

Charakterisierung und genetische Optimierung von Lactobacillen für Anwendung in probiotischen Milchprodukten.

MSc Elsayed Elsayed Aly Ismail

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Heller

Lactobacillen werden weltweit für die Herstellung fermentierter Lebensmittel benutzt. Neben ihrer Eignung als Säuerungsorganismen besitzen einige Stämme der Lactobacillen probiotische Eigenschaften. Um Bakterien als Probiotica nutzen zu können, ist eine korrekte Identifizierung und Evaluierung dieser Stämme unumgänglich. Das Ziel dieser Studie war es deshalb eventuell probiotische Lactobacillen-Stämme unterschiedlichster Herkunft (fermentierte Milchprodukte aus Ägypten, Fäzes von zwei neugeborenen Zwillingen) zu charakterisieren. Durch Klonierung und anschließender Übertragung eines Gens für eine Gallensalz-Hydrolase wurde zudem versucht, die probiotischen Eigenschaften einiger Stämme von Lactobacillen zu verbessern.

Kapitel I dieser Arbeit befasst sich mit der exakten Identifizierung von 26 Lactobacillus-Isolaten mittels molekularbiologischer Methoden wie ARDRA, PFGE und Sequenzierung von 16S rRNA Genen.

In Kapitel II werden probiotische Eigenschaften dieser Stämme, wie Säure- und Gallensalztoleranz sowie deren antibakteriellen Aktivitäten und ihre Empfindlichkeiten gegenüber 13 Antibiotika beschrieben.

Resistenz gegen Gallensalze ist ein wichtiges Kriterium für die Selektion und die Etablierung von probiotischen Stämmen. Die meisten der untersuchten Stämme zeigten eine gewisse Basistoleranz gegenüber Gallensalzen. Um dies zu erhöhen wurde das Gen *cbh* für eine Gallensalz hydrolase (conjugated bile salt hydrolase) aus *Lactobacillus plantarum* kloniert und in verschiedenen Lactobacillus-Spezies transformiert. Das *cbh*-Gen und seine regulatorischen Sequenzen (Promotor, Ribosomen-Bindungsstelle, Terminator) wurden mittels PCR amplifiziert und in *E. coli* Klonierungsvektoren eingebaut. In *E. coli* wurde das Gen solchermaßen stark exprimiert, dass eine direkte Identifizierung transformierter Zellen möglich war. Das Gen eignet sich daher als ein „Food-Grade“ Indikator Gen. Das *cbh*-Gen wurde anschließend in verschiedenen *E. coli*/Lactobacillus Shuttle-Vektoren rekloniert und in verschiedenen Lactobacillus Spezies (*L. casei*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus*) exprimiert. Die Hydrolaseaktivität führte immer zu einer signifikanten Erhöhung der Resistent transformierter Stämme gegen Ochsen-galle sowie Glyco- und Taurodeoxicholsäure.

Wichtig für das Überleben probiotischer Bakterien im Produkt und im Verdauungstrakt des Konsumenten sind deren Verhalten gegenüber Bakteriophagen sowie ihre autolytischen Aktivitäten. In Kapitel IV werden Fragen zur Lysogenie und Autolyse einiger Lactobacillen Stämme beantwortet. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ein temperenter Bacteriophage, *phiLbgas1*, aus *L. gasseri* isoliert und charakterisiert, sowie ein prophagen-freies Derivat dieses Stammes hergestellt.

Für eine abschließende Bewertung der untersuchten Stämme als Probioticum sind in-vivo Studien zum Überleben dieser Stämme in einem tierischen Modell wie z.B. in Göttinger Minischweinen geplant. Die Ergebnisse solcher Studien könnten die Basis bilden für eine anschließende Evaluierung potentieller, gesundheitsfördernder Eigenschaften ausgewählter Stämme.

