testverfahren entwickelt, die in der Lage sind zu demonstrieren, in welcher physiologischen Phase des Wachstums oder Zelltods sich die Bakterien befinden.

Auf Basis EU-weit geltender Beurteilungskriterien unterliegen probiotisch wirksame Keime für den Einsatz in der Tierernährung heute strengen gesetzlichen Bestimmungen, die auf Sicherheitsanforderungen beruhen, die, was die Beweisführung ihrer Ungefährlichkeit, der positiven Wirkung und der Anwendungseignung anbelangt, jene für lebensmittelrelevante Bakterien weit übertreffen. Futtermittel stehen bekanntlich am Beginn der Nahrungsmittelkette. Aus diesem Grund ist man der Ansicht, dass jegliches gesundheitliches Risiko überprüft und ausgeschlossen werden sollte (GUEIMONDE et al., 2004). Ständig steigende Qualitätsanforderungen an Probiotika haben weiterhin dazu geführt, dass künftig nur noch jene Produkte im europäischen Raum zugelassen werden, die

Übersicht 1: Zusammenfassung der wichtigsten dokumentierten Positiveigenschaften von Probiotika in der Humanernährung (weiterführende Literatur beim Verfasser)

- Verbesserte Lactoseverdauung
- Wirkung gegen Rotavirus- und Antibiotika-induzierte Diarrhoe
- Stimulierung des Immunsystems
- Stimulierung der Darmmotilität und -peristaltik
- Reduzierung unerwünschter fäkaler Enzymaktivitäten
- Wirkung gegen Helicobacter pylori
- Stabilisierungseffekte bei Morbus Crohn
- Verkürzte Ausscheidungszeit von Salmonellen

mikrobiologisch exakt definiert sind, hohe Stabilität und Keimdichte aufweisen und darüber hinaus mehrfach wissenschaftlich getestet sind.

Unter den Sicherheitsaspekten nimmt heute die Prüfung übertragbarer Antibiotikaresistenzen eine zentrale Stellung ein.

lung ein. Hier gilt abzuklären, ob bei Vorhandensein natürlicher Resistenzen gegenüber Antibiotika(gruppen), diese Eigenschaften unter bestimmten Umständen auch auf andere (unerwünschte oder pathogene) Bakterien übertragen werden können. Die dem ehemaligen SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION (2003) nachfolgende Expertengruppe der European Food Safety Authority hatte in ihrem zuletzt zur Diskussion stehenden Arbeitspapier die ursprünglichen Grenzwerte der minimalen Hemmkonzentrationswerte teilweise noch erniedrigt (d. h. verschärft) sowie die Liste der zur Debatte stehenden Antibiotikaresistenzen um zwei Substanzen, Clindamycin und Neomycin, erweitert (EFSA, 2004). Demzufolge wird sich für die Kulturenproduzenten und -lieferanten ein neuer Handlungsbedarf ergeben, sollte nicht a priori bewiesen werden können, dass die bereits vorliegenden Grenzwertbefunde ausreichen. Besonders kritisch ist hierbei anzumerken, dass die Analytik zur Prüfung der Hemmkonzentrationswerte nach wie vor nicht standardisiert ist und inzwischen auch festgestellt wurde, dass bedingt durch Prüfmedien und -methodenabhängige Einflüsse die Zuverlässigkeit der ermittelten Daten problematisch sein kann (EFSA, 2004; KOETH et al., 2000). Es darf nicht vergessen werden, dass die hier zur Verfügung stehenden Methoden aus dem humanen Applikationsbereich der Pathogenanalytik für die Anwendung auf kommensale und primär harmlose Mikroorganismen erst adaptiert werden müssen.

Sind die Identitäts-, Sicherheits- und Wirkungseigenschaften geklärt und bewiesen (in erster Konsequenz erfolgt dann zumeist die offizielle Hinterlegung der Bakterienstämme in einer internationalen Kulturensammlung), wird in der Folge ein anwendungsgerechtes Produkt formuliert. Die technologische Umsetzung ausgewählter Stämme in Richtung von Bakterienkonzentratpulvern und Futtermittelsupplementen setzt jedoch die Überprüfung weiterer Kriterien wie z. B. der Wachstumsaktivität, der Fermentationseigenschaften und Nährmedienansprüche sowie der Kultivierbarkeit der Bakterien voraus. Aus der Sicht des Endanwenders ist schließlich entscheidend, ob das Produkt auch dann ausreichend stabil ist, wenn Faktoren wie Lagerungsdauer, Temperatureinwirkung, Sauerstoff und Begleitkomponenten wie z. B. Mineralstoffe zum Tragen kommen. Den Abschluss bilden schließlich klinisch begleitete Anwendungsversuche, deren wissenschaftliche Qualität in Form von Publikationen in Fachjournals zu messen sein wird. Diese sind nicht zuletzt eine wichtige Voraussetzung für die offizielle Zulassung bei der Behörde.

5. Interdisziplinärer Ansatz mit Zukunftsperspektiven - Schlussfolgerungen

Aus obigen Ausführungen kann geschlossen werden, dass die Entwicklung probiotischer Futtermittel keine rein mikrobiologische Domäne darstellt, sondern die verschiedensten Fachdisziplinen (Mikrobiologie, Molekularbiologie, Veterinärmedizin, Toxikologie, Bio- und Prozesstechnologie, Landwirtschaft, Rechtswissenschaften usw.) dazu ihre Beiträge leisten müssen. Aus einer Vielzahl von Einzelisolaten werden somit in aufwändigen Auslese- und Prüfverfahren diejenigen Bakterienstämme ausgesucht, die den probiotischen und technologischen Zielkriterien am besten entsprechen. Inwieweit sie dann zum gewünschten Erfolg führen, werden nicht zuletzt ihr wiederholter Einsatz und ihre Bewährung in der Praxis zeigen. Unbestritten ist, dass die Mikrobiota des Darms generell, aber auch im Detail, wichtige Schlüsselfunktionen für das Wohlbefinden, den Stoffwechsel und die Nährstoffversor-

gung sowie für das immunologische Potenzial des tierischen und menschlichen Organismus besitzen. Die im Rahmen der Probiotikaforschung gewonnenen Erkenntnisse geben uns Aufschluss über wichtige Fragen und gelten als wertvoller Grundstock für zukünftige Entwicklungen auf dem Nahrungs- und Futtermittelsektor.

6. Bibliographie

- BECQUET, P (2003): EU assessment of enterococci as feed additives. *Int. J. Food Microbiol.* 88:247-254
- DOHMS, J (2004): Aspekte der Darmgesundheit und Chancen für den Einsatz von Probiotika. *Lohmann Information* 4/2004:1-4
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2004): Working document of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria to antibiotics of human or veterinary importance (Question Nr. EFSA-Q-2004-079)
- FREITAS, M., TAVAN, E., CAYUELA, C., DIOP, L., SAPIN, C., TRUGNAN, G. (2003): Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biology of the Cell* 95:503-506
- GUEIMONDE, M., OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S. (2004): Safety of probiotics. *Scand. J. Nutr.* 48:42-48
- KOETH, L., KING, A., KNIGHT, H., MAY, J., MILLER, L., PHILLIPS, I., POU-PARD, J. (2000): Comparison of cation-adjusted Mueller-Hinton broth with Iso-Sensitest broth for the NCCLS broth microdilution method. *J. Antimicrobial Chemotherapy* 37:239-253
- MAGNUSSON, J., STRÖM, K., ROOS, S., SJÖGREN, J., SCHNUEERER, J. (2003): Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:129-135
- NEISH, A.S. (2002): The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes and Infection* 4:309-317
- OUWEHAND, A.C., BATSMAN, A., SALMINEN, S. (2003): Probiotics for the skin: a new area of potential application? *Let. Appl. Microbiol.* 36:327-331
- REUTER, G. (2001): Probiotics – possibilities, limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. *Berl. Muench. Tierärztl. Wochenschr.* 114:410-419
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION (SCAN) (2003): Opinion of the SCAN on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human clinical and veterinary importance. EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003
- SIMON, O., JADAMUS, A., VAHJEN, W. (2001): Probiotic feed additives – effectiveness and expected modes of action. *J. Animal Feed Sci.* 10 (Suppl. 1):51-67
- VANBELLE, M., TELLER, E., FOCANT, M. (1990): Probiotics in animal nutrition. *Arch. Tierernaehr.* 40:543-567
- VON WRIGHT, A. (2005): Regulating the safety of probiotics – the European approach. *Curr. Pharm Des.* 11:17-23
- WEISS, A., LETTNER, H.P., KRAMER, W., KNEIFEL, W. (2005): Evaluation of selection criteria for probiotic *Lactobacillus* strains with relevance in the food and feed area. *Subm. for publ.*

Anschrift des Verfassers

Prof. Dr. Wolfgang Kneifel
Department für Lebensmittelwissenschaften
& -technologie
Abteilung Lebensmittelqualitätssicherung
Universität für Bodenkultur
Muthgasse 18
A-1190 Wien
Österreich

E-Mail: wolfgang.kneifel@boku.ac.at