

Angefertigt im Deutschen Institut für Ernährungsforschung

Eingereicht über den Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Prüfung der Essentialität lebender Keime für die
Förderung der intestinalen Laktosehydrolyse durch die
mikrobielle β -Galactosidase fermentierter
Milchprodukte am Model des gnotobiotischen Göttinger
Minischweins**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors

vorgelegt von
Andrea Winchenbach
Tierärztin aus Salzhemmendorf

Berlin 1998

Journalnummer: 2172

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Laktosemalabsorption	3
2.2. Überblick über die zur Herstellung von fermentierten Milchprodukten verwendeten Keimarten	7
2.3. Die β-Galactosidasen	8
2.3.1. Die intestinale (wirtseigene) β-Galactosidase	8
2.3.2. Die mikrobielle β-Galactosidase	12
2.4. Verträglichkeit fermentierter Milchprodukte bei Laktosemalab- sorbern	13
2.5. Abtötung "von Mikroorganismen" oder "von Laktobazillen" mit γ-Strahlen	18

2.6.	<u>Gastrointestinale Mikroflora und gnotobiotische Tiere</u>	20
2.7.	<u>Ansiedlung von Laktobazillen im Magen-Darm-Trakt</u>	21
2.8.	<u>Probiotika (lebende contra abgetötete Keime in Milchprodukten)</u>	24
2.9.	<u>Verdaulichkeitsbestimmung mittels Marker</u>	27
3.	<u>Material und Methoden</u>	29
3.1.	<u>Anzucht der Laktobazillen</u>	29
3.1.1.	<u>Der Bakterienstamm</u>	29
3.1.2.	<u>Anzucht der Laktobazillen in MRS-Bouillon</u>	29
3.1.3.	<u>Erstellung einer Wachstumskurve zur Ermittlung der optimalen Wachstumszeit</u>	29
3.1.4.	<u>Prüfung des Laktobazillenstammes auf Reinheit</u>	30
3.1.5.	<u>Herstellung von Laktobazillensuspensionen</u>	31
3.2.	<u>Allgemeine Analysen</u>	32
3.2.1.	<u>Behandlung der Laktobazillen mit Ultraschallwellen zur Differenzierung zwischen in den Zellen eingeschlossener und freier β-Galactosidase</u>	40
3.2.2.	<u>Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität mit ortho-Nitrophenyl-β-Galaktosid als Substrat</u>	33
3.2.3.	<u>Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität mit Laktose als Substrat</u>	
3.2.4.	<u>Ermittlung der Lactose/D-Galaktose-Menge in den Proben</u>	37
3.2.5.	<u>Enteiweißung des Probenmaterials vor der Bestimmung des Laktosegehalts</u>	39
3.2.6.	<u>Keimzahlbestimmung in Laktobazillensuspensionen, Versuchsdiäten und Tierkot</u>	40
3.2.7.	<u>Bestimmung des Verdaulichkeitsmarkers Cr-EDTA</u>	40
3.3.	<u>Vorversuche</u>	40
3.3.1.	<u>Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität in Proben nach in vitro Pepsin/HCl-Verdauung</u>	40

3.3.2.	<u>Gewinnung von Mukosahomogenaten mit anschließender Bestimmung der intestinalen β-Galactosidase-Aktivität beim Göttinger Minischwein</u>	41
3.3.3.	<u>Gewinnung von Mukosahomogenaten mit anschließender Bestimmung der intestinalen β-Galactosidase-Aktivität bei Ratten</u>	42
3.3.4.	<u>Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivitäten und der Keimabtötung in Laktobazillensuspensionen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung</u>	42
3.4.	<u>Untersuchung der Laktoseverdauung und der β-Galactosidase-Aktivität bei gnotobiotischen Göttinger Miniaturschweinen</u>	44
3.4.1.	<u>Versuchstiere</u>	44
3.4.2.	<u>Haltung</u>	44
3.4.3.	<u>Diäten</u>	45
3.4.4.	<u>Fütterungsversuch</u>	46
3.4.5.	<u>Probennahme und -behandlung</u>	47
3.4.6.	<u>Sterilkontrollen</u>	47
3.5.	<u>Untersuchung der Laktoseverdauung und der β-Galactosidase-Aktivität bei gnotobiotischen Ratten</u>	48
3.5.1.	<u>Versuchstiere</u>	48
3.5.2.	<u>Haltung</u>	48
3.5.3.	<u>Diäten</u>	48
3.5.4.	<u>Fütterungsversuch</u>	49
3.5.5.	<u>Probennahme und -behandlung</u>	49
3.5.6.	<u>Sterilkontrollen</u>	49
3.6.	<u>Statistische Auswertung</u>	50
4.	<u>Ergebnisse</u>	51
4.1.	<u>Wachstumskurve von <i>Lactobazillus delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 709-1</u>	51

4.2.	<u>Prüfung des Laktobazillenstammes auf Reinheit</u>	52
4.3.	<u>β-Galactosidase-Aktivitäten in Proben nach in vitro Verdauung mit einem Pepsin/HCl-Gemisch</u>	52
4.4.	<u>Mukosale β-Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei Göttinger Minischweinen (nicht gnotobiotisch, sondern konventionell gehalten)</u>	57
4.5.	<u>Mukosale β-Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei der Ratte</u>	58
4.6.	<u>β-Galactosidase-Aktivität und Keimstatus verschiedener Proben nach Behandlung mit ionisierender Strahlung (γ-Strahlen)</u>	59
4.7.	<u>Fütterungsversuch mit unterschiedlich aufbereitetem Kefir, durchgeführt beim gnotobiotischen Göttinger Minischwein</u>	63
4.7.1.	<u>Überprüfung des gnotobiotischen Status der Göttinger Minischweine (Sterilkontrolle)</u>	63
4.7.2.	<u>Die Kotbeschaffenheit während der einzelnen Versuchsdiäten</u>	63
4.7.3.	<u>Einfluß der Diäten auf die Laktoseausscheidung und die wahre, marker-korregierte Verdaulichkeit der Laktose bei Göttinger Minischweinen</u>	63
4.7.4.	<u>Einfluß der Diäten auf die Höhe der β-Galactosidase-Ausscheidung der Göttinger Minischweine</u>	65
4.7.5.	<u>Keimzahlen in der Diät und im Kot der Göttinger Minischweine im dritten Versuchsabschnitt nach Verabreichung der viablen Laktobazillen</u>	67
4.8.	<u>Fütterungsversuch mit unterschiedlich aufbereitetem Kefir, durchgeführt bei der gnotobiotischen Ratte</u>	70
4.8.1.	<u>Überprüfung des gnotobiotischen Status der Ratten (Sterilkontrolle)</u>	70
4.8.2.	<u>Die Kotbeschaffenheit während der einzelnen Versuchsdiäten</u>	70
4.8.3.	<u>Einfluß der Diäten auf die Laktoseausscheidung der Ratten</u>	70
4.8.4.	<u>Einfluß der Diäten auf die Höhe der β-Galactosidase-Ausscheidung der Ratten</u>	71

4.8.5.	<u>Keimzahlen in der Diät und im Kot der Ratten nach Verabreichung der viablen Laktobazillen</u>	73
5.	<u>Diskussion</u>	76
5.1.	<u>Vorversuche</u>	76
5.1.1.	<u>Wachstumsbedingungen und Reinheit des im Versuch verwendeten Laktobazillen-Stammes</u>	76
5.1.2.	<u>β-Galactosidase-Aktivitäten in Proben nach einer in vitro Verdauung in einem Pepsin/HCl-Gemisch</u>	77
5.1.3.	<u>Die mukosale wirtseigene β-Galactosidase-Aktivität im Dünndarm von Göttinger Minischweinen und Ratten</u>	79
5.1.4.	<u>Einfluß der Bestrahlung mit γ-Strahlen auf die β-Galactosidase-Aktivität und den Keimstatus von <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i></u>	80
5.2.	<u>Laktosemenge, β-Galactosidase-Aktivität und Keimzahlen im Kot gnotobiotischer Göttinger Minischweine nach Aufnahme dreier unterschiedlich aufbereiteter Kefirdiäten</u>	83
5.3.	<u>Laktosemenge, β-Galactosidase-Aktivität und Keimzahlen im Kot gnotobiotischer Ratten nach Aufnahme dreier unterschiedlich aufbereiteter Kefirmahlzeiten</u>	90
6.	<u>Zusammenfassung</u>	92
	<u>Summary</u>	
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	94
8.	<u>Verzeichnis der Abkürzungen</u>	114
9.	<u>Anhang</u>	115
	<u>Danksagung</u>	
	<u>Lebenslauf</u>	

1. Einleitung

Das Grundnahrungsmittel des Säuglings ist im Normalfall die Milch. Mit zunehmendem Alter werden andere Nahrungsmittel wichtiger, Milch spielt dann nur noch eine untergeordnete Rolle, es kommt sogar z.T. bei einigen Personen zu Unverträglichkeiten. Die weltweit häufigste Ursache für Milchunverträglichkeiten beim erwachsenen Menschen ist das mangelnde Vermögen, Laktose zu hydrolysieren. Dieses wird als Laktosemalabsorption, oder, wenn nach dem Verzehr laktosehaltiger Nahrung klinische Unverträglichkeitssymptome auftreten, als Laktoseintoleranz bezeichnet. Zwischen Laktosemalabsorption, Laktoseintoleranz und der Befähigung, Milch beschwerdefrei aufzunehmen, besteht keine eindeutige Korrelation (GARZA, 1976; ROSADO et al., 1987; SCRIMSHAW et al., 1988). Die Ursache von Laktosemalabsorption bzw. -intoleranz ist ein Mangel am laktosespaltenden Enzym β -Galactosidase (E.C. 3.2.1.23). Wenn Milch oder ein anderes laktosehaltiges Nahrungsmittel verzehrt wird, passieren, je nach Menge der aufgenommenen Laktose, mehr oder weniger große Mengen des Disaccharids ungespalten den Dünndarm und erreichen den Dickdarm, was hier zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks führt, wodurch es zu einem Wassereinstrom in das Darmlumen kommt. Ausgelöst durch das unphysiologisch hohe Angebot an schnell fermentierbarem Kohlenhydrat in diesem Darmabschnitt kommt es darüber hinaus zu einer starken mikrobiellen Stoffwechselftigkeit, wodurch große Mengen kurzkettiger Fettsäuren, Kohlendioxid, Methan und Wasserstoff entstehen. Eine Akkumulation der genannten Metabolite im Dickdarm, verbunden mit dem der Erhöhung des osmotischen Drucks folgenden Wassereinstrom ins Darmlumen, führt zu abdominalen Unverträglichkeitsreaktionen wie Blähungen und Flatulenz bis hin zu Krämpfen und Diarrhöen (AURICCHIO et al., 1963; DAHLQVIST et al., 1963). Weiterhin wirken die oben genannten organischen Säuren irritierend auf die Darmschleimhaut und fördern so die Darmperistaltik, was ein zusätzlicher Grund für die beschriebenen Unverträglichkeitssymptome ist (KASPER, 1987).

Welch große Rolle die Laktosemalabsorption bzw. -intoleranz für den Menschen spielt, wird deutlich, wenn man sich die weltweite Verteilung des Auftretens anschaut:

Bei den Völkern Schwarzafrikas und Südostasiens liegt der Anteil der Laktosemalabsorber an der Gesamtbevölkerung zwischen 80 und 100% (FICKLER und LEITZMANN, 1980; ALM, 1982). Bei den Mitteleuropäern (besonders bei den Skandinaviern) ist die Prävalenz der Laktosemalabsorption wesentlich geringer, so sind in Schweden und Dänemark nur 3% der Bevölkerung Laktosemalabsorber (DAHLQVIST, 1984a). In der Bundesrepublik Deutschland liegt die Häufigkeit in der Gesamtbevölkerung bei 16% (SAHI, 1994). Leben in einem europäischen Staat viele ausländische Mitbürger aus Drittweltländern mit hoher Malabsorberprävalenz, so ist der Anteil an Laktosemalabsorbern wesentlich höher. In Großbritannien, wo 1987 allein 2,5 Millionen Schwarzafrikaner lebten (FREY, 1990), liegt die Häufigkeit der Laktosemalabsorption bei 20-30% (DAHLQVIST, 1984a). Je weiter südlich man sich in Europa befindet, desto höher steigt die Häufigkeit der Laktosemalabsorption in der Bevölkerung. So finden sich in Frankreich, auch ohne Berücksichtigung des Ausländeranteils, 28-37%, in Südfrankreich sogar 50% (SAHI, 1994) Laktosemalabsorber in der Gesamtbevölkerung. Der Malabsorberanteil in den Regionen Süd- und Südosteuropas liegt zwischen 30 und über 70% (SAHI, 1994). Auch in der Bundesrepublik Deutschland wird mit einer Zunahme der Laktosemalabsorber zu rechnen sein, da sich der Ausländeranteil der Bevölkerung von 1961-1988

versechsfache (STATISTISCHES BUNDESAMT, 1990) und auch in Zukunft weiter steigen wird. Da also die Laktosemalabsorption an Bedeutung gewinnen wird, ist es von nationalem Interesse, den Betroffenen das an hochwertigen Proteinen und Vitaminen sowie Mineralstoffen und Spurenelementen reiche Nahrungsmittel Milch in großer Vielfalt und in verträglicher Form anbieten zu können. Sowohl für die Landwirtschaft als auch für die Milchindustrie ist es von kommerziellem Interesse, die Kaufkraft einer wachsenden Konsumentenschicht an sich zu binden.

Zu diesem Zweck bietet sich vor allem die breite Produktpalette der fermentierten Milchprodukte an. Nach dem Verzehr fermentierter Milchprodukte kann die β -Galactosidase, die aus den im Milchprodukt enthaltenen Keimen stammt, im Dünndarm der Konsumenten zur Laktosespaltung beitragen. Auf Grund des Gehalts an solchen mikrobiellen β -Galactosidasen aus den Starterkulturen werden fermentierte Milchprodukte, besonders Joghurt, von Laktosemalabsorbern viel besser vertragen als Milch (GALLAGHER et al., 1974; KOLARS et al., 1984; SAVAIANO et al., 1984; MCDONOUGH et al., 1987; MARTINI et al., 1987b, 1991a,b; DEWITT et al., 1988; ROSADO et al., 1992). Ein optimal verträgliches fermentiertes Milchprodukt für Laktosemalabsorber sollte folglich eine hohe β -Galactosidase-Aktivität mit hoher Lagerungsstabilität (DE VRESE, 1992) enthalten, die auch bei der Magenpassage nicht oder nur unwesentlich beeinträchtigt wird. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag leisten zur Klärung der Frage, ob die Wirksamkeit der mikrobiellen β -Galactosidase, ihre Magenpassage bis in den Dünndarm ohne Aktivitätsverluste und somit die bessere Verträglichkeit von Joghurt und anderen Sauermilchprodukten prinzipiell an die Viabilität der darin enthaltenen Keime gebunden ist, oder ob auch Produkte mit abgetöteten Keimen wirksam sind.

2.Literaturübersicht

2.1.Laktosemalabsorption

Laktose (4-(β -D-Galaktosido)-D-Glukose) ist ein Disaccharid, welches nur in der Milch von Säugetieren vorkommt. Abhängig von der Spezies variiert der Laktosegehalt der Milch (0,8% bei Meeressäugern, 7,2% beim Menschen); die Kuhmilch enthält durchschnittlich 4,8% Laktose. Durch die Bürstensaum- β -Galactosidase (mukosale β -Galactosidase) des Darms wird oral aufgenommene Laktose in die Monosaccharide Galaktose und Glukose hydrolysiert und dann resorbiert (SCHAAFSMA et al., 1988). Laktose dient dem Säugling zur Energieversorgung, etwa 40% des Energiebedarfs werden über sie gedeckt. Die β -Galactosidase-Aktivität ist beim Neugeborenen am höchsten und nimmt mit zunehmendem Alter ab. Der Zeitpunkt des Nachlassens der Enzymaktivität ist von Population zu Population unterschiedlich (DAHLQVIST, 1984a). Ein großer Teil der erwachsenen Weltbevölkerung verfügt nur noch über geringe mukosale β -Galactosidase-Aktivität, woraus die unzureichende Digestion der Laktose folgt. Die ungenügende Verdauung (Maldigestion) des Disaccharids Laktose wird als Laktosemalabsorption bezeichnet. Bei den betroffenen Personen kann es, je nach Ausprägung und aufgenommener Laktosemenge, zu mehr oder weniger schweren Unverträglichkeitsymptomen kommen (KOCIAN, 1988). Diese Symptome sind dann Blähungen, Flatulenz, Krämpfe im Abdominalbereich und Diarrhöen, beim Kleinkind können auch Übelkeit und Erbrechen hinzukommen (O´KEEFE et al., 1991; FICKLER und LEITZMANN, 1980). Treten diese Symptome auf, spricht man von Laktoseintoleranz. Es kommt zu den Intoleranzerscheinungen, wenn mehr oder weniger große Mengen Laktose auf Grund einer niedrigen Aktivität des Enzyms β -Galactosidase im Dünndarm nicht in die beiden Monomere Glukose und Galaktose gespalten werden, welche im Darm resorbiert werden könnten. Gelangt die nicht hydrolysierte Laktose in den Dickdarm, wird sie von dort ansässigen Mikroorganismen meist zu kurzkettigen Fettsäuren, Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut. Je mehr Laktose so im Dickdarm verstoffwechselt wird, desto mehr der genannten Metabolite reichern sich im Dickdarm an. Die organischen Säuren wirken irritierend auf die Darmschleimhaut und fördern so die Darmperistaltik. Diese Peristaltiksteigerung verbunden mit einem vermehrten Wassereinstrom, ausgelöst durch die sich im Dickdarm befindende osmotisch wirksame Laktose, kann zu den beschriebenen Reaktionen führen (KASPER, 1987).

Auch beim Schwein kann es nach Gabe großer Mengen Laktose in der Diät zu Laktoseintoleranzerscheinungen kommen. Dies zeigten BECKER und TERRILL (1954) nach Verabreichung von 50% Laktose in der Diät bei 9-16 Wochen alten Schweinen. Auch geringere Gehalte (15, 30 und 45%) an Laktose in der Diät verursachen langsames Wachstum und schlechtere Ausnutzung der Nahrung. Bei 45% Laktose in der Diät zeigten sich die Tiere unwillig, die Nahrung zu verzehren (SHEARER & DUNKIN, 1968a). Die Autoren beschrieben weiter, daß bei den Tieren, die viel Laktose in der Diät erhielten, eine Vergrößerung des Zäkums sowie eine übermäßige Entwicklung des Kolons und des Rektums vorlagen, nachdem die Tiere getötet worden waren (SHEARER & DUNKIN, 1968b).

Folgende drei Formen der Laktosemalabsorption sind bekannt:

1. Bei der kongenitalen (angeborenen) Form der Laktosemalabsorption handelt es sich um eine rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit. Es kommt direkt nach der ersten Milchaufnahme beim Säugling zu wässrigen Durchfällen. Laktose kann, wegen Fehlens jeglicher β -Galactosidase im Dünndarm, überhaupt nicht abgebaut werden, d.h. sie wird gänzlich ausgeschieden. In der Mukosa des Dünndarms ist keine β -Galactosidase-Aktivität meßbar (ASP und DAHLQVIST, 1974; DAHLQVIST, 1984a).
2. Die primäre Form der Laktosemalabsorption ist der Normalzustand beim größten Teil der Bevölkerung auf der Welt (DAHLQVIST, 1984a) und bei allen ausgewachsenen Tieren. Etwa 60-100% aller Menschen sind von dieser Form der Laktosemalabsorption betroffen (LEBENTHAL, 1979). Nach dem Säuglingsalter verlieren alle Tiere und die meisten Menschen die mukosale β -Galactosidase-Aktivität bis auf kleine Reste fast vollständig, etwa 5-10% der ursprünglichen Enzymaktivität des Säuglingsalters bleiben bestehen. Nur Mittel- und besonders Nordeuropäer und deren Nachkommen auf der ganzen Welt (Nordamerika und Australien) verfügen auch im Erwachsenenalter (etwa 80%) über eine hohe intestinale β -Galactosidase-Aktivität (FICKLER und LEITZMANN, 1980).
3. Die sekundäre Form der Laktosemalabsorption ist die Folgeerscheinung einer Primärerkrankung, einer Erkrankung, die die Schleimhaut des Darmes schädigt (RENNER, 1974). So können z.B. tropische und nicht-tropische Sprue, Parasitenbefall des Darmes, Kuhmilchintoleranz, operative Eingriffe oder Protein- und Energiemangelernährung auslösender Faktor für einen allgemeinen Disaccharidasemangel im Darm sein. Unter den mukosalen Disaccharidasen ist die β -Galactosidase in der Regel am stärksten betroffen (FICKLER und LEITZMANN, 1980; DAHLQVIST, 1984a).

Wahrscheinlich bestand noch vor etwa 12 000 Jahren die gesamte menschliche Population aus Personen, die unter der primären Form der Laktosemalabsorption litten (KOCIAN, 1988). Doch als die Milchviehhaltung aufkam und an Bedeutung gewann, erwies sich die dominant vererbte Eigenschaft (SWALLOW und HARVEY, 1993) einer persistent hohen β -Galactosidase (basiert vermutlich auf einer Mutation des Gens, welches die β -Galactosidase-Bildung ab einem bestimmten Alter unterdrückt (JOHNSON et al., 1993)) bis ins Erwachsenenalter in der Evolution als günstig, weil erst dadurch die Verdauung von Laktose und somit der symptomfreie Verzehr von laktosehaltiger Milch möglich wurde. Vermutlich war hierbei der hohe Kalziumgehalt der Milch, verbunden mit der durch die Laktose ausgelöste Förderung der Kalziumresorption, durch eine gesteigerte passive Diffusion (ALLEN, 1982), gerade in nördlichen Breiten von großem Vorteil für die Population. Es wird vermutet, daß Laktose auf diese Weise wenigstens teilweise, die wegen der verminderten Sonneneinstrahlung in diesen Breiten, auftretende Unterversorgung mit Vitamin D ausgleichen konnte (FLATZ und ROTTHAUWE, 1973). Kalzium ist ein wesentlicher Bestandteil der Knochensubstanz und wird dem Körper in den westlichen Industrienationen in großen Mengen über Milch und Milchprodukte zugeführt (SCHAAFSSMA et al., 1988). Da laktoseintolerante Personen aber gerade diese Kalziumquelle wegen der auftretenden Unverträglichkeitsymptome meiden, tritt im Zusammenhang mit der Laktosemalabsorption häufig vermehrt die Osteoporose auf (NEWCOMER et al., 1983), eine Erkrankung, die durch die gesteigerte Brüchigkeit der Knochen ausgezeichnet ist.

Es gibt mehrere Möglichkeiten die Aktivität der intestinalen β -Galactosidase zu bestimmen und somit gleichzeitig, nach dem Verzehr von Laktose, die absorbierte Laktosemenge zu erfassen. So kann man bei Probanden invasiv mit Hilfe von Sonden Proben aus dem Dünndarm entnehmen und dort direkt die Menge der vorhandenen Laktose bestimmen (LEREBOURS et al., 1989; MARTEAU et al., 1990; MARTINI et al., 1991b; POCHARD et al., 1989). Auch die direkte Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in der Dünndarmmukosa ist nur nach einem erheblichen Eingriff, bei dem eine Mukosaprobe aus dem Darm entnommen werden muß, möglich. Diese Methoden werden wegen der starken Belastung für den Betroffenen jedoch nicht routinemäßig ausgeführt.

Eine andere Methode basiert darauf, daß die Laktose im Dünndarm hydrolysiert wird und die Spaltprodukte Glukose und Galaktose resorbiert werden, wodurch der Blutglukosespiegel ansteigt. Je schlechter die Laktose hydrolysiert werden kann, desto geringer steigt der Blutglukosespiegel. Dies macht man sich bei der Diagnostik der Laktosemalabsorption zunutze. Sie liegt vor, wenn nach Verabreichung von 50 g Laktose in wässriger Lösung der Anstieg des Blutglukosespiegels eines Probanden unter einem Wert von 1,12 mmol/l liegt. NEWCOMER und MCGILL (1966) fanden dieses Verfahren zu ungenau und irreführend, da die Höhe des Blutglukosespiegels von vielen verschiedenen Einflüssen abhängig ist.

Auf der gleichen Grundlage basiert eine weitere Methode die absorbierte Laktosemenge zu erfassen. Dazu wird statt des Blutglukosespiegels die postprandiale Plasmagalaktosekonzentration bestimmt (DEVRESE et al., 1992). Diese Methode funktioniert jedoch nur, wenn in der verzehrten Diät keine Galaktose vorhanden ist, was bei Verabreichung eines fermentierten Milchprodukts lediglich bei Kefir der Fall ist, in welchem anfallende Galaktose sofort von enthaltenen Hefen metabolisiert und somit entfernt wird.

Eine nicht-invasive Methode zur Erfassung der Laktoseverdauung ist der Atemwasserstofftest. Hierbei wird die Menge an nicht resorbierter Laktose indirekt erfaßt. Es wird davon ausgegangen, das die nicht resorbierte Laktose in den Dickdarm gelangt, wo sie von den dort ansässigen Mikroorganismen unter Bildung von Wasserstoff verstoffwechselt wird. Dieser Wasserstoff diffundiert über die Darmwand in die Blutbahn, gelangt so zur Lunge, wo er abgeatmet wird. Es besteht eine Proportionalität zwischen abgeatmeter Wasserstoffmenge und nicht resorbierter Laktosemenge. Diese Methode wird sowohl zur Diagnostik der Laktosemalabsorption herangezogen, als auch zur Bestimmung der nicht im Dünndarm hydrolysierten Laktose (MARTINI et al., 1987b; ONWULATA et al., 1989; LEREBOURS et al., 1989; SOLOMONS et al., 1985; SCHNEIDER et al., 1990). Überschreitet die Spitzenkonzentration von Wasserstoff in der Ausatemluft eines Probanden den Wert von 20 ppm nach Aufnahme von 50 g Laktose in wässriger Lösung, so gehört er definitionsgemäß zu den Laktosemalabsorbern. Auch diese Methode ist nicht sehr genau, da die Menge des im Dickdarm entstandenen Wasserstoffs nicht allein von der Laktosemenge abhängig ist, sondern auch von der vorhandenen Mikroflora und deren Kapazität Wasserstoff zu produzieren bzw. zu verbrauchen.

Eine letzte Methode die nicht gespaltene Laktose zu bestimmen, ist die direkte Messung im Kot. Diese Methode ist nur bei gnotobiotischen Versuchstieren anwendbar, bei denen im Dünndarm nicht abgebaute

Laktose im Dickdarm nicht durch Mikroorganismen hydrolysiert werden kann und somit in unveränderter Menge im Kot ausgeschieden wird.

Ob es bei Laktosemalabsorbern zum Auftreten klinischer Symptome, also zur Intoleranz kommt, hängt von vielen Faktoren ab. Entscheidend sind besonders die Menge der verzehrten Laktose (geringe Mengen Laktose werden von Laktosemalabsorbern meist noch toleriert), die Entleerungszeit des Magens, die gastrointestinale Transitzeit und die Anwesenheit von aktiven mikrobiellen β -Galactosidasen aus fermentierten Nahrungsmitteln, oder der originären Darmflora (SAVAIANO und LEWITT, 1987; AROLA und TAMM, 1994). Eine Rolle spielen dabei die Menge und Zusammensetzung der übrigen Nahrungsbestandteile, mit denen zusammen die Laktose aufgenommen wird, weil sie die Entleerungsrate und die gastrointestinale Transitzeit beeinflussen. Je länger der Nahrungsbrei mit der enthaltenen Laktose im Dünndarm verweilt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß die auch bei Laktosemalabsorbern noch in geringer Menge vorhandene mukosale β -Galactosidase auf die Laktose einwirken, d.h. diese hydrolysieren kann. Die Magenentleerungszeit wird durch die Anwesenheit von Fett und Aminosäuren, durch hohe Azidität des Nahrungsbreis und durch einen erhöhten osmotischen Druck verzögert (HOURIGAN, 1984).

Es scheint möglich, laktoseintolerante Personen in gewissem Maß an steigende Mengen Laktose zu adaptieren, d.h. nach einem längeren Zeitraum der Laktoseaufnahme wird diese besser vertragen. Dies wird auf eine Erhöhung der Toleranz der Personen gegenüber den mikrobiellen Fermentationsprodukten im Kolon zurückgeführt (JOHNSON et al., 1993). Auch eine Änderung des Gehalts verschiedener Vertreter der Mikroflora wird nach Laktoseverzehr beobachtet (ITO und KIMURA, 1993). Ob solche veränderten zahlenmäßigen Verhältnisse der intestinalen Keimarten einen Einfluß auf die Toleranz gegenüber der Laktose in Nahrungsmitteln haben, untersuchten SIIGUR et al. (1991). Sie wählten aus einer großen Zahl Laktosemalabsorbern jene aus, die nach Aufnahme größerer Mengen Laktose keine oder kaum Unverträglichkeiten zeigten. Beim Vergleich dieser Gruppe mit jener, die Unverträglichkeitsreaktionen zeigte, wurde festgestellt, daß der Anteil an Isobutyrat und Isovalerat am Spektrum der kurzkettigen Fettsäuren in den Faeces ersterer erhöht war. In vorhergehenden Rattenversuchen stellten die Autoren fest, daß eine zunehmende Konzentration dieser Metabolite mit hoher Besiedlungsdichte laktosehydrolysefähiger Fermentationskeime korreliert. Die Vermutung liegt nahe, daß bei einer Besiedlung des Dünndarms mit Laktose metabolisierenden Keimarten eine verstärkte Laktosespaltung erzielt werden kann, so daß Unverträglichkeitsreaktionen ausbleiben, was aber bisher nicht bewiesen ist.

2.2.Überblick über die zur Herstellung von fermentierten Milchprodukten verwendeten Keimarten

Unter fermentierten Milchprodukten versteht man Produkte, die aus meist pasteurisierter Milch unter Verwendung thermophiler Fermentationskeime hergestellt werden. Am weitesten verbreitet ist Joghurt, der besonders unter Verwendung von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* und *Streptococcus*

salivarius ssp. *thermophilus* hergestellt wird. Während der Herstellung, dem sogenannten Fermentationsprozeß, steigt der Gehalt an Keimen im Produkt. Durch sie wird ein Teil der in der Milch enthaltenen Laktose zu Milchsäure abgebaut und der damit verbundene Abfall des pH-Wertes im Produkt, führt zu einer Freisetzung des micellaren Kalziums im Kasein, verbunden mit einer gelartigen Präzipitation des Proteins an seinem isoelektrischen Punkt bei pH 4,6 (HARTLEY & DENARIAZ, 1993). Außer den oben genannten Keimen werden neben anderen auch zur natürlichen Darmflora des Menschen gehörende Keimarten, wie *Lactobacillus acidophilus*, verschiedene Bifidobakterienarten und *Lactobacillus casei* (TEUBER et al., 1987; YESHIMA et al., 1992), in Rein- oder Mischkulturen zur Herstellung fermentierter Milchprodukte verwendet. Neben dem wichtigsten Produkt Joghurt, gibt es noch eine Reihe weiterer Erzeugnisse, wie Dickmilch, unter Verwendung von *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* und *Streptococcus lactis* hergestellt, Buttermilch, Joghurt mild (nach deutscher Milcherzeugnisverordnung (Milch ErzV) ist anstelle von *L. bulgaricus* eine andere thermophile Laktobazillenart enthalten) und Bioghurt® (unter Verwendung von *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *L. acidophilus* und *S. lactis* hergestellt). Dazugekommen sind seit neuester Zeit weitere Joghurts, für die auf Grund neuer Keimstämme geworben wird, wie z.B. Joghurts, die *Lactobacillus* GG enthalten, einen aus der menschlichen Darmflora isolierten Stamm.

In letzter Zeit wurde die Taxonomie vieler Keimarten geändert, was sich im Zuge von Untersuchungen des genetischen Ursprungs von Keimen unter Verwendung von DNA-DNA-Hybridisierungstechniken ergab. Man findet in der neuesten Auflage von BERGEY's Manual of Determinativ Bacteriology (BUCHANAN und GIBBON, 1993) auch für zahlreiche Fermentationskeimarten eine neue Klassifikation. So wurde *Streptococcus thermophilus* als *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* und *L. bulgaricus* wurde neben *L. lactis* und *L. delbrückii* als Subspezies von *L. delbrückii* klassifiziert. In dieser Arbeit wird *L. bulgaricus* nur noch als *L. delbrückii* ssp. *bulgaricus* nach der neuen Taxonomie bezeichnet.

Ein besonderes Produkt ist süße, d.h. unfermentierte Acidophilusmilch, die allerdings in Deutschland nicht verbreitet ist. Sie wird vorwiegend in den USA produziert, es wird ein *L. acidophilus*-Konzentrat mit pasteurisierter Milch versetzt und sofort anschließend gekühlt. Trotz enthaltener hoher Keimzahl zeigt die Milch keine Veränderung der organoleptischen Beschaffenheit (SPECK, 1978).

Weitere Spezialprodukte sind Kefir, Ymer (speziell in Dänemark) und Kumys (Asien, aus Stutenmilch hergestellt). Zur Herstellung dieser fermentierten Milchprodukte werden neben den Milchsäurebakterien spezielle Hefen bei der Fermentation eingesetzt (KLUPSCH, 1992).

Kefir ist ein Sauermilchgetränk, daß seit etwa 100 Jahren bei uns bekannt ist und aus dem Kaukasus stammt. Kefir entsteht durch eine gleichzeitige Milchsäure- und Alkoholgärung (enthält in geringem Maß Alkohol). Neben Laktobazillen werden zur Herstellung auch andere Laktose fermentierende Keimgruppen, z.B. Hefen verwendet. Milch wird dazu mit den sogenannten Kefirknöllchen beimpft (HIROTA, 1987). Die Verwendung von anderer nicht-Laktose fermentierender Hefe (*Saccharomyces* sp.) ist der Hauptunterschied zu den sonstigen Sauermilch- und Joghurtherzeugnissen und der Grund für

das Fehlen von freier Galaktose im Produkt, da diese sofort von diesen Hefen metabolisiert wird.

Wegen der mikrobiellen Stoffwechselprozesse, über welche die Laktose abgebaut wird, würde der Laktosegehalt in fermentierten Milchprodukten um etwa 20-30% niedriger liegen als in der Ausgangsmilch. Doch die meisten Milchprodukte werden in der Praxis zur Erhöhung der Trockenmasse mit Magermilchpulver oder Milchkonzentrat versetzt, so daß sie einen mit der Milch vergleichbaren Laktosegehalt aufweisen (SPREER, 1988).

2.3. Die β -Galactosidasen

2.3.1. Die intestinale (wirtseigene) β -Galactosidase

Man unterscheidet zwischen zwei in der Dünndarmmukosa von Mensch, Schwein und Ratte vorkommenden β -Galactosidasen, die in der Lage sind Laktose zu hydrolysieren (ASP et al., 1970a, 1970b; ASP et al., 1971; ASP und DAHLQVIST, 1974). Es gibt zum einen eine membranständige β -Galactosidase (EC 3.2.1.23) und zum anderen eine lysosomale β -Galactosidase. Diese an bzw. in den Enterozyten gelagerten Enzyme unterscheiden sich im pH-Optimum. Die membranständige β -Galactosidase hat ihr Wirkoptimum bei pH 5,5-6, die lysosomale bei 3,5 (ASP, DAHLQVIST und KOLDOVSKY, 1969). Letztere kann außerdem nur wirksam werden, wenn die Zelle, in der sie eingeschlossen ist, zerfällt. Die lysosomale β -Galactosidase ist für die intestinale Laktosehydrolyse als unbedeutend anzusehen (GARVIE et al., 1984; BÜLLER und GRAND, 1990), da sie auf Grund ihres pH-Optimums bei 3,5 im leicht sauren bis neutralen Bereich (im Dünndarm) kaum Aktivität zeigt (ASP et al., 1971).

Die Bildung der β -Galactosidase in den Enterozyten im Bürstensaum des Dünndarms erfolgt, indem nach der Translation von β -Galactosidase-mRNA, die dabei entstandenen großen Präkursormoleküle mit Molekulargewichten zwischen 220 kD bei der Ratte (YEH et al., 1991a und 1991b), 207-230 kD beim Schwein (SHULMAN et al., 1992) und 245 kD beim Menschen (DANIELS, 1990) in die reife Form der β -Galactosidase überführt werden. Die reife β -Galactosidase besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 130 kD bei der Ratte (YEH et al., 1991) und 160 kD beim Schwein (SHULMAN et al., 1992) und beim Menschen (NAIM, 1992) vor. Diese reifen Formen haben zwei aktive Zentren, das eine mit aktiver β -Galactosidase, das andere mit Glycosylceramidase (WACKER et al., 1992). Laktose und andere β -Glycoside mit hydrophilen Aglykonen, aber auch Substratanaloga, wie Nitrophenyl- β -Galactoside werden im erstgenannten Zentrum hydrolysiert.

Die β -Galactosidase-Aktivität ist bei neugeborenen Säugetieren, also auch beim Menschen, sehr hoch,

viel höher als bei ausgewachsenen Individuen (DAHLQVIST, 1961). Die β -Galactosidase-Aktivität fällt in den ersten zwei Lebensmonaten am stärksten (BAILEY et al., 1956; WALKER, 1958a; HARTMAN, 1961), direkt nach der Geburt beginnt der drastische Abfall. Etwa eine Woche nach der Geburt fällt die Enzymaktivität langsamer, bis die Abnahme nach 8 Lebenswochen fast stagniert. Die Gesamtaktivität des Enzyms ändert sich kaum noch (MANNERS und STEVENS, 1972; KIDDER und MANNERS, 1980) und ist bei den meisten Individuen kaum nachweisbar. Eine geringe Restaktivität ist meist noch vorhanden (KIDDER und MANNERS, 1980). Die Abnahme der intestinalen β -Galactosidase-Aktivität ist oft mit einer steigenden Unverträglichkeit laktosehaltiger Nahrung verbunden. Der größte Teil der menschlichen Weltbevölkerung leidet unter diesen Unverträglichkeitsreaktionen und ist nicht in der Lage, große Mengen Laktose in der Nahrung zu sich zu nehmen.

Es gibt viele Hypothesen über die Gründe für die Abnahme der β -Galactosidase-Aktivität, die Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten waren. Eine Hypothese besagt, daß eine genetisch regulierte Unterdrückung der Enzymsynthese der β -Galactosidase, also Regulation auf molekularer Ebene für den Verlust der β -Galactosidase-Aktivität im Erwachsenenalter verantwortlich ist, zum anderen können die Gründe bei einer Änderung der Dünndarm-Zell-Kinetik mit einer verminderten Lebensspanne der Enterozyten des Dünndarmbürstensaumes liegen (KELLY et al., 1991). Die genetisch regulierte Unterdrückung der β -Galactosidase-Synthese kann wiederum unterschiedlich begründet sein. So fanden ESCHER et al. (1992), daß die Regulation der wirtseigenen β -Galactosidase auf Ebene der Gentranskription stattfindet. Sie wiesen nach, daß bei hohem Saccharase/ β -Galactosidase-Verhältnis in Dünndarmbiopsien von Laktosemalabsorbern gleichzeitig wenig β -Galactosidase-mRNA zu finden war, wohingegen in Dünndarmbiopsien von Personen mit niedrigem Saccharase/ β -Galactosidase-Verhältnis größere Mengen β -Galactosidase-mRNA nachgewiesen wurden. Andere Autoren vermuteten die Ursachen für die Abnahme der β -Galactosidase mit zunehmendem Lebensalter auf translationaler oder posttranslationaler Ebene. So wurde von LLOYD et al. (1992) die direkte Proportionalität zwischen der spezifischen Aktivität der intestinalen β -Galactosidase und den in den Enterozyten gefundenen Präkursormolekülen des Enzyms in den Dünndarmbiopsien von Laktosemalabsorbern festgestellt, woraus sie schlossen, daß die Regulation auf der Ebene der Proteinsynthese stattfand. Diese Hypothese unterstützen ebenfalls NUDELL et al. (1993) nach Untersuchung der Veränderungen von mukosaler β -Galactosidase-Aktivität, β -Galactosidaseprotein und β -Galactosidase-mRNA mit zunehmendem Alter bei Ratten, in deren jejunaler Dünndarmschleimhaut. Die β -Galactosidase-mRNA nahm mit zunehmendem Alter der Tiere (Bestimmung zwischen 7. und 60. Lebenstag) zu, die β -Galactosidaseproteinmenge und die β -Galactosidase-Aktivität nahmen bis zum 60. Lebenstag kontinuierlich ab. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß die Regulation der β -Galactosidase-Aktivität auf translationaler oder posttranslationaler Ebene verläuft. Die bei erwachsenen Schweinen durchgeführten Untersuchungen von TORP et al. (1993) führten zu ähnlichen Ergebnissen. Sie stellten im Duodenum und im oberen Jejunum ein 3 bis 5-fach höheres Verhältnis von β -Galactosidase-mRNA zu spezifischer Aktivität als im Ileum fest. Die Autoren begründeten dieses Mißverhältnis damit, daß der Umsatz der β -Galactosidase durch einen vermehrten Abbau des Enzyms durch Pankreasproteasen in den oberen Dünndarmabschnitten erhöht wurde.

Auch auf der Ebene der proteolytischen Reifung der β -Galactosidase vom Präkursormolekül zum

spezifischen Enzym wurde eine Regulierung vermutet. WITTE et al. (1990) stellten fest, daß bei einem von vier Probanden mit Laktosemalabsorption zwar eine normale Syntheserate des Präkursormoleküls stattfand, jedoch die Reifung dieses Moleküls zur aktiven 160 kD-Form verlangsamt war.

Andere Autoren suchen den Faktor, der für die Regulierung der β -Galactosidase-Aktivität verantwortlich sein könnte, in der Zytokinetik der Dünndarmenterozyten. TSUBOI et al. (1985) sahen einen Grund im veränderten Reifungsprozeß der Enterozyten bei Erwachsenen. Die Enterozyten stammen von sich ständig teilenden Stammzellen ab, die am Grund der Krypten des Bürstensaumepithels des Dünndarms liegen. Während die Zellen in Richtung Zottenspitze wandern, wo sie letztendlich abgestoßen werden, findet der Differenzierungsprozeß statt (POTTEN et al., 1990). Mit zunehmendem Alter beschleunigt sich die Enterozytenmigration, wodurch zunehmend nicht voll differenzierte, unreife Enterozyten auftreten und somit die β -Galactosidase-Aktivität vermindert ist (TSUBOI et al., 1985). Dieser Effekt scheint nicht überall im Dünndarm gleich stark aufzutreten. Bei der Untersuchung der Verteilung der β -Galactosidase-Aktivität im gesamten Dünndarm stellten AURICCHIO und MAURI (1993) fest, daß bei gesügten Ratten- und Kanninchenjungen alle Enterozyten entlang des ganzen Dünndarms über die Enzymaktivität verfügten. Bei den ausgewachsenen Tieren dieser Tierarten fanden die Autoren im mittleren Dünndarm ebenfalls bei allen Enterozyten die β -Galactosidase-Aktivität, allerdings nicht so im proximalen sowie im distalen Dünndarm. Dort waren die Enterozyten, die β -Galactosidase-Aktivität zeigten, nur inselförmig verteilt. Die Arbeiten von MANNERS und STEVENS (1972) und KIDDER und MANNERS (1980) zeigten in Korrespondenz dazu, daß die β -Galactosidase-Aktivität bei Schweinen, die an 6 Stellen entlang des Dünndarms in Mukosahomogenaten bestimmt wurde, am Darmbeginn gering ist, um dann rasch anzusteigen. Bei 20% Dünndarmlänge, gemessen ab Magenausgang, wurde die höchste Enzymaktivität bestimmt, die dann rasch bis zum distalen Dünndarm bis annähernd null abfiel. Dies galt für neugeborene Ferkel in ähnlicher Weise wie für vier Wochen alte und ältere Tiere, allerdings waren die Enzymaktivitäten bei den jüngeren Tieren insgesamt viel höher, und auch im distalen Dünndarm waren noch geringe Mengen zu finden.

Ein weiterer Aspekt für die Verminderung der β -Galactosidase-Aktivität im Erwachsenenalter wurde von BÜLLER et al. (1989) in Erwägung gezogen. Sie bestimmten die Enzymaktivität in Immunpräzipitaten der mukosalen β -Galactosidase von Ratten unterschiedlichen Alters. Die Gesamtzymaktivität erhöhte sich von Geburt an bis hin zu den adulten Tieren um über das 2-fache. Allerdings fiel die spezifische Aktivität der β -Galactosidase stark ab, je älter die Ratten waren, was an dem bis zu 8-fachen zellulären Proteinzuwachs lag, d.h. die Enzymdichte im Intestinum verringert sich mit zunehmendem Alter.

Bis heute ist unklar welche der genannten Regulationsmechanismen der intestinalen β -Galactosidase letztendlich maßgeblich für ihre Abnahme bei ausgewachsenen Individuen verantwortlich ist, vermutlich spielen alle Effekte zusammen eine Rolle (KELLY et al., 1991).

Diese für das Vorhandensein der β -Galactosidase verantwortlichen, im lebenden Organismus vorprogrammierten Prozesse, das zeitliche Zusammenwirken, können zusätzlich von äußeren Faktoren beeinflusst werden (GODA et al., 1988). Eine exogene Einflußgröße kann z.B. die

Nahrungszusammensetzung sein (REDDY, 1968; PERGOLIZZI et al., 1977; KOLDOVSKY, et al., 1983). Stärkereiche Diäten im Vergleich zu fettreichen Diäten erhöhen die Laktoseresorption durch eine gesteigerte β -Galactosidase-Aktivität (LEICHTER et al., 1984), ebenso wie Diäten mit größeren Mengen Laktose (GODA et al., 1984). Eine Stimulation der β -Galactosidase im unteren Villusbereich der Dünndarmzotten beim neugeborenen Ferkel konnten TIVEY et al. (1994) durch hohe Laktose- oder Glukosekonzentrationen in der Diät auslösen.

Auch Hormone und Wachstumsfaktoren können die β -Galactosidase-Aktivität im Dünndarm beeinflussen. KELLY et al. (1991) verabreichten einer Gruppe neugeborener Ferkel über 8 Wochen nur das Kolostrum von Sauen, einer anderen dagegen nur postkolostrale Sauenmilch. Die intestinale β -Galactosidase-Aktivität nahm in beiden Gruppen innerhalb der 8 Wochen ab, allerdings war die Abnahmerate in der Kolostrum-Gruppe größer als in der Gruppe mit der postkolostralen Sauenmilch. Kolostralmilch enthält hohe Konzentrationen an Hormonen und Wachstumsfaktoren, die mit Veränderung der Milch in der ersten Woche post Partum rapide abnehmen. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß diese ersten Laktationsprodukte die Abnahme der intestinalen β -Galactosidase beschleunigen können.

Insulin ist vermutlich einer der wichtigsten Faktoren in der Kolostralmilch der meisten Spezies, eingeschlossen Mensch und Schwein, der für intestinales Zellwachstum und -differenzierung verantwortlich ist (READ et al., 1984). SHULMAN (1990) verabreichte 2 Tage alten Minischweinferkeln einerseits adaptierte Sauenmilch ohne, andererseits mit Insulin. Nach 6-tägiger Fütterung wurde das Gewicht des Dünndarms gemessen, sowie die intestinale β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Das Ergebnis war ein Anstieg des Ileumgewichts und der β -Galactosidase beim mit Insulinzusatz gefütterten neugeborenen Minischwein. In einer weiteren Studie stellten SHULMAN et al. (1992) fest, daß die Ursache des insulin-induzierten Anstiegs der β -Galactosidase-Aktivität im Ileum weder auf der Stufe der β -Galactosidase-mRNA noch beim Reifungsprozeß des Enzyms zu finden war.

Auch ein Reihe anderer Hormone beeinflussen offenbar die intestinale β -Galactosidase-Aktivität, so ist wahrscheinlich der im Hungerstoffwechsel bekannte erniedrigte Plasmaspiegel der Schilddrüsenhormone für eine starke Zunahme der Enzymaktivität verantwortlich (FREUND et al., 1989 und 1991). Die gleiche Wirkung tritt nach der Gabe von Glukokortikoiden ein (KOLDOVSKY und SUNSHINE, 1970).

COLLINGTON et al. (1990) stellten fest, daß auch Gaben von Antibiotika oder Probiotika (hier eine Mischung aus verschiedenen *Lactobacillus*-Stämmen und *Streptococcus faecium*) bei Ferkeln von Geburt an bis zum Entwöhnen, eine Auswirkung auf die mukosale β -Galactosidase-Aktivität zeigten. Tiere, die Antibiotika oder Probiotika zusätzlich zur Milchnahrung erhielten, zeigten gegenüber Tieren, die keine Zusätze bekamen höhere β -Galactosidase-Aktivitäten in der Dünndarmmukosa.

2.3.2. Die mikrobielle β -Galactosidase

Die in Milch und Milchprodukten enthaltene Laktose wird von den genannten Milchsäurebakterien als Kohlenhydratquelle genutzt. Die zum Wachstum der Keime nötige Energie wird über den Weg der Fermentation aus der Laktose gewonnen. Dazu ist die in ihrem Zellinneren befindliche β -Galactosidase erforderlich. Eine spezifische Permease ist dafür verantwortlich, daß die Laktose in die Zelle gelangt, um dort zu den Monomeren Glukose und Galaktose abgebaut zu werden, welche dann über die Glykolyse weiter metabolisiert werden. Manche Keimarten nehmen die Laktose über ein spezielles phosphoenolpyruvatabhängiges Phosphotransferasesystem auf, wobei die Laktose während des Membrantransports phosphoryliert wird. In der Zelle wird sie dann von einer Phospho- β -Galactosidase hydrolysiert.

Bei vielen Arten von Mikroorganismen ist eine β -Galactosidase (EC.3.2.1.23), die β -galactosidische Bindungen hydrolysiert, zu finden. Einige Hefespezies, Schimmelpilze und Bakterien wurden als Enzymproduzenten für industrielle Zwecke ausgewählt (WALLENFELS et al., 1961; WIERZBICKI et al., 1973). Die β -Galactosidase in Milchsäurebakterien ist vielfach untersucht worden (McKAY et al., 1971; PREMI et al., 1972; McFETERS et al., 1967; FARROW und GARVIE, 1979). Unter den vielen untersuchten Milchsäurebakterien zeigte *Lactobacillus bulgaricus* (heute: *L. delbrückii* ssp. *bulgaricus*) die höchste Enzymproduktionsaktivität (RAMANA und DUTTA, 1981).

Eine detaillierte Charakterisierung für die β -Galactosidase von *L. delbrückii* ssp. *bulgaricus* gaben ITOH et al. (1980). Sie reinigten das Enzym und untersuchten es eingehend. Die Autoren stellten fest, daß das Enzym die höchste Aktivität bei pH 7,0 und einer Temperatur von 50 °C zeigte, ohne Beeinflussung durch den Reinigungsprozeß. Eine komplette Inaktivierung der β -Galactosidase fand bei Erhitzen über 55 °C statt. Die Stabilitätsprüfung zeigte, daß das Enzym für mindestens 4 Monate bei 4 °C in 0,1 M Phosphatpuffer ohne einen Aktivitätsverlust lagerfähig war. Die β -Galactosidase von *L. delbrückii* ssp. *bulgaricus* zeigte eine gute Affinität zu Laktose, die Affinität zu o-NPG war im Vergleich dazu noch höher. Die molekulare Masse des Enzyms wurde mit 159000 Dalton angegeben und war damit geringer als die molekulare Masse der β -Galactosidase, die bei *L. thermophilus* (PREMI et al., 1972) und *E. coli* (IKURA et al., 1959) gefunden wurde.

LIN et al. (1989) untersuchten das Wachstum und die β -Galactosidase-Produktionsfähigkeit der beiden als Starterkulturen für Joghurt verwendeten Milchsäurebakterien *L. delbrückii* ssp. *bulgaricus* und *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* in Milch und entwickelten zur Bestimmung dieser β -Galactosidase-Aktivität eine Methode. Die meisten anderen Autoren untersuchten im Gegensatz zu ihnen die β -Galactosidase-Aktivität, nachdem die Zellen in einer Bouillon (GREENBERG und MAHONEY, 1982; OCCHINO et al., 1986; SOMKUTI und STEINBERG, 1979) oder in gepufferten Milchsystemen (OCCHINO et al., 1986; THOMAS und TURNER, 1977) gewachsen waren, Verhältnisse, die nicht übereinstimmen mit denen, die bei Fermentation in Joghurt anzutreffen sind.

Weitere Details im Schriftum zur mikrobiellen β -Galactosidase in fermentierten Milchprodukten werden

im folgenden Kapitel aufgeführt.

2.4. Verträglichkeit fermentierter Milchprodukte bei Laktosemalabsorbern

Fermentierte Milchprodukte enthalten Mikroorganismen mit β -Galactosidase-Aktivität und eine, im Vergleich zu nicht fermentierten Milchprodukten, geringere Laktosemenge, da die im Milchprodukt enthaltene Laktose von den Mikroorganismen bei der Fermentation zum Teil verbraucht wird. Dieses beides könnten die Gründe dafür sein, daß fermentierte Milchprodukte auch von Laktosemalabsorbern, die sonst nicht in der Lage sind Milch oder unfermentierte Milchprodukte zu sich zu nehmen, symptomfrei verzehrt werden können.

Eine bessere Verträglichkeit von fermentierten Milchprodukten bei Laktosemalabsorbern, wegen des verringerten Laktosegehalts und der hydrolytischen Aktivität von mikrobiellen β -Galactosidasen im Dünndarm, vermuteten KILARA und SHAHANI (1976). Sie bestimmten die β -Galactosidase-Aktivitäten in verschiedenen fermentierten Milchprodukten und fanden zudem eine Erhöhung der Aktivität des Enzyms durch in vitro-Magenverdauung.

ALM (1982) machte in seinen Versuchen, in denen er Laktosemalabsorbern Milch und mehrere, mit unterschiedlichen Keimen hergestellte, fermentierte Milchprodukte verzehren ließ, die gleiche Entdeckung. Die fermentierten Milchprodukte wurden im Gegensatz zu der Milch gut vertragen. Der Autor unterließ es jedoch, die fermentierten Milchprodukte mit Laktose zu supplementieren, so daß unklar blieb, ob die bessere Verträglichkeit nicht einfach nur durch die viel niedrigeren Laktosegehalte in diesen Produkten nach Fermentation zustande kam, oder ob tatsächlich die mikrobielle β -Galactosidase aus den fermentierten Milchprodukten dafür verantwortlich war.

KOLARS et al. (1984) erbrachten den ersten Beweis, daß eine gesteigerte Laktoseabsorption nach der Aufnahme von fermentierten Milchprodukten durch die, in den Dünndarm gelangten mikrobiellen β -Galactosidase-Aktivitäten ausgelöst wurde. Sie erzielten diese Ergebnisse, indem sie bei Laktosemalabsorbern nach dem Verzehr von Joghurt oder Milch, einerseits die abgeatmete Wasserstoffmenge mit dem Atemwasserstofftest gemessen und andererseits Duodenalchymusproben über einen Zeitraum von 90 Minuten entnommen hatten. Aus dem Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität im Duodenalchymus nach Joghurtaufnahme bei abnehmender Wasserstoffexhalation schlossen die Autoren auf eine gesteigerte Laktoseabsorption.

1984 beobachteten GILLILAND und KIM nach Aufnahme gleicher Mengen nativen wie pasteurisierten Joghurts von Laktosemalabsorbern eine signifikant niedrigere Wasserstoffexhalation bei ersterem

Produkt. In der gleichen Arbeit untersuchten sie den Einfluß von Rindergalle auf die β -Galactosidase-Aktivität verschiedener Joghurts. Sie fanden eine 2,5 bis 3-fach höhere β -Galactosidase-Aktivität in den Produkten mit Gallezusatz gegenüber denen ohne Zusatz. Aus diesen Beobachtungen schlußfolgerten die Autoren, daß die Laktose in fermentierten Milchprodukten mit nativen Keimen, im Darm teilweise von der β -Galactosidase aus diesen Fermentationskeimen hydrolysiert wird. Die β -Galactosidasen mußten dazu vorerst über Lyse der Zellwand der Keime freigesetzt werden. GILLILAND und STANLEY (1984) und CHATEAU et al. (1994) stellten unterschiedliche Resistenzen bei verschiedenen Laktobazillenstämmen gegenüber Galle fest. Die meisten Stämme von *Lactobacillus acidophilus* sind besonders resistent gegenüber Galle, d.h. die Zellwand der *L. acidophilus*-Stämme wird von den Galleinhaltsstoffen nicht lysiert. Das erklärt die von unterschiedlichen Autoren gemachte Entdeckung, daß nach dem Verzehr von handelsüblichen Acidophilusprodukten verglichen mit Milch, weder eine bessere Verträglichkeit bei Laktosemalabsorbern auftrat, noch eine geringere postprandiale Wasserstoffexhalation gemessen werden konnte (PAYNE et al., 1981; REASONER et al., 1981; LIN et al., 1991).

Im Gegensatz dazu hatten KIM und GILLILAND (1983) eine im Vergleich zu Milch signifikant niedrigere Wasserstoffexhalation nach der Aufnahme von Acidophilusmilch gezeigt. Allerdings wurde die Acidophilusmilch unter der Zugabe von tiefgefrorenem *L. acidophilus* hergestellt. Vermutlich wurden die Keime durch den Gefrierprozeß so stark geschädigt, daß eine Lyse dieser sonst sehr stabilen Laktobazillen im Dünndarm der Laktosemalabsorber eintrat, wodurch die β -Galactosidase freigesetzt wurde. In gleicher Weise mechanisch schädigend auf die Zellwände der Keime wirkt sich die Behandlung mit Ultraschall aus (McDONOUGH et al., 1987).

SAVAIANO et al. (1984) verglichen die postprandialen Wasserstoffexhalationen bei Laktosemalabsorbern, nachdem diese gleiche Mengen Laktose in unterschiedlichen Milchprodukten (nativer und pasteurisierter Joghurt, Milch, unfermentierte Acidophilusmilch und Buttermilch) zu sich genommen hatten. Die Buttermilch wurde unter Verwendung verschiedener Streptokokkenstämmen hergestellt. Die geringste Menge Wasserstoff war in der Ausatemungsluft der Probanden zu messen, die den nativen Joghurt verzehrt hatten, gefolgt von denen, die pasteurisierten Joghurt und Buttermilch bekamen. Die größten Mengen Wasserstoff wurden bei den Probanden nach Aufnahme von Milch und Acidophilusmilch verzeichnet, was wiederum zeigt, daß Acidophilusmilch nicht zu einer verbesserten Laktosehydrolyse im Dünndarm beiträgt. Auch Buttermilch erwies sich nicht als sehr effizient. Die Autoren vermuteten die Ursache darin, daß es sich bei der β -Galactosidase der Streptokokkenstämmen um eine intrazelluläre Phospho- β -Galactosidase handelt, die Laktose nur intrazellulär spalten kann, nachdem sie bei der Membranpassage phosphoryliert wurde. Dies setzt eine intakte Membran voraus, was in diesem Versuch scheinbar nicht mehr gegeben war, nachdem die Streptokokken den Magen passiert hatten und ihre Zellwand von der Magensäure angegriffen worden war. Die Autoren schlossen aus diesen Beobachtungen, daß eine effiziente intestinale Laktosehydrolyse durch mikrobielle β -Galactosidasen nur dann gegeben sein kann, wenn diese aus den in der Nahrung enthaltenen Fermentationskeimen freigesetzt worden sind. Das darf jedoch erst nach der Magenpassage erfolgen, da sie sonst wie andere Nahrungsproteine auch, schon im Magen vorverdaut und denaturiert werden. SAVAIANO und LEVITT konstatierten 1987, daß es zwei Faktoren gibt, von denen abhängt, ob die β -Galactosidase im Dünndarm zur Laktosespaltung beitragen kann, oder ob sie schon vorher im Magen inaktiviert wird:

- a. von der Pufferungskapazität des fermentierten Milchprodukts und der zusätzlichen Nahrungsbestandteile. Milch und fermentierte Milchprodukte zeigen gegenüber dem sehr sauren Magenmilieu eine hohe Pufferkapazität. Der pH-Wert des Mageninhalts blieb für eine Stunde über 3,0 (nach drei Stunden noch über 2,5), nachdem Probanden 440 g Joghurt zu sich genommen hatten (MARTINI et al., 1985).
- b. von der Fähigkeit des Fermentationskeimes die Magenpassage zu überstehen und dabei die intrazelluläre β -Galactosidase vor einer Denaturierung zu schützen.

Die intakte Zellstruktur der Fermentationskeime in Joghurtkulturen ist für den Schutz der intrazellulären β -Galactosidase-Aktivität während der Magenpassage essentiell. MARTINI et al. (1989) und SHAH und JELEN (1990) zerstörten die in Joghurt enthaltenen Mikroorganismen mit Ultraschall und säuerten das Produkt an (bis pH 3-4). Die β -Galactosidase-Aktivität ging schnell und vollständig verloren.

Die Resistenz gegenüber dem sauren Magenmilieu ist bei den verschiedenen Mikroorganismen sehr unterschiedlich. CONWAY et al. untersuchten 1987 die Überlebensfähigkeit einiger in fermentierten Milchprodukten enthaltener Keime im Magensaft in vitro und in vivo. Sie maßen die Resistenz an der Anzahl der überlebenden Keime und stellten fest, daß *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* die geringste Resistenz aufwies, gefolgt von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus*, wohingegen *Lactobacillus acidophilus* die stärkste Resistenz zeigte. Die Autoren beschrieben weiter, daß die Resistenz abnahm, je niedriger der pH-Wert des Magensaft war. Auch SHAH und JELEN (1990) stellten fest, daß die Überlebensfähigkeit von Laktobazillen im Magenmilieu größer war als die von Streptokokken.

Aus den bisherigen Arbeiten ging hervor, daß es große Unterschiede hinsichtlich der Entfaltung der β -Galactosidase-Aktivität im Dünndarm, als dem eigentlichen Wirkort für die Laktosehydrolyse des Enzyms, gibt. SAVAIANO (1989) regte an, daß eine Selektion von Bakterienstämmen, die in der Lage seien, ihre β -Galactosidase-Aktivität in den Dünndarm zu tragen und somit dort für die Verbesserung der Laktosehydrolyse zu sorgen, von Vorteil sein könnte. Die Verträglichkeit von Milchprodukten für Laktosemalabsorber könnte gesteigert werden. Bei unterschiedlichen Molkereikulturen wurden große Schwankungen in der β -Galactosidase-Aktivität festgestellt (SHAH und JELEN, 1990). LIN et al. (1989) bestätigten dieses und entwickelten daraufhin ein Verfahren, mit welchem sie die spezifische β -Galactosidase-Aktivität unterschiedlicher Joghurtkulturen bestimmen konnten. Laktobazillen-Stämme, die aus der humanen Darmflora isoliert wurden, zeigten im Vergleich mit herkömmlichen Joghurtkulturen niedrigere oder ähnliche β -Galactosidase-Aktivitäten (SONTAKKE et al., 1990).

MARTINI et al. (1991b) verwendeten zur Herstellung von Joghurts unterschiedliche Kulturen. Die Produkte unterschieden sich nur in der Höhe der β -Galactosidase-Aktivität, nicht aber in Laktosegehalt

oder pH-Wert. Bei Probanden, die die Joghurts bzw. Milch verzehrten, wurde die postprandiale Wasserstoffexhalation gemessen. Sie war etwa dreimal höher nach Milchverzehr als nach Joghurtverzehr. Zwischen den Wasserstoffexhalationen nach Verzehr der unterschiedlichen Joghurts gab es keine Unterschiede. Die Autoren nehmen nach diesen Ergebnissen an, daß der β -Galactosidase-Gehalt der Produkte allein nicht der entscheidende Faktor zur Erhöhung der Laktosehydrolyse im Dünndarm nach Aufnahme fermentierter Milchprodukte ist.

MARTEAU et al. (1990) verglichen die Wasserstoffexhalation von Laktosemalabsorbern nach dem Verzehr von nativen gegenüber pasteurisierten Joghurts und gegenüber Milch. Die Laktoseabsorption war am schlechtesten nach der Gabe von Milch und am besten nach dem Verzehr des nativen Joghurts. Die Autoren untermauerten dieses Ergebnis mit einem Versuch, in dem sie die nicht absorbierte Laktosemenge im terminalen Ileum bestimmten, nachdem die Laktosemalabsorber die gleichen Diäten wie oben erhalten hatten. Die Verdauung der im Produkt enthaltenen Laktose war mit Verzehr des nativen Joghurts am effektivsten (90%), gefolgt vom pasteurisierten Joghurt (87,5%) und am schlechtesten nach der Milchmahlzeit (61%). Die Autoren vermuteten, daß die relativ gute Laktoseresorption nach pasteurisiertem Joghurt, der nur wenig mikrobielle β -Galactosidase-Aktivität hatte, durch die wesentlich verlängerte gastrointestinale Transitzeit im Vergleich zu Milch bedingt war. Weitere Autoren bestätigten diese Annahme, so zeigten MAHE et al. (1994), daß Milch signifikant kürzer im Magen verweilt als fermentierte Milch. Die auch beim Laktosemalabsorber noch in geringen Mengen vorhandene mukosale β -Galactosidase-Aktivität (ASP et al., 1971) hat dadurch die Möglichkeit länger auf die Laktose einzuwirken. MARTINI et al. (1987b) beobachteten Ähnliches nach der Verabreichung von Eiscreme im Vergleich zu Milch. Sie folgerten, daß die verbesserte Laktoseabsorption aus Eiscreme zustande kam, weil diese einen erhöhten Fett- und Trockenmassegehalt hatte, wodurch ebenfalls die gastrointestinale Transitzeit verlängert wurde.

Einen weiteren Einfluß auf die Laktosehydrolyse im Dünndarm hat, wie unter 2.3.2. bereits erwähnt, die Rest- β -Galactosidase-Aktivität in der Mukosa des Laktosemalabsorbers. KOLARS hat 1984 die β -Galactosidase-Aktivität im Dünndarmchymus bestimmt, konnte jedoch nicht zwischen dem mukosalen und dem mikrobiellen Enzym differenzieren. Um eine Differenzierung annäherungsweise vornehmen zu können, nutzte man daher oft den Tatbestand, daß sich die mukosale und die mikrobielle β -Galactosidase in ihrer Affinität gegenüber Laktose und einigen Substratanaloga stark unterscheiden und weiterhin die optimalen pH-Werte beider Enzyme differieren. SUHR und DE VRESE (1995) entwickelten ein Verfahren, mit dem sie zwischen wirtseigenem und mikrobiellem Enzym mittels Immunchromatographie unterschieden.

GARVIE et al. (1984) bestimmten die β -Galactosidase-Aktivität im Dünndarmchymus von gnotobiotischen und konventionell gehaltenen Ratten, nachdem die Tiere Standardfutter, Milch oder Joghurt erhalten hatten. Nach der Joghurtdiät war die β -Galactosidase-Aktivität (bestimmt mit Laktose oder o-NPG als Substrat) im Dünndarmchymus beider Tiergruppen signifikant erhöht, nach der Milchfütterung verglichen mit der Standarddiät war sie nur erhöht, wenn die Aktivitätsbestimmung mit o-NPG als Substrat durchgeführt wurde. Die Autoren untersuchten neben der intestinalen β -Galactosidase-Aktivität die Veränderungen der Darmflora bei den Versuchstieren nach Erhalt der

verschiedenen Diäten. Die Joghurtdiät hatte im Gegensatz zu den anderen Diäten ein Zurückdrängen der originären Darmflora zur Folge, allerdings kam es zu keiner dauerhaften Besiedlung des Intestinaltraktes mit den Joghurtkeimen.

Mit Hilfe von Markern untersuchten POCHARD et al. (1989) den Unterschied von erhitztem gegenüber nativem Joghurt. Als Marker dienten Polyethylenglycol und *Bacillus stearothermophilus*-Sporen zur Bestimmung des Laktosegehalts und der β -Galactosidase-Aktivität in Produkt und Duodenalchymus von Laktosemalabsorbieren. Nach Aufnahme des Joghurts wurde festgestellt, daß sowohl eine große Anzahl von Keimen genau wie die β -Galactosidase die Magenpassage überstanden, dennoch war der Laktoseabbau im Duodenum nur geringfügig, was die Autoren auf die für die mikrobiellen β -Galactosidasen ungünstigen pH-Bedingungen (unter 5,0) in diesem Darmabschnitt zurückführen. Die Autoren nahmen daher an, daß eine Laktosehydrolyse durch die β -Galactosidase aus Fermentationskeimen bevorzugt in den unteren Darmabschnitten erfolgt.

Ein weiteres fermentiertes Milchprodukt, das auf Grund seiner Zusammensetzung einen speziellen Stellenwert hat, ist Kefir. Dieses Produkt enthält neben den üblichen Milchsäurebakterien zusätzlich Hefen. Die enthaltenen Milchsäurebakterien (*Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* und *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) hydrolysieren einen Teil der in der Milch enthaltenen Laktose während des Fermentationsprozesses. Die dabei entstehende Glukose wird anders als die entstehende Galaktose sehr schnell weiter verstoffwechselt (RENNER, 1989). Im Kefir wird die Galaktose durch die enthaltenen Hefen weiter verstoffwechselt, so daß sie nicht, wie im Joghurt, kumuliert. Bei Untersuchungen nach Joghurtverzehr konnte nicht einfach die postprandiale Plasmagalaktosekonzentration zur Bestimmung der im Darm hydrolysierten Laktose (über die im Blutserum anfallenden Spaltprodukte) herangezogen werden. Die im Joghurt präformierte Galaktose konnte den Effekt der intestinalen Laktosespaltung überdecken (GOODENOUGH und KLEYN, 1976; SCHAAF SMA et al., 1988). Der galaktosefreie Kefir jedoch läßt sich mit der postprandialen Plasma-Galaktosebestimmung kombinieren. DE VRESE et al. (1992) verabreichten Göttinger Minischweinen verschiedene Zubereitungen von Kefir, einmal nativ mit mikrobieller β -Galactosidase-Aktivität, das andere Mal erhitzt ohne β -Galactosidase-Aktivität. An Hand des Verlaufs der postprandialen Plasmagalaktosespiegel stellten sie eine um 30% höhere Spitzenkonzentration der Plasmagalaktose nach Verabreichung des nativen Kefir fest.

2.5.Abtötung "von Mikroorganismen" oder "von Laktobazillen" mit γ -Strahlen

Es gibt viele Möglichkeiten Zellen irreversibel zu schädigen, wie Hitzebehandlung, chemische Behandlung (z.B. Antibiotika), mechanische Schädigung (Scherkräfte, hydrostatischer Hochdruck (BANZET et al., 1992)), Ultraschallbehandlung und Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen (ERGEBNISBERICHT ZUM FORSCHUNGSPROJEKT VO (EWG) NR. 1116/92 VOM 30.04.1992).

Ionisierende Strahlen oder auch Ionenbildende Strahlen, sind energiereiche Photonen- oder Korpuskularstrahlen aus Röntgenröhren, Radionukliden und Kernreaktoren, die durch Ionisation der getroffenen Atome oder Moleküle chemisch wirksame Radikale bilden. Durch die Strahlung werden in den absorbierenden Molekülen chemische Reaktionen ausgelöst und Moleküle ionisiert, was zu einer Beeinträchtigung der Funktionstüchtigkeit der für die Zellen notwendigen Moleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren, führen kann. Folge davon sind Schädigung oder Abtötung von Organismen, Zellen und Mikroorganismen, das Auftreten von Mutationen a.v.m. Nur wenige Mikroorganismen scheinen gegenüber den letalen und mutagenen Effekten, die ionisierende Strahlung auslöst, außerordentlich resistent zu sein, wie z.B. *Deinococcus radiodurans* R1 (DALY et al., 1994), was aus der enormen Fähigkeit entspringt durch Strahlen aufgetretene DNA-Schäden mit hoher Geschwindigkeit und Effektivität zu reparieren (über 120 DNA-Doppelstrangbrüche pro Chromosom). Die meisten anderen Mikroorganismen können nicht mehr als 2-3 DNA-Doppelstrangbrüche überstehen (DALY et al., 1994; MINTON, 1994).

γ -Strahlen zählt man zu den ionisierenden Strahlen, sie entstehen praktisch bei allen Kernreaktionen, so auch beim Zerfall von dem Radionuklid ^{60}Co . Die hohe biologische Effektivität von Neutronen für den Zelltod wird erklärt durch die große Anzahl von nicht reparierten oder irreparablen DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch hoch energetische Neutronen ausgelöst werden (BRENNER et al., 1993).

FRANCHET-BEUZIT et al. (1993) bestätigten, daß ionisierende Strahlung eine Vielzahl von DNA-Schäden, besonders Strangbrüche induziert. Dafür sind besonders die bei der sogenannten Radiolyse von Wasser entstandenen Hydroxylradikale verantwortlich. Die Autoren machten in ihren Versuchen die Entdeckung, daß an die DNA gebundene Proteine lokal, an den Stellen ihrer Bindung, schützen können.

RETEL et al. (1993) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß die oxidative Schädigung der DNA durch Hydroxylradikale oft ganz spezifische Defekte, bzw. Mutationen mit sich bringt. Sie bestrahlten eine spezifische Doppelstrang-DNA, deren Basensequenz bekannt war, einmal in Anwesenheit von Sauerstoff und einmal in Anwesenheit von Stickoxyd mit γ -Strahlen. Anschließend stellten sie sehr spezifische Mutationsspektren fest. Es wurden hauptsächlich C/G- zu G/C-Transversionen in der Sauerstoffatmosphäre und mehr C/G- zu A/T-Transversionen in der Stickoxidatmosphäre beobachtet. In der Sauerstoffatmosphäre gab es keine Deletionen von einem Basenpaar, wie in der Stickoxidatmosphäre. Die Autoren schlossen daraus, daß Wasserstoffradikale (die nur in der Sauerstoffatmosphäre entstehen) keine Deletionen hervorrufen können, sondern nur Basentransversionen.

KIM und THAYER (1995) fanden, daß Hydroxylradikale und Sauerstoff gemeinsam, entsprechend der Strahlendosis, für die durch γ -Strahlung ausgelösten Schäden und die damit oft verbundene Zellsterblichkeit bei *Salmonella typhimurium* verantwortlich sind (kooperativer Effekt). Sie stellten fest, daß Hydroxylradikalfänger wie Polyethylenglycol (PEG) in Anwesenheit von Sauerstoff, nicht aber in Anwesenheit von Stickstoff- oder Stickoxydgasen die Letalität von *Salmonella typhimurium* nach

Bestrahlung reduzierten.

FEIG et al. (1994) beschäftigten sich mit dem Beitrag, den reaktive Sauerstoffarten bei der Mutagenese leisten. Die Untersuchungen gestalteten sich als schwierig, da die, durch die verschiedenen reaktiven Sauerstoffarten ausgelösten Mutationen, sehr unterschiedlich waren.

Im Gegensatz zu den bisherigen Arbeiten, stellten EWING und DAMSKER (1995) fest, daß Hydroxylradikale bei den von ihnen untersuchten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stämmen ab einer Strahlendosis von 120 Gray, DNA-Läsionen, aber keine Doppelstrangbrüche hervorriefen.

Einen großen Einfluß auf das Ausmaß der auftretenden Läsionen, hat das Medium, in dem sich die DNA befindet. So untersuchten ITO et al. (1993) den Einfluß des Feuchtigkeitsgrads der Probe auf den Effekt der Bestrahlung. Sie stellten fest, daß bei DNA, die sich in wässriger Lösung befand bis zu 100 mal mehr Einzelstrangbrüche auftraten, als bei DNA, die sich in feuchtem oder gar trockenem Zustand befand. Auch Puffersysteme boten bei Zimmertemperatur einen besseren Schutz vor DNA-Schäden als die wässrige Lösung (CULLIS et al., 1993). MILLER et al. (1991) untersuchten eine weitere Einflußgröße. Sie arbeiteten mit supercoiled DNA von Plasmiden in Bakterien und stellten darüber hinaus fest, daß diese besser vor auftreffender Strahlung geschützt ist, da die offene Helix von entspannter DNA den schädigenden Radikalen leichter zugänglich wird.

γ -Strahlen haben also die Eigenschaft Zellen so zu schädigen, daß sie nicht mehr vermehrungsfähig sind. Da γ -Strahlen hauptsächlich die replikativen Anteile, also die DNA der Zelle angreifen, wurde davon ausgegangen, daß sie bereits gebildete Proteine, so auch die β -Galactosidase, unbeschadet lassen. Allerdings beschrieben POTIER et al. (1991), daß die membranständige β -Galactosidase von *E. coli* durch ionisierende Strahlung inaktiviert wird. Dieses nur in der Tetramer-Form aktive Enzym wird dabei zum einen durch Auflösung der Tetramer-Struktur, zum anderen durch Denaturierung der einzelnen Protomere geschädigt.

2.6. Gastrointestinale Mikroflora und gnotobiotische Tiere

GOLDIN (1990) konstatierte, daß die Mikroflora sowohl bei Monogastriern als auch bei Wiederkäuern ein komplexes Ökosystem bildet. Anaerobe Bakterien dominieren im Gastrointestinaltrakt, in dem sich beim Monogastrier etwa insgesamt 10^{14} Keime befinden. Der Magen ist meist nur spärlich besiedelt, hauptsächlich mit Laktobazillen und Streptokokken. So auch der proximale Dünndarm, der allerdings zum Ende hin stärker besiedelt ist. Die Bakteriendichte nimmt distal der Ileozäkalklappe rapide zu, der Dickdarm ist am stärksten besiedelt.

HAENEL und GRÜTTE (1984) bezeichneten den Verdauungskanal, besonders den Dickdarm, als "black box". Hier laufen Stoffwechselprozesse, die nach Qualität, Quantität, Dynamik und Wirkung auf den Wirt nur in Umrissen bzw. nur an einigen Effekten erkennbar und bekannt sind, ab. Die mikrobielle Gesamtstoffwechselleistung hat eine Fülle von Konsequenzen für den Wirt: morphologische, physiologische, biochemische und immunologische Effekte. Die Autoren verglichen den Magen-Darm-Kanal von keimfreien mit konventionellen Tieren und stellten einige Unterschiede fest, woraus sie auf eine erhebliche Wirkung der Mikroflora auf den Wirtsorganismus schlossen. Auch COATES (1980) stellte fest, daß konventionell gehaltene Tiere, die sich ständig mit einer keimreichen Umgebung auseinandersetzen müssen, gegenüber Gnotobioten im Wachstum zurückblieben.

Definitionsgemäß sind Gnotobioten (Gnotobionten) keimfreie oder definiert assoziierte, d.h. nur mit bekannten Arten von Mikroorganismen besiedelte Tiere (aus: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch).

MITVEDT (1990) faßt die Entwicklung der gnotobiotischen Tierhaltung zusammen:

Die gnotobiotische Tierhaltung gibt es seit dem 2. Weltkrieg und wurde begründet von J. A. Reyniers, MIYAKAWA (1968) und GUSTAFSSON (1959). P.C. Trexler baute in den frühen 60-iger Jahren die ersten Plastikisolatoren zur Aufzucht und Haltung von keimfreien Tieren. Seitdem ist es möglich, Tiere zu halten, die keimfrei, d.h. ohne Mikroflora leben. Die Haltung der gnotobiotischen Tiere verlangt eine gute Isolatortechnik und steriles Arbeiten.

Der Ausschluß von Mikroorganismen läßt Untersuchungen zu, durch die Mikroflora-unabhängige Prozesse charakterisiert werden können. Alle Effekte, die im Zusammenhang mit der Darmflora stehen, werden ausgeschaltet, so auch die Beeinflussung der Intestinalflora durch zugeführtes Substrat (WOSTMANN et al., 1985).

TANNOCK et al. (1982) nutzten gnotobiotische Tiere, da sie die einzige Möglichkeit bieten, in einem lebenden System die Auswirkungen von nur einem Mikroorganismus im Magen-Darm-Trakt zu untersuchen. In den Versuchen der Autoren ging es darum, zu erkunden, welche ausgewählten Laktobazillenstämme in der Lage sind, das Darmepithel zu besiedeln. Bei Gnotobioten sind sämtliche Einflüsse mikrobieller Interaktionen (an den Epithelien, im Darmlumen) von vorne herein ausgeschlossen, so daß der zu testende Stamm optimale Bedingungen vorfindet, um sich im Darm anzusiedeln.

Laktobazillen, die normalerweise nicht in der Lage sind das Darmepithel zu besiedeln, können im Darm gnotobiotischer Tiere persistieren. Eine Erklärung dafür könnte das Fehlen antagonistischer Mikroorganismen und die im Vergleich zu konventionellen Tieren verlangsamte Passage sein (SAVAGE, 1977).

SCHULZE und ZUNFT beschrieben 1991, daß verschiedene Spezies der Darmflora

β -Galactosidasebildner sind und somit am Abbau der Laktose im Dünndarm beteiligt sein können. Für ihre Untersuchung der β -Galactosidase-Aktivität im Dünndarm von Ratten nach Verabreichung verschiedener β -Galactosidase bildender Bakterien, nutzten sie das Modell des keimfreien Tieres. Sie schlossen somit die Beeinflussung des Versuchs durch die β -Galactosidase-Aktivität anderer als der zu untersuchenden Mikroorganismen aus.

Bei der Ratte sind hauptsächlich Laktobazillen die β -Galactosidase-Produzenten (ZUNFT und SCHULZE, 1991), Bacteroidesstämme, Bifidobakterien und Enterobakterien sind es beim Menschen (SIMONE und GORBACH, 1986; AROLA und TAMM, 1994), genauso beim Schwein (SWORDS et al., 1993) zuzüglich Laktobazillen (WADSTRÖM et al., 1986; PETERSEN und TANNOCK, 1988).

Durch den Einsatz keimfreier Ratten unterschieden BESNIER et al. (1983) zwischen mukosaler (wirtseigener) und mikrobieller β -Galactosidase-Aktivität im Dünndarmchymus. Die Tiere erhielten über 14 bis 42 Tage zur Standarddiät zusätzlich erhitzten oder nativen Joghurt. Die Tiere, die den nativen Joghurt erhalten hatten, zeigten eine signifikant höhere mikrobielle β -Galactosidase-Aktivität.

2.7. Ansiedlung von Laktobazillen im Magen-Darm-Trakt

Im Magen-Darm-Trakt der meisten Tiere sind große Laktobazillenpopulationen vorhanden. Sie befinden sich dort vor allem im proximalen Teil des Verdauungsapparates, so auch im Magen und teilweise im Dünndarm von Menschen, Schweinen und Ratten. Die verschiedenen Laktobazillen-Stämme sind entweder in der Lage sich an den Epithelien der Verdauungsorgane anzuheften und diese so zu besiedeln (SAVAGE, 1977), oder sie bevölkern das Lumen des Magen-Darm-Traktes, d.h. sie befinden sich im Nahrungsbrei (PEDERSEN und TANNOCK, 1989). Von vielen dieser Laktobazillen-Stämme wird angenommen, daß sie bei der Etablierung und Stabilisierung der Mikroflora von gesunden Individuen beteiligt sind (SPECK, 1976; SANDINE, 1979). Um eine vorteilhafte Darmflora aufzubauen, scheint die Inokulation mit Laktobazillen, die das Darmepithel besiedeln können, bei neugeborenen Ferkeln wesentlich besser zu wirken, als der spätere kontinuierliche Zusatz von Bakterienpräparationen zum Futter erwachsener Tiere (TANNOCK et al., 1982).

Das unterschiedliche Siedlungsverhalten der Laktobazillen-Stämme und die Frage wie es zu einer Besiedelung kommt beschäftigte viele Autoren.

TANNOCK et al. (1982) untersuchten die Wirtsspezifität einzelner Laktobazillen-Stämme. Sie fanden heraus, daß ein Lactobazillenstamm, den sie bei Mäusen isolierten, nur in der Lage war auch wieder das Magen-Darm-Epithel von Mäusen, hier gnotobiotischen Mäusen, zu besiedeln, dies aber bereits nach einer einmaligen Gabe. Den selben Effekt fanden sie bei Laktobazillen, die sie von Ratten, Schweinen und Hühnern isolierten. Die Autoren kamen in Übereinstimmung mit FULLER (1973) und SUEGARA et al. (1975) zu dem Ergebnis, daß es bei Laktobazillen eine Wirtsspezifität im Siedlungsverhalten gibt.

Auch LIN und SAVAGE (1984) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Allerdings untersuchten sie das Adhäsionsverhalten von *Lactobacillus*-Stämmen, isoliert von verschiedenen Tierarten, an keratinisierten, nicht-sezernierenden Magenepithelien gnotobiotischer Mäuse. Die Autoren stellten fest, daß alle Stämme aus dem Mageninhalt der gnotobiotischen Mäuse kultiviert werden konnten, daß aber nur die Stämme von Nagern mehrschichtige Lagen auf der Oberfläche des Magen-epithels bildeten.

GOLDIN et al. (1992) stellten eine Wirtsspezifität bei *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum* und *L. plantarum* gegenüber dem menschlichen Darm fest. Diese genannten Stämme wurden in den Fäzes von Menschen gefunden. Anderen Laktobazillenstämmen scheint die Fähigkeit sich im Magen-Darm-Trakt zu etablieren zu fehlen, wie z B. *L. bulgaricus*, der bei der Herstellung von Joghurt oder anderen Milchprodukten verwendet wird und zur Ansiedlung nicht in der Lage ist (FINEGOLD et al., 1977).

Die Überlegungen, wodurch es zum Anheften kommen kann, gehen in viele Richtungen; KLEEMANN und KLAENHAMMER (1982) fanden bei allen 32 von ihnen untersuchten *Lactobacillus*-Stämmen eine unspezifische Anheftungsreaktion, die Kalzium erforderlich machte. Auch CHAUVIERE et al. (1992) stellten bei einigen Adhäsionsreaktionen eine Abhängigkeit von Kalzium fest. Weiterhin gibt es Arbeiten, in denen die aktuelle Wachstumsphase der Mikroorganismen, oder ihre Zellmorphologie (HENRIKSSON et al., 1991) für die Haftfähigkeit mit verantwortlich gemacht werden. SAVAGE (1992) stellte fest, daß manche Laktobazillen-Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase eine größere Hydrophobizität aufwiesen. Diese Stämme waren in vitro meist in der Lage in der exponentiellen Phase besser an Zellen der Magenmukosa zu haften als in der stationären Wachstumsphase. Die von HENRIKSSON et al. (1991) gemachte Beobachtung, daß die Zellmorphologie für Unterschiede bei der Haftung der Laktobazillen verantwortlich ist, führten sie darauf zurück, daß die Keime der verschiedenen Bakterienkolonien unterschiedliche Haftkomponenten haben. Sie stellten fest, daß die in vitro untersuchte spezifische Bindung der untersuchten *Lactobacillus fermentum* 104-R- und S-Kolonien zwar vermutlich hauptsächlich über Proteine vermittelt wird, daß aber unspezifische Bindungen auch beteiligt sind. Die Haftkomponenten sind bei den rough- Kolonien wahrscheinlich weniger ausgeprägt als bei den smooth-Varianten, die besser an Magenepithelzellen haften.

Die Haftmechanismen, durch welche vielen Laktobazillen-Stämmen die Möglichkeit zur Ansiedlung gegeben ist, können also vielfältiger Natur sein. Für die direkt mit der Haftung in Zusammenhang stehenden Komponenten besteht noch kein einheitliches Konzept:

BROOKER und FULLER (1975) untersuchten die Interaktionen von zwei Laktobazillen Stämmen mit Hühner-Kropf-Epithelien. Der eine *Lactobacillus*-Stamm 59 heftete sich, wie vorab schon bekannt war, an das Kropf-Epithel, der andere, *L. acidophilus* war dazu nicht in der Lage. Die Autoren stellten fest, daß die Spezifität, mit der Laktobazillen am Kropf-Epithel hafteten, von der Art der kohlenhydratreichen Oberflächenschicht der Keime abhing. Diese Schicht trat in Interaktion mit der viel dünneren Kohlenhydratschicht auf der Oberfläche der Kropf-Zellen. Kohlenhydratschichten waren für das Anheften von Laktobazillen am Epithel verantwortlich.

Dem widersprachen WADSTRÖM et al. (1987). Sie ermittelten aus ihren Untersuchungen, daß die Adhäsion von der Hydrophobizität der Bakterienoberfläche abhängig ist. Laktobazillen, die in kohlenhydratreichem Medium wuchsen, bildeten nicht ihren hydrophoben Zelloberflächencharakter aus. Sie schlossen daraus, daß kohlenhydratreiche Kapselpolymere nicht die Hauptdeterminante für die intestinale Laktobazillenansiedlung sein konnte. Die Autoren untersuchten 100 Stämme von Laktobazillen, die sie aus dem Dünndarm von frisch geschlachteten jungen Schweinen isolierten, hinsichtlich ihrer Haftung in vitro an Darmepithelzellen von Schweinen. Die Stämme, die gut hafteten, zeigten hohe Hydrophobizität der Zelloberfläche. Wurden sie mit Hitze und Proteasen behandelt, verschlechterte sich die Eigenschaft an den Darmepithelien zu haften. Sie folgerten aus diesen Beobachtungen und aus von SUEGARA (1975), CONWAY et al. (1985) und SHERMAN und SAVAGE (1986) erarbeiteten Ergebnissen, daß Proteine in der Zellwand von Laktobazillen für die Adhäsion verantwortlich sein mußten und daß diese Proteine die Hydrophobizität determinieren. Allerdings gab es unter den von ihnen untersuchten Stämmen auch welche, die hydrophile Oberflächenstrukturen hatten und trotzdem zur Adhäsion in der Lage waren, woraus die Autoren schlossen, daß unterschiedliche oder multiple Mechanismen an der Besiedlung der Dünndarmmukosa des Schweins beteiligt sind. SAVAGE (1992) unterstützte mit seiner Arbeit diese Aussage und dehnte sie des weiteren auf das Magenepithel der Maus aus.

SHERMAN und SAVAGE (1986) fanden, daß Makromoleküle, die Protein und Lipoteichonsäure enthalten die Haftung übernehmen. CONWAY und KJELLEBERG (1989) zeigten in vitro, daß bei *L. fermentum* Stamm 737 gebildetes und sezerniertes Protein die wirtsspezifische Adhäsion an das Epithel vermittelte. COCONNIER et al. (1992) schlossen aus ihren in vitro-Untersuchungen, daß bei Laktobazillen ein extrazelluläres Brücken-Protein eine Verbindung zwischen in der Bakterienzellwand befindlichen Kohlehydraten und im Darmepithel vorhandenen Rezeptoren schafft. Das Protein dient also der Adhäsionsvermittlung und scheint eine wichtige Komponente zu sein bei Laktobazillen, die den Gastrointestinaltrakt besiedeln.

SAVAGE (1992) faßt zusammen, daß an der Adhäsion von Laktobazillen zu intestinalen Epithelzellen unterschiedliche oder vielfache Mechanismen beteiligt sind. Die adhärierenden Zellen haben hydrophile sowie hydrophobe Domänen an den Oberflächen. In Abhängigkeit von den Bakterienstämmen und der physikalischen Art der beteiligten Gewebeoberfläche, können sowohl Proteine oder Polysaccharide als auch Lipoteichonsäuren in die Bindung involviert sein.

Alle aufgeführten Aussagen zum Adhäsionsverhalten von Laktobazillen wurden ausschließlich für spezielle Bakterienstämme und verschiedene Epithelarten (in-vitro-Versuche) gemacht. In-vivo-Versuche mit Schweinen unternahmen lediglich PEDERSEN und TANNOCK (1989), die neugeborenen Ferkeln verschiedene Laktobazillenstämme inokulierten, die sie vorher in vitro auf ihre Adhäsionsfähigkeit untersucht hatten. Sie fanden, daß die Ergebnisse der in vitro Versuche nicht mit denen der in vivo Versuche übereinstimmten, womit die Effektivität der in vitro Versuche in Frage gestellt zu sein scheint.

2.8. Probiotika (lebende contra abgetötete Keime in Milchprodukten)

Seitdem METSCHNIKOFF (1908) die These aufstellte, daß der Verzehr fermentierter Milchprodukte der Gesundheit förderlich sei und das Leben verlängere, besteht die Frage, ob fermentierte Milchprodukte Probiotika sind. Weiterhin ist bis heute nicht geklärt, ob für die vorteilhaften Effekte der fermentierten Milchprodukte die lebenden Kulturen verantwortlich sind, oder ob diese auch durchaus abgetötet sein können.

GEDEK (1991) beschrieb, daß Probiotika dem Zweck dienen, im positiven Sinne regulativ in die Besiedlung des Darms mit Mikroorganismen einzugreifen. Im Gegensatz zu Antibiotika sind es nicht bestimmte Stoffwechselprodukte von Bakterien oder Pilzen, mit wachstumshemmender oder keimabtöterder Wirkung, sondern es sind die Mikroorganismen selbst, die gesundheitsfördernde Effekte haben sollen.

FULLER (1991) gab folgende Definition für Probiotika: ein lebender mikrobiologischer Mahlzeitenzusatzstoff, der sich über die Verbesserung der mikrobiellen Balance, vorteilhaft auf den Wirt auswirkt. Diese Definition beinhaltet ausdrücklich die Wichtigkeit von lebenden Zellen als eine effektive Komponente eines Probiotikums (O´SULLIVAN et al., 1992). Die natürliche Darmflora bei Mensch und Tier soll in ihrer Ausgewogenheit erhalten bzw. wiederhergestellt werden. FULLER (1991) führte die vorteilhafte Wirkung von Probiotika auf folgende Punkte zurück:

- a. Produktion von antimikrobiellen Substanzen
- b. Belegung von Adhäsionsrezeptoren am Epithel des Magen-Darm-Traktes
- c. Wettbewerb um Nährstoffe
- d. Stimulation der Immunität des Wirts.

Dadurch sollen pathogene Keime abgedrängt bzw. an ihrer Ausbreitung gehindert werden. Der Autor beschrieb weiter, daß Probiotika zusätzliche Vorteil versprechende Effekte zugeschrieben werden gegen: Obstipation, Krebs, Herzerkrankungen und ulzerative Kolitis, die jedoch schwer zu belegen sind. Allerdings ist ein weiterer festgestellter Effekt gut belegt: die vorteilhafte Wirkung bei β -Galactosidasedefiziten (Laktose-malabsorption).

GURR (1991) bestätigte die von FULLER (1991) getroffenen Aussagen, jedoch traf er diese spezifiziert für Kulturkeime fermentierter Milchprodukte oder Kulturen beinhaltende Milch. Er stellte die Hypothese auf, daß in einem gesunden Magen-Darm-Trakt eine stabile Mikroflora existiert, indem "gutartige" Bakterien wie Laktobazillen und Bifidobakterien potentiell pathogene Keime an einer starken Vermehrung hindern, indem sie die Rezeptoren am Darmepithel besetzen und so pathogene Keime von der Adhäsion abhalten. Die "gutartigen" Keime produzieren Komponenten, welche die Proliferation der

pathogenen Keime hemmen oder diese abtöten. Auch die in fermentierten Milchprodukten von den Milchsäurebakterien produzierte Säure kann das Wachstum pathogener Keime verhindern. Der Autor maß einem weiteren Mechanismus große Bedeutung bei, der Stimulierung der Immunantwort des Wirtes gegenüber Keimen.

An der Antwort auf die Frage, auf welche Weise die Immunantwort durch Probiotika stimuliert werden kann, haben viele Autoren, speziell bezogen auf Laktobazillen, gearbeitet: Durch eine Adhäsion an der Mukosaoberfläche konnte es zur Ausbildung einer Immunantwort kommen, da in diesem Fall Antigene entlassen wurden und eine Stimulierung des sezernierenden Immunsystems im Darm stattfand (BLACK et al., 1987). MIAKE et al. (1985) und NOMOTO et al. (1985) berichten über die Wichtigkeit von *Lactobacillus casei* - Gaben für den Anstieg der Wirtsabwehrmechanismen zum Schutz vor enteralen Infektionen. Als Mediatoren für die Stimulation der Wirtsimmunität vermuteten MOINEUAU und GOULET (1991) bakterielle Metabolite und Zellwandkomponenten oder einfach eine Kolonisation durch Milchsäurebakterien. Die orale Gabe der Laktobazillen wirkte sich steigend auf die lokale (mukosale) und die systemische Immunität aus (PERDIGON et al., 1987, 1988, 1990, DE SIMON, 1986). MC QUEEN et al. (1986) behauptete in dem Zusammenhang, daß lebensfähige besser als nicht lebensfähige Mikroorganismen wirkten. Die immunitätssteigernde Eigenschaft oral applizierter Laktobazillen (*L. casei*, *L. delbrückii* ssp. *bulgaricus*) bestand in der Induktion der Abgabe lysosomaler Enzyme von peritonealen Makrophagen, der Aktivierung der Zellen des mononukleären Phagozytensystems und der Stimulierung der Lymphozyten (PERDIGON et al., 1986, 1987). Die lokale Antwort in der intestinalen Mukosa auf die Laktobazillen sollte laut PERDIGON et al. (1990) über eine gesteigerte Produktion von sekretorischem IgA laufen, verursacht durch B- und T-Lymphozyten (NENCIONI et al., 1983; TAGLIABUE et al. 1983, MORGAN et al., 1984). Dieses S-IgA verhinderte die Ansiedlung pathogener Keime, indem es sie im Lumen des Darmes verklumpte und Ansiedlungsfaktoren der pathogenen Keime blockte (CANTEY, 1987). Die bisher genannten Arbeiten gingen von Laktobazillen zum Prophylaxeinsatz aus. KAILA et al. (1992) haben Laktobazillen (*Lactobacillus* GG-ein humaner Stamm) als Therapeutikum bei an Rotavirusinfektionen erkrankten Kindern untersucht. Sie beobachteten einen signifikanten Anstieg der humoralen Abwehr (unspezifisch) und der spezifischen lokalen IgA-Antwort. PERDIGON et al. (1990) dagegen berichteten, daß eine therapeutische Gabe von Laktobazillen (*L. casei*, *L. acidophilus*), d.h. also nach einer Infektion mit einem pathogenen Keim, keinen förderlichen Effekt hatte. CARLSON und BRATTHALL (1985) zeigten, daß Laktobazillen im Gegensatz zu anderen Mikroorganismen nur eine sehr schwache Immunogenität haben.

In den letzten zehn Jahren stieg das Angebot an fermentierten Milchprodukten, die aus dem Magen-Darm-Trakt des Menschen stammende lebende probiotische Bakterien enthalten, enorm an. Diese Bakterien gehören vorwiegend in die Genera *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* (O'SULLIVAN et al., 1992)

Neben den bisher erwähnten Effekten von Probiotika (Inhibition pathogener Mikroorganismen, Stimulierung des Immunsystems), führen O'SULLIVAN et al. (1992) die Aktivität gegen Krebs, die Linderung von Laktoseintoleranz, Senkung der Blutcholesterolspiegel und auch eine verbesserte

Ausnutzung der Nahrung auf.

O'SULLIVAN et al. (1992) trugen zusammen, daß die Präsenz organischer Säuren in fermentierten Milchprodukten für die von anderen Autoren angenommene Senkung des Blutcholesterolspiegels verantwortlich sein könnte.

Die Autoren geben in ihrem Artikel aber zu bedenken, daß alle bisher aufgeführten vorteilhaften Effekte von Probiotika (hier speziell fermentierte Milchprodukte) bisher nur auf Annahmen beruhen, mit Ausnahme der Bedeutung für die Laktosemalabsorption, die durch viele Arbeiten belegt wurde. Bis heute gibt es zu den weiteren angegebenen vorteilhaften Effekten der probiotischen Bakterien, die in kommerziellen Produkten enthalten sind, keine wissenschaftlichen Beweise, was bisher am schlechten Design der experimentellen Studien lag. In diesem Punkt sind sich viele Autoren einig (MARSHALL, 1992; GURR, 1991; FULLER, 1991; DALY, 1992; HOSE und SOZZI, 1992), und bevor präventive oder gar therapeutische Wirkungen des Verzehrs von Produkten mit probiotischen Bakterien (Sauermilchprodukte) als gesichert angesehen werden können, bedarf es auf diesem Gebiet weiterer Klärung.

Der einzige bisher erwiesene positive Effekt ist die Förderung der Laktoseverdauung. Dieses wurde als Argument für die Forderung gewertet, daß ein Joghurt lebende Keime in ausreichender Konzentration enthalten müsse. EG-weit wird diskutiert, ob dies ein wertgebendes Merkmal von fermentierten Milchprodukten, speziell Joghurt sein sollte. In acht von zwölf EG-Mitgliedstaaten war 1992 für Joghurt eine Mindestanzahl an charakteristischen Fermentationskeimen vorgeschrieben, die im Bereich zwischen 10^6 und 10^8 KbE/G lag. Nur in 3 Mitgliedstaaten darf das nachträglich wärmebehandelte Produkt Joghurt genannt werden. Ein vor dem Europäischen Gerichtshof ausgetragener Rechtsstreit unterstrich die Bedeutung dieser Frage im Hinblick auf den innergemeinschaftlichen Handel (GLASER, 1992).

2.9. Verdaulichkeitsbestimmung mittels Marker

Marker werden in der Ernährungsphysiologie zur Bestimmung der Passagerate von Digesta und zur Bestimmung von Verdaulichkeiten von Digesta-Inhaltsstoffen, besonders von Protein, aber auch von anderen Verbindungen, wie z.B. Laktose verwendet. Eingesetzt werden besonders Metalloxide (Cr_2O_3 , Fe_2O_3 , TiO_2) (KÖHLER et al., 1990; UDEN et al., 1980, KRAWIELITZKI et al., 1987), radioaktiv markierte Substanzen (DRING, 1987, JUHR et al., 1987, 1990, 1991) und radio-opaque Substanzen (Bariumsulfat) (CUMMINGS et al., 1976) als Festphasen-Marker, d.h. sie dienen der Bestimmung der Passagerate oder Verdaulichkeit von Stoffen, die mit der festen Phase des Nahrungsbreies durch den Magen-Darm-Kanal transportiert werden. Dies sind meist Stoffe, die nicht in Wasser gelöst werden können. Stoffe, die sich in Wasser lösen lassen, wandern meist mit der sogenannten flüssigen Phase durch den Magen-Darm-Kanal und sollten mittels eines Markers bestimmt werden, der ebenso mit der flüssigen Phase der Digesta transportiert wird. Polyethyleneglycol (PEG) (HYDEN, 1955), Co-EDTA (KÖHLER et al., 1990; UDEN et al., 1982) und Cr-EDTA (DOWNES & MCDONALD, 1964;

UDEN,1982) wurden bislang als Marker für die flüssige Phase im Darminhalt eingesetzt.

KÖHLER et al. (1990) verglichen verschiedene Digesta-Sammel-Methoden und verschiedene Marker im Hinblick auf die Bestimmung der Verdaulichkeit von Nährstoffen im distalen Ileum von Schweinen. Sie verwendeten TiO_2 als Marker für die feste Phase der Digesta im Vergleich zu Cr_2O_3 und Co-EDTA als Marker für die flüssige Phase. Die Autoren beschrieben, daß die aufgetretenen Unterschiede der Wiederfindungsrate der Marker zeigte, daß eine Separation zwischen der festen und der flüssigen Phase eintrat. Die Wiederfindungsrate von Kobalt lag höher als die von Chrom.

UDEN et al. (1980) beschrieb, daß Feste-Teilchen-Marker allgemein schlechter geeignet waren, um Passageraten oder Verdaulichkeiten zu bestimmen, als flüssige Marker. Letztere waren weniger in der Lage, sich von der zu bestimmenden Fraktion wieder abzusetzen, die Durchmischung war effektiver. Feste-Teilchen-Marker zeigten oft das Problem, daß sie sich an Teile der Digesta anlagerten, die nicht bestimmt werden sollten. Es war häufig erforderlich sowohl einen festen als auch einen flüssigen Marker einzusetzen. Die Autoren verglichen die beiden Flüssigmarker Cr-EDTA und Co-EDTA miteinander und kamen zu dem Schluß, daß mit beiden Markern die gleichen Ergebnisse erzielt werden konnten. Beide Marker wurden in geringen Mengen mit dem Urin der meisten Tiere ausgeschieden (2-3%), sind aber, wie schon DOWNES und MCDONALD (1964) feststellten, gut als Marker für Bestandteile der flüssigen Phase der Digesta geeignet. Sie erfüllen die von LAPLACE (1972) gestellten Anforderungen weitestgehend:

- leichte Dosierbarkeit
- präzise Wiederfindung
- Nichtresorbierbarkeit
- Stabilität während der Passage
- annähernd gleiches spezifisches Gewicht wie die Digesta

BRAND und KÜHN beschrieben 1987 die Bestimmung des Verdaulichkeitsmarkers Cr-EDTA nach einem nach Kjeldahlaufschluß als Diphenylkarbazon-Komplex als gut geeignet, um die Verdaulichkeit einzelner Substanzen im Kot und im Darminhalt zu bestimmen.

3. Material und Methoden

3.1. Anzucht der Laktobazillen

3.1.1. Der Bakterienstamm

In allen Versuchen wurde ein *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* verwendet. Dieser Stamm sowie die zur Anzucht erforderlichen verfahrenstechnischen Angaben wurden vom Laboratorium Wiesby (Niebüll) zur Verfügung gestellt. Dort hat der Laktobazillenstamm die Spezifikation:

Lactobacillus delbrückii ssp. *bulgaricus* 709-1

mit der angegebenen optimalen Inkubationstemperatur von 44-45 °C.

3.1.2. Anzucht der Laktobazillen in MRS-Bouillon

Aus dem Lyophilisat wurde mit einem sterilen Spatel eine Spitze entnommen und in 100 ml MRS-Bouillon (Merck Art. 1.10661) gegeben. Dieses Inoculum wurde für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Obwohl die optimale Wachstumstemperatur für diesen Stamm mit 42 °C angegeben war, wurden in dieser Arbeit 37 °C gewählt. Damit sollte bereits bei der Keimanzucht eine Annäherung an die in-vivo-Verhältnisse im Tierversuch erreicht werden.

Aus der gut bewachsenen Kultur wurden 5 ml in 100 ml sterile MRS-Bouillon überimpft (also 5 %) und bei 37° C für weitere 16-18 Stunden inkubiert. Dieser Ansatz wurde entweder sofort zur quantitativen Weiterkultivierung genutzt, oder bei 4° C im Kühlschrank maximal eine Woche gelagert. Bei Weiterkultivierung wurden 5 % der Vorkultur in die MRS-Bouillon als Hauptkultur überimpft und bei 37 °C für 16-18 Stunden inkubiert.

3.1.3. Erstellung einer Wachstumskurve zur Ermittlung der optimalen Wachstumszeit

Um eine möglichst große Ausbeute an lebenden Laktobazillen zu erhalten, war es erforderlich den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die log-Phase des Keimwachstums in die stationäre Phase übergeht. Dafür wurde eine Wachstumskurve ermittelt. 5 ml der Vorkultur wurden in 100 ml MRS-Bouillon (Merck Art. 1.10661) (5 %) überimpft, zur Vermischung geschwenkt, und aus dem Ansatz wurden sofort 0,5 ml entnommen und in 4,5 ml Phosphatpuffer überführt (Verdünnung 1:10) und zur Bestimmung der Ausgangszellzahl verwendet.

Die Hauptkultur wurde bei 37° C inkubiert. Stündlich wurden 0,5 ml aus der Hauptkultur zur Keimzahlbestimmung entnommen. Nach 16 Stunden wurde die Probe jede 2. Stunde abgenommen, bis 22 Stunden Bebrütungsdauer. Zur Ermittlung der 24 Stunden-Werte wurde mit einer Zeitdifferenz von 12 Stunden ein neuer Ansatz (gleiche Vorbedingungen wie oben) bereitgestellt, aus dem dann nach 13 Stunden Inkubation

die erste Entnahme vorgenommen wurde. Daten, die parallel aus beiden Ansätzen zu gleichen Inkubationszeiten erhoben wurden, zeigten eindeutige Übereinstimmungen der Keimdichte.

Aus der Verdünnung 1:10 der Proben wurde jeweils eine Verdünnungsreihe erstellt, bis 1:10⁶, ab 8 Stunden Inkubationszeit bis 1:10⁸. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden 50 µl auf MRS-Agar (Merck Art. 1.10660) pipettiert. Die Platten wurden bei 37° C für 48 Stunden anaerob (Anaerobiertopf Merck (Art. 16387)) mit Anaerokult® (Merck Art. 13829) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Kolonien unter dem Stereomikroskop (Nikon, SMZ-U) gezählt. In der auszählenden Verdünnung sollten ca. 10-200 Kolonien zu sehen sein. Über die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) und die jeweilige Verdünnung, wurde die Keimzahl ermittelt und daraus die Wachstumskurve erstellt. Dieses wurde mehrfach durchgeführt und eine exemplarische Wachstumskurve des verwendeten Stammes *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 erstellt.

3.1.4. Prüfung des Laktobazillenstammes auf Reinheit

Für die späteren Tierversuche mit gnotobiotischen Tieren war es essentiell, die absolute Reinheit des eingesetzten Stammes zu sichern.

Dazu wurde der Laktobazillenstamm mit Hilfe des api 50 CHL-Mediums (BioMerieux Nr.50410) und dem api 50 CH-Teststreifen (BioMerieux Nr.50300) auf seinen Kohlehydrat-Metabolismus, genauer die Fermentation überprüft. Der Test arbeitet nach dem Prinzip, daß die durch die Fermentation verschiedener Kohlenhydrate entstehenden organischen Säuren mittels eines Indikators angezeigt werden. Diese Methode wird genutzt, um einen Bakterienstamm über sein biochemisches Profil zu identifizieren und zu typisieren.

Aus dem Laktobazillen-Lyophilisat wurde wie unter 3.1.2. beschrieben eine Hauptkultur hergestellt. Aus dieser wurde ein Ausstrich auf MRS-Agar (Merck Art. 1.10660) hergestellt und für 24 Stunden bei 37° C in anaerober Atmosphäre (wie unter 3.1.3. beschrieben) bebrütet. Nachdem nochmals überprüft wurde, daß es sich um Laktobazillen handelt (grampositive Stäbchen, Katalase negativ, d.h. keine Bläschenbildung nach Kontakt mit H₂O₂, sporenlos, strikt oder fakultativ anaerob und Wachstum auf MRS-Medium), wurde die gesamte Kultur mit einem sterilen Wattetupfer in 2 ml steriles demineralisiertes Wasser eingebracht. Aus der dichten Suspension wurden mit einer sterilen Pasteurpipette soviel entnommen und in eine Ampulle mit 5 ml sterilem Aqua dest. gegeben, bis die Suspension eine Dichte von 2.0 entsprechend McFarland-Standard (BioMerieux Art.70900) erreichte. Aus dieser Suspension wurde nun die doppelte Menge in eine Ampulle mit API 50 CHL-Medium pipettiert und gut gemischt, um dann in die Microröhrchen des API 50 CH-Systems gefüllt zu werden. Alle Röhrchen wurden abschließend mit Paraffinöl überschichtet. Die als feuchte Kammer fungierende Wanne wurde mit einem Deckel verschlossen und dann für 48 Stunden bei 37° C inkubiert.

Die Microröhrchen enthalten eine definierte Menge dehydratisiertes Substrat, Kohlenhydrate und Derivate (Heteroside, Polyalkohole und Uronsäuren):

Streifen Nr. 1	Streifen Nr. 2	Streifen Nr. 3	Streifen Nr. 4	Streifen Nr. 5
0 Kontrolle	10 Galactose	20 α-Methyl-D-Mannosid	30 Melibiose	40 D Turanose

1 Glycerol	11 Glucose	21 α -Methyl-D-Glucosid	31 Saccharose	41 D Lyxose
2 Erythrit	12 Fructose	22 N-Acetyl-Glucosamin	32 Trehalose	42 D Tagatose
3 D-Arabinose	13 Mannose	23 Amygdalin	33 Inulin	43 D Fucose
4 L-Arabinose	14 Sorbose	24 Arbutin	34 Melezitose	44 L Fucose
5 Ribose	15 Rhamnose	25 Esculin	35 Raffinose	45 D Arabit
6 D-Xylose	16 Dulcit	26 Salicin	36 Stärke	46 L Arabit
7 L-Xylose	17 Inosit	27 Cellobiose	37 Glycogen	47 Gluconat
8 Adonit	18 Mannit	28 Maltose	38 Xylit	48 2-Keto-Gluconat
9 β -Methyl-D-Xylosid	19 Sorbit	29 Lactose	39 Gentibiose	49 5-Keto-Gluconat

Die Reaktionen wurden nach 24 und 48 Stunden abgelesen. Eine Fermentation wurde dadurch festgestellt, daß der Bromkresolpurpurindikator von violett nach gelb umschlug.

Die Auswertung war semiquantitativ. Der Wert 0 wurde für eine negative, der Wert 5 für eine stark positive Reaktion vergeben. 1, 2, 3 und 4 wurden für die intermediären Reaktionen vergeben, 3, 4 und 5 wurden positiv gewertet.

Die Resultate wurden auf einem Ergebnisblatt notiert. Sie sind das biochemische Profil des Laktobazillen-Stammes. Die Auswertung erfolgte mit der Software: API lab plus.

Diese Prüfung auf Reinheit erfolgte zum einen sofort nach Erhalt des lyophilisierten Stammes in Parallelen und mehrmals vor der quantitativen Anzucht der Laktobazillen für die Tierversuche.

3.1.5. Herstellung von Laktobazillensuspensionen

Um im späteren Tierversuch und auch in einigen Vorversuchen möglichst große Laktobazillenzahlen in geringster Menge Medium zu erhalten, mußte eine Methode gefunden werden, die Suspension aufzukonzentrieren. Es durfte dabei weder zu einem Verlust der Vitalität der Keime noch zu einer Schädigung der für den Versuch essentiell wichtigen β -Galactosidase kommen.

Die Hauptkultur wurde bei 3000 U/min für 10 Minuten unter sterilen Bedingungen in verschlossenen autoklavierten Plastikzentrifugenbechern (1 Liter Fassungsvermögen) zentrifugiert (MLW K80-Zentrifuge). Das Keimpellet wurde in Phospatpuffer (pH 6,8) resuspendiert. In dieser Form konnten die Laktobazillenpellets bei 4° C im Kühlschrank bis zu eine Woche gelagert werden, ohne daß es zu Veränderungen kam.

Der Phosphatpuffer:

(Für 2 Liter Puffer)

1. 9,0 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
 2. 12,0 g Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
 3. 0,8 ml Thioglycolsäure
- mit Aqua bidest. auf 2000 ml auffüllen, den pH-Wert mit ortho-Phosphorsäure (H_3PO_4 , 85% p.a., Merck Art. 573) auf 6,9 einstellen.

3.2. Allgemeine Analysen

In allen Versuchen wurde mit der im folgenden aufgeführten Analytik gearbeitet. Modifikationen wurden an entsprechender Stelle erwähnt. Im allgemeinen wurde in den Proben die β -Galactosidase-Aktivität, die Höhe der Laktosemenge und die Keimzahl bestimmt.

3.2.1. Behandlung der Laktobazillen mit Ultraschallwellen zur Differenzierung zwischen in den Zellen eingeschlossener und gesamter β -Galactosidase

Die von den Laktobazillen produzierte β -Galactosidase wurde teilweise aus den Bakterien freigesetzt und befand sich im umgebenden Medium. Um das Verhältnis zwischen der gesamt sich in der Probe befindlichen (extrazellulär + intrazellulär) und der in den Bakterien eingeschlossenen β -Galactosidase zu bestimmen, wurden die Proben jeweils vor (β -Galactosidase außerhalb der Keime) und nach Ultraschallwellenbehandlung (β -Galactosidase eingeschlossen in Keimen) auf ihre β -Galactosidase-Aktivität hin untersucht.

Die Proben wurden mit Reinstwasser verdünnt, 1:10 oder 1:100; in Abhängigkeit von der zu erwartenden β -Galactosidase-Aktivität. Aliquote jeder Probe von 2,5 ml wurden in Plastikröhrchen unter ständiger Kühlung im Eisbad Ultraschallwellen (Ultraschallprozessor UP 200S, Dr. Hielscher) ausgesetzt, um die in den Laktobazillen eingeschlossene β -Galactosidase freizusetzen. Die Einstellung des Gerätes zur Zellzerstörung unter besonderer Schonung des Enzyms wurde nach Herstellervorschlag und eigenen Vorversuchen wie folgt gewählt:

Amplitude: 100%

Cycle time: 0,2 Sec.

Beschallungsdauer: 5 Min.

3.2.2. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität mit ortho-Nitrophenyl- β -Galaktosid als Substrat

Die Aktivität der mikrobiellen β -Galactosidasen der Laktobazillen wurden in allen Versuchen mit ortho-Nitrophenyl- β -Galaktosid (o-NPG) als Substrat bestimmt. Die β -Galactosidase der Laktobazillen kann

neben Laktose auch Substratalaloga wie die Nitrophenyl-Galaktoside hydrolysieren. Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens ist höher, somit konnten auch noch geringere Mengen Enzyms detektiert werden.

Prinzip:

Im sichtbaren Bereich des Lichts hat o-NPG eine zu vernachlässigende optische Dichte, die bei der Probenmessung durch die Messung gegen die Blindprobe erfaßt wurde. Das Substrat o-NPG wurde von der in einer Probe enthaltenen β -Galactosidase in die Monomere Galaktose und o-Nitrophenol zerlegt. Das durch diese Hydrolyse freigesetzte o-Nitrophenol ist zu einem tautomeren Wechsel befähigt und weist im alkalischen Milieu eine gelbe bis orangerote Farbe auf, mit einem Absorptionsmaximum bei 420 nm (HESTRIN et al., 1955). Die Zunahme der optischen Dichte pro Zeiteinheit war der pro Zeiteinheit hydrolysierten Menge o-NPG direkt proportional. Die Angabe der gemessenen Aktivität erfolgte in internationalen Einheiten/Units (IU). Eine IU entspricht der Enzymmenge, die 1 μ mol o-NPG zu o-Nitrophenol und Galaktose pro Minute bei einem pH-Wert von 7,25 und 37° C hydrolysiert.

Ansatz

100 μ l (unbeschallt) bzw. 50 μ l (beschallt) Probe wurden in 1000 μ l Ansatzvolumen unter Anwesenheit von 2 mmol/l o-NPG 40 min bei 37° C im Wasserbad inkubiert (Certomat WR, B. Braun). Ein Ansatz pro Probe diente als Blindwert. Dazu wurde dieser vor Zugabe des o-NPG für 10 min auf 100° C erhitzt, um die β -Galactosidase zu inaktivieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit aller Proben (inklusive der Blindwerte) wurde die Reaktion durch Alkalisierung mit 1000 μ l 0,25 M Na₂CO₃ gestoppt. Nach 10 minütiger Zentrifugation mit 6000 g bei 4° C (Eppendorf Centrifuge 5402) wurden 1000 μ l des Überstandes mit 1000 μ l Chloroform-Amylalkohol (Verhältnis 9:1) zu Säuberung geschüttelt, wieder zentrifugiert (bei 2500 g, 10 min, 20° C) (Eppendorf Centrifuge 5402), und die Extinktion des Überstandes wurde bei 420 nm gegen Wasser gemessen (Cary UV Visible Spectrometer).

Pipettierschema:

	Blindwert	Probe	Eichreihe
Na Phosphatpuffer	800 μ l	800 μ l bzw. 850 μ l	z.B. 980 μ l
Probe	100 μ l	100 μ l bzw. 50 μ l	
	10 min bei 100° C		
o-NPG	100 μ l	100 μ l	
o-Nitrophenol			z.B. 20 μ l

mischen und 40 min bei 37° C im Wasserbad inkubieren

Na ₂ CO ₃	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l
---------------------------------	--------------	--------------	--------------

mischen und 10 min bei 4° C und 6000 g zentrifugieren

Probenüberstand	1000 µ l	1000 µ l	1000 µ l
Chloroform-Amylalkohol	1000 µ l	1000 µ l	1000 µ l

mischen und 10 min bei 20° C und 2500 g zentrifugieren Überstand: Extinktion bei 420 nm im Photometer messen

Reagenzien:

- 0,07 mol/l di-Natrium-hydrogenphosphat-Puffer, (pH 7,25), Merck Art. 6579
- ortho-Phosphorsäure; H₃PO₄, 85% p.a., Merck Art. 573; zum Einstellen des pH-Wertes des oben genannten Puffers
- 0,02 mol/l ortho-Nitrophenyl-Galaktopyranosid, Boehringer Art. 810 088, in Na-Phosphatpuffer (pH 7,25)
- 0,25 mol/l Natriumcarbonat; Na₂CO₃ wasserfrei, Merck Art. 6392
- Chloroform-Amylalkohol-Gemisch; Chloroform p.a., Merck Art. 2445; Amylalkohol, Merck Art. 2367; Mischungsverhältnis: 25 Teile Chloroform + 1 Teil Amylalkohol
- 5 mmol/l o-Nitrophenol Stammlösung zur Bestimmung einer Eichgeraden, Boehringer Art. 810 432

Eichreihe:

0,05 µ mol/ml Testansatz = 20 µ l Stammlösung/ml Ansatz
 0,1 µ mol/ml Testansatz = 40 µ l Stammlösung/ml Ansatz
 0,2 µ mol/ml Testansatz = 80 µ l Stammlösung/ml Ansatz
 0,3 µ mol/ml Testansatz = 120 µ l Stammlösung/ml Ansatz
 0,4 µ mol/ml Testansatz = 160 µ l Stammlösung/ml Ansatz
 0,5 µ mol/ml Testansatz = 200 µ l Stammlösung/ml Ansatz

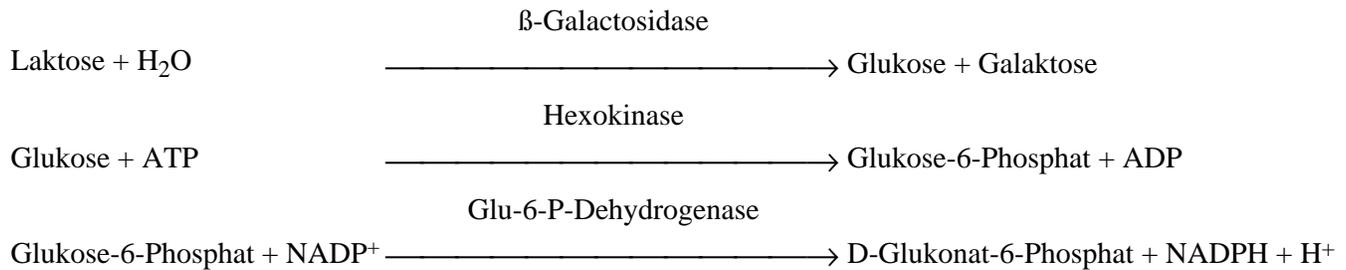
3.2.3. Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität mit Laktose als Substrat

Die Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität erfolgte in modifizierter Form nach DAHLQUIST (1984b).

Prinzip:

Der Test verlief nach folgendem Prinzip:

Zu einer Probe, die β-Galactosidase enthielt, wurde Laktose in einer Menge zugesetzt, die oberhalb der Sättigungsgrenze des Enzyms lag.



Die molare Menge an gebildetem $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ist der hydrolysierten molaren Menge Laktose äquivalent und wurde über die Änderung der optischen Dichte ermittelt. Bezogen auf den Reagenzienleerwert (Blank) wurde die Extinktionsdifferenz am Photometer (Cary UV Visible Spectrometer) bei 340 nm ermittelt. Alle Proben wurden gegen den entsprechenden Probenleerwert gemessen. Dieser Probenleerwert wurde durch Zugabe von Tris-Puffer vor dem Zupipettieren der Laktoselösung hergestellt, wodurch eine Hydrolyse der Laktose verhindert wurde. Eine IU wurde als $\mu\text{ mol}$ hydrolysierte Laktose pro Minute bei 37° C berechnet.

Ansatz:

Zunächst wurden in einem $400\ \mu\text{ l}$ Ansatz je $200\ \mu\text{ l}$ Probe mit je $200\ \mu\text{ l}$ Laktoselösung (pH 5,5) gemischt und 60 min bei 37° C im Wasserbad (Certomat WR, B. Braun) inkubiert.

Es wurden jeweils 2 mal $100\ \mu\text{ l}$ des Gemisches entnommen und je $1350\ \mu\text{ l}$ Tris-Puffer hinzugefügt, um die β -Galactosidase zu inaktivieren und eine weitere Hydrolyse zu verhindern. Zu diesem Ansatz wurden $100\ \mu\text{ l}$ Adenosin-5'-triphosphat/NADP⁺-Gemisch und $50\ \mu\text{ l}$ Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mischung hinzugefügt und anschließend die Extinktion zum Leerwert gemessen. Als Reagenzienleerwert (Blank) wurde ein Ansatz verwendet, bei dem Wasser anstatt Homogenat eingesetzt wurde.

Pipettierschema:

	Probe	Probenleerwert	Blank/Glukose-Standard
aufbereitete Probe	$200\ \mu\text{ l}$	--	--
Laktoselösung (pH 5,5)	$200\ \mu\text{ l}$	--	--

mischen und bei 37° C im Wasserbad (Certomat) 60 min inkubieren

Inkubat (Probe/Laktoselsg.)	$100\ \mu\text{ l}$	--	--
Probe	--	$50\ \mu\text{ l}$	--
Wasser/Glukosestandard	--	--	$100\ \mu\text{ l}$
Tris-Puffer	$1350\ \mu\text{ l}$	$1350\ \mu\text{ l}$	$1350\ \mu\text{ l}$

ATP/NADP	100 μ l	100 μ l	100 μ l
HK/Glu-6-P-DH	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Laktoselösung (pH 5,5)	--	50 μ l	--

mischen und 30 min im Wasserbad (Certomat) bei 37° C inkubieren; anschließend bei 340 nm am Photometer gegen den Blank messen

Reagenzien:

- 0,1 mol/l Citratpuffer (pH 5,5); Citronensäure-monohydrat; Merck Art. 7891
- 1 mol/l NaOH; zum Einstellen des pH-Wertes des Citratpuffers; Merck Art. 9137
- 0,056 mol/l Laktoselösung in Citratpuffer angesetzt; Laktose (Monohydrat) Merck Art. 7657
- 0,5 mol/l Tris-Puffer (pH 7,6); Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; Boehringer Art. 708 968
- 5 mol/l HCl (32%); zum Einstellen des pH-Wertes des Tris-Puffers; Merck Art. 319
- Adenosin-5'-triphosphat/Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (150 mM ATP; 12 mM NADP⁺) in Triethanolamin-HCl (pH 7,5) (Triethanol- hydrochlorid und MgSO₄); Boehringer Art 127 523 und 128 040
- Hexokinase/Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; Boehringer Art. 737 275
- Glukose-Standards; Glukose (Monohydrat) Merck Art. 8342

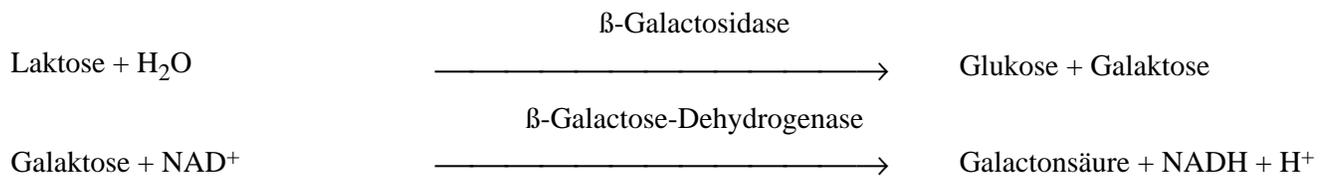
Eichreihe:

0,25 mmol/l Glukose
0,50 mmol/l Glukose
1,00 mmol/l Glukose
2,00 mmol/l Glukose
3,00 mmol/l Glukose

3.2.4. Ermittlung der Lactose/D-Galaktose-Menge in den Proben

Für diese Bestimmung wurde der "UV-Test zur Bestimmung von Lactose und D-Galactose in Lebensmitteln und anderen Probenmaterialien" von Boehringer Art. 176 303 genutzt.

Prinzip:



Die bei dieser Reaktion entstandene NADH + H⁺-Menge war der Laktose-bzw. Galaktosemenge äquivalent. NADH+H⁺ wurde im Photometer (Cary UV Visible Spectrometer) bei 340 nm bestimmt.

Ansatz:

Der Test wurde entsprechend den Herstellerangaben direkt in der Küvette für das Photometer angesetzt. Verwendet wurden Plastikeinwegküvetten. Aus jeder vorbereiteten Probe (siehe unter 3.2.5.) wurden 2 Ansätze mit Leerwert einmal für Laktose, das andere Mal für Galaktose, hergestellt. Es wurde nach dem Pipettierschema gearbeitet (s. unten) und nach Zugabe der jeweiligen Reagenzien 2 mal die Extinktion bei 340 nm im Photometer (Cary UV Visible Spectrometer) bestimmt. Für die Proben und die Leerwerte wurden die Extinktionsdifferenzen aus den beiden Messungen errechnet. Dann wurden die Extinktionsdifferenzen der Leerwerte von den Extinktionsdifferenzen der Proben abgezogen → Δ E. Da die verwendeten Probenmaterialien (z.B. Kot) neben Laktose auch freie Galaktose enthielten, mußte dieses bei der Ermittlung der Laktosemenge berücksichtigt werden. Diese Galaktosemenge mußte von der gefundenen Gesamtmenge entsprechend subtrahiert werden, um die tatsächlich in der Probe enthaltene Laktosemenge zu erhalten:

Δ E_{D-Galaktose} (aus der "D-Galaktose-Probe")
 und
 Δ E_{Laktose + D-Galaktose} (aus der "Laktose-Probe")

Die Differenz dieser Werte ergibt:

Δ E_{Laktose}

Pipettierschema:

In Küvetten pipettieren	Leerwert Laktose-Probe	Laktose-Probe	Leerwert D-Galaktose-Probe	D-Galaktose-Probe
Lösung 1	100 µ l	100 µ l	100 µ l	100 µ l
Suspension 2	25 µ l	25 µ l		
Probelösung		50 µ l		50 µ l

mischen, 15 min bei 20-25° C stehenlassen, dann Zugabe von:

Lösung 3	500 μ l	500 μ l		500 μ l	500 μ l
bidest. Wasser	1000 μ l	950 μ l		1025 μ l	975 μ l

mischen, nach ca. 2 min Extinktionen der Lösungen messen. Reaktion starten durch Zugabe von:

Suspension 4	25 μ l	25 μ l		25 μ l	25 μ l
--------------	------------	------------	--	------------	------------

mischen, Stillstand der Reaktion abwarten (ca. 20 min) und Extinktionen der Lösungen messen (sollte die Reaktion nach 20 min nicht zum Stillstand gekommen sein, Extinktionen weiter in 2-min Abständen messen, bis eine konstante Extinktionsänderung pro 2 min erreicht ist, danach auf die Zeit der Zugabe von Suspension 4 extrapolieren)

Reagenzien:

Die Test-Combination von Boehringer enthielt:

1. Flasche 1 mit ca. 610 mg Lyophilisat, zusammengesetzt aus: Citrat-Puffer, pH 6,6; NAD, 35 mg; Magnesiumsulfat; Stabilisatoren. Das Lyophilisat wurde vor Gebrauch in 7,0 ml bidest. Wasser gelöst.
2. Flasche 2 mit ca. 1,7 ml Enzymsuspension β -Galactosidase, ca. 100 IU.
3. Flasche 3 mit 34 ml Lösung: Kaliumdiphosphat-Puffer, pH 8,6; Stabilisatoren.
4. Flasche 4 mit ca. 1,7 ml Enzymsuspension Galactose-Dehydrogenase, ca. 15 IU
5. Lactose-Standardlösung

Berechnung:

Nach der allgemeinen Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration gilt:

$$c = \frac{V * MG}{\epsilon * d * v * 1000} * \Delta E \text{ [g/l], wobei}$$

V = Testvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d = Schichtdicke [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH+H⁺ bei: 340 nm = 6,3 [l * mmol⁻¹ * cm⁻¹]

Hieraus ergab sich für Laktose (als Monohydrat berechnet):

$$3,3 * 342,3$$

$$11,89$$

$$c = \frac{\quad \cdot \Delta E_{\text{Laktose}}}{6,3 \cdot 1 \cdot 0,1 \cdot 1000} = \frac{1,89 \cdot \Delta E_{\text{Laktose}}}{6,3 \text{ [g Laktosemonohydrat/l Probelösung]}}$$

Hieraus ergab sich für D-Galaktose:

$$c = \frac{3,3 \cdot 180,16}{6,3 \cdot 1 \cdot 0,1 \cdot 1000} \cdot \Delta E_{\text{D-Galaktose}} = \frac{5,945}{6,3 \text{ [g D-Galaktose/ l Probelösung]}} \cdot 1,89 \cdot \Delta E_{\text{Laktose}}$$

Vorgenommene Verdünnungen bei der Probenvorbereitung mußten bei der Berechnung noch berücksichtigt werden.

Bei der Analyse fester und halbfester Proben (hier Kot), die für die Probenvorbereitung eingewogen wurden, wurde das Analysenergebnis auf die Einwaage bezogen:

$$\text{Gehalt}_{\text{Laktose}} = \frac{c_{\text{Laktose}}[\text{g/l Probelösung}]}{c_{\text{Probe}}[\text{g/l Probelösung}]} \cdot 100 \text{ [g/100g]}$$

$$\text{Gehalt}_{\text{D-Galaktose}} = \frac{c_{\text{D-Galaktose}}[\text{g/l Probelösung}]}{c_{\text{Probe}}[\text{g/l Probelösung}]} \cdot 100 \text{ [g/100g]}$$

3.2.5. Enteiweißung des Probenmaterials vor der Bestimmung des Laktosegehalts

Die Proben mußten enteiweißt werden, da die enthaltenen Proteine den empfindlichen optischen Test stören könnten. Dazu wurde ca. 1 g des Probenmaterials (sowohl Kot als auch Kefir/Nahrung) in einen 100 ml-Meßkolben genau eingewogen. Es wurden etwa 60 ml Wasser hinzugefügt und 15 min bei ca. 70° C erhitzt. Der Kolben wurde gelegentlich geschwenkt. Zur Eiweißfällung wurden 5 ml Carrez-I-Lösung (3.6 g Kaliumhexacyanoferrat-II, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$), 5 ml Carrez-II-Lösung (7,2 g Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}/100 \text{ ml}$) und 10 ml NaOH (0,1 mol/l) hinzugefügt, nach jeder Zugabe kräftig geschüttelt, auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit Reinstwasser bis zu Marke aufgefüllt, danach filtriert (Faltenfilter, Mackerey-Nagel, MN 615 ¼; Ø 12,5 mm). Die klare bis schwach trübe Lösung wurde zum Test eingesetzt.

3.2.6. Keimzahlbestimmung in Laktobazillensuspensionen, Versuchsdiäten und Tierkot

Die Bestimmung der Keimzahlen in genanntem Probenmaterial erfolgte mittels des Plattentropfverfahrens wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben auf MRS-Agar-Platten (Merck Art. 1.10660). Die Inkubation erfolgte über 48 Stunden bei 37° C unter anaeroben Bedingungen im Anaerobentopf (Merck Art. 16387), wobei zur Erzeugung des anaeroben Milieus Anaerokult® (Merck Art. 13829) eingesetzt wurde.

3.2.7. Bestimmung des Verdaulichkeitsmarkers Cr-EDTA

Um eine exakte orofäkale Bilanzierung der Laktose (oral aufgenommen / fäkal ausgeschieden) vorzunehmen, wurde zusätzlich die wahre Verdaulichkeit der den Göttinger Minipigs verabreichten Laktose (die Laktose wird weder sezerniert noch bakteriell abgebaut) mit Hilfe eines Markers (Cr-EDTA; nicht verdaulich) bestimmt. Die Bestimmung des Verdaulichkeitsmarkers Cr-EDTA in einer Cr-EDTA-Standardlösung, in frischem Kefir und in gefriergetrocknetem Kot erfolgte nach Kjeldahlaufschluß als Cr-Diphenylcarbazon-Komplex spectralphotometrisch bei 542 nm (BRANDT und KÜHN, 1987). Die Analysen wurden im Institut für Tierernährung und Stoffwechselfysiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel durchgeführt. Die Angabe der wahren Verdaulichkeit, die mittels Cr-EDTA-Marker bestimmt wird, wird im folgenden als wahre marker-korrigierte Verdaulichkeit bezeichnet.

3.3. Vorversuche

3.3.1. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in Proben nach in vitro Pepsin/HCl-Verdauung

Es sollte in Erfahrung gebracht werden, ob und inwieweit unterschiedlich behandelte (mit und ohne ionisierende Strahlung) Laktobazillen-Pellets die Magenpassage überstehen können, d.h. ob und inwieweit Bedingungen wie sie im Magen vorherrschen die Viabilität und die β -Galactosidase-Aktivität der Laktobazillen beeinträchtigen. Dazu wurden Magenmilieu ähnliche Bedingungen geschaffen. Die bestrahlten und unbestrahlten Laktobazillenpellets wurden je einmal in Phosphatpuffer und je einmal in Kefir dem Magenmilieu ausgesetzt, um zusätzlich zu prüfen, in welchem Medium die in ihnen enthaltene β -Galactosidase besser vor der Verdauung geschützt ist. Gearbeitet wurde nach einer modifizierten Anleitung von ENGLYST, H. N. und KINGMAN, S. M (1990).

Die Proben wurden in einer Pepsin/HCl-Mischung, wie sie im Magen anzutreffen ist, bei 37° C inkubiert. Der pH-Wert der Pepsin/HCl-Mischung wurde einmal bei pH 2 festgelegt, was etwa dem Milieu des leeren Magens, und einmal bei pH 4, was eher dem Milieu des gefüllten Magens, entspricht. In festgelegten Intervallen wurden Proben aus dem Inkubat entnommen, und die β -Galactosidase-Aktivität darin mit o-NPG als Substrat (siehe 3.2.2.) bestimmt.

Ansatz:

Herstellung des Pellet-Phosphatpuffer-/Kefir-Gemisches:

Nach Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in der Pelletsuspension (unbestrahlt bzw. mit 20 kGy bestrahlt) wurde soviel Phosphatpuffer/Kefir zugesetzt, daß die Mischung 400 IU/l freie β -Galactosidase-Aktivität enthielt. Dazu wurde in der Pelletsuspension zuvor die Enzym-Aktivität gemessen (o-NPG als Substrat (s.3.2.2.)); freie und die gesamte in der Probe enthaltene β -Galactosidase, vor und nach Beschallung mit Ultraschallwellen unterschieden (s.3.2.1.)), und die entsprechende Menge mit Puffer/Kefir gemischt.

Es entstanden 4 Ansätze, die ständig im Eisbad zu kühlen waren:

1. Unbestrahlte Pelletsuspension in Kefir
2. Bestrahlte Pelletsuspension in Kefir
3. Unbestrahlte Pelletsuspension in Phosphatpuffer
4. Bestrahlte Pelletsuspension in Phosphatpuffer

Nun wurden je 5 ml der Ansätze mit je 10 ml Pepsinlösung (1:60.000)/HCl-Gemisch, pH 2 (50 mg Pepsin (Sigma Art.P 7012) auf 10 ml HCl (Merck Art. 319) mit einem pH von 2) versetzt, jeweils sofort eine Probe von 1 ml entnommen, und der Ansatz umgehend in das Schüttelwasserbad bei 37 °C zur Inkubation gestellt. Weitere Probennahmen erfolgten nach 5, 30, 60 und 120 min Inkubation.

Die entnommenen Proben von je 1 ml wurden jeweils sofort 1:10 mit Reinstwasser verdünnt und unverzüglich dem Enzymtest unterzogen (o-NPG als Substrat (s.3.2.2.)); freie β -Galactosidase und Gesamt- β -Galactosidase wurden, vor und nach Behandlung mit Ultraschall unterschieden (s.3.2.1.)).

Identische Proben wie oben (je 5 ml der Ansätze 1.-4.) wurden in Pepsin/HCl-Gemisch mit einem pH von 4 eingebracht und wie oben inkubiert und beprobt.

3.3.2. Gewinnung von Mukosahomogenaten mit anschließender Bestimmung der intestinalen β -Galactosidase-Aktivität beim Göttinger Minischwein

Säugetiere verfügen über β -Galactosidasen in ihrem Darm, die dort in der Mukosa lokalisiert sind (ASP et al., 1970a,b; ASP et al., 1971; ASP und DAHLQUIST, 1974). Im späteren Tierversuch sollte jedoch möglichst nur die mikrobielle β -Galactosidase erfaßt werden. Es war also erforderlich die Höhe der wirtseigenen, mukosalen β -Galactosidase-Aktivität festzustellen, zur Klärung, ob sie die Ergebnisse der Versuche verfälschen könnte.

6 konventionelle (nicht gnotobiotische) Göttinger Minischweine wurden im Alter von 3 Monaten durch eine intravenöse Injektion von Pentobarbital (Narcoren®, Rhone-Merieux (8 ml/Tier) getötet. Die Tötung der Tiere erfolgte einzeln, jeweils erst nach der Sektion des vorangegangenen Tieres. Sofort nach dem Eintritt des Todes wurde der Tierkörper eröffnet, der Dünndarm präpariert und auf Eis ausgebreitet. Um zu gewährleisten, daß möglichst geringe Fehler durch eine Zerstörung des sehr temperaturempfindlichen Enzyms auftraten, wurde der Darm immer frisch, direkt nach der Entnahme bearbeitet und der Enzymtest sofort im Anschluß durchgeführt. Die Proben für den Enzymtest wurden an 6 Stellen des Dünndarmes entnommen, bei 5%, 10%, 30%, 50%, 70% und 90% Länge des Darmes, beginnend vom Magenausgang. Die entnommenen ca. 10 cm langen Darmsegmente wurden durch vorsichtiges Ausstreichen vom Inhalt befreit, 3 mal mit gekühlter (4° C)

physiologischer Kochsalzlösung (0,9%ig) gespült und dann eröffnet. Um Schleimreste und Oberflächenfeuchtigkeit zu entfernen, wurde die Mukosa mit Zellstoff abgetupft. Die Mukosaschicht wurde mit einem Hornspatel abgeschabt, gewogen und in einer Verdünnung von 1:100 in Aqua bidest. homogenisiert (Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik).

Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität pro g Mukosafeuchtwicht erfolgte mit Laktose als Substrat (s.3.2.3.).

3.3.3. Gewinnung von Mukosahomogenaten mit anschließender Bestimmung der intestinalen β -Galactosidase-Aktivität bei Ratten

6 gnotobiotische Ratten wurden im Alter von 3 Monaten durch Dislokation der Halswirbel getötet. Alle folgenden Schritte erfolgten wie unter 3.3.2. beschrieben, allerdings wurden dann Darmsegmente mit einer Länge von nur 4 cm entnommen.

3.3.4. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivitäten und der Keimabtötung in Laktobazillensuspensionen nach Behandlung mit ionisierender Strahlung

Es mußte eine Methode gefunden werden, die eine Abtötung der Keime in fermentierten Milchprodukten ohne gleichzeitige Freisetzung oder irreversible Schädigung der mikrobiellen β -Galactosidase aus dem Keim gewährleistet. Dazu eigneten sich γ -Strahlen, da sie hauptsächlich eine Schädigung der Nukleinsäuren der Zellen hervorrufen, ohne die Zellmembranen der Laktobazillen anzugreifen.

Um die für die β -Galactosidase schonendste und gleichzeitig für die Abtötung wirkungsvollste Methode zu ermitteln, wurden mehrere Proben unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten ausgesetzt und anschließend die β -Galactosidase-Aktivität und die Keimzahl bestimmt.

Aus einer Kultur Laktobazillen, in 2 Litern MRS-Bouillon (Merck Art. 1.10661) angesetzt, wurde ein Pellet (s. 3.1.5.) gewonnen, das in 40 ml Phosphatpuffer (s. 3.1.5.) resuspendiert und in 11 Aliquote zu 2 ml (Falcon-Röhrchen) aufgeteilt wurde. 10 Portionen wurden bei unterschiedlichen Bedingungen (siehe unten, unter Bestrahlung) mit γ -Strahlen in einer Kobalt-Strahlenquelle (Hahn-Meitner-Institut/Berlin-Wannsee) bestrahlt, eine Probe blieb als Kontrolle (lebende Laktobazillen mit Enzymaktivität) unbestrahlt.

Bestrahlung:

Die Proben wurden mit unterschiedlicher Strahlungsintensität (Position 3 und 7 in der Strahlenquelle) bestrahlt. Dabei wurden jeweils 5 Proben auf Position 3 mit 5, 10, 15, 20 und 25 kGy und 5 Proben auf Position 7 mit 5, 10, 15, 20 und 25 kGy bestrahlt. Um die erforderliche Strahlendosis von 5, 10, 15, 20 und 25 kGy zu erhalten, mußten die auf Position 7 stehenden Proben länger bestrahlt werden, da sie weiter von der Strahlenquelle entfernt standen. Während der Bestrahlung war es nicht möglich, die Proben zu kühlen. Nach der Entnahme aus dem Reaktor wurden sie sofort bei 4° C kühl gelagert.

Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte, nachdem alle Proben die Strahlenquelle wieder verlassen hatten, noch am selben Tag, eine Woche später, 2 Wochen später und 5 Wochen später. Ebenso bei der

unbestrahlten Probe. Durch die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität in größeren Zeitintervallen konnte eine Aussage darüber gemacht werden, wie lange die β -Galactosidase-Aktivität während einer Lagerung weitgehend unverändert blieb.

Das Enzym wurde mit o-NPG als Substrat bestimmt (s.3.2.2.). Es wurde in der unbestrahlten Probe und in den bestrahlten Proben sowohl die freie (ohne Ultraschallbehandlung) als auch die gesamte in der Probe enthaltene β -Galactosidase (mit Ultraschallbehandlung; UP 200S, Dr. Hielscher) bestimmt.

Zur Untersuchung der verbliebenen Lebendkeimzahl wurden aus 0,1 ml jeder Probe Verdünnungsreihen von 1:1 bis 1:1000 angesetzt, auf Blut- und auf MRS-Agar-Platten (Merck Art. 1.10660) aufgetropft und bei 37 °C für 48 Stunden sowohl aerob als auch anaerob mit Anaerocult® (Merck Art. 13829) im Anaerobentopf (Merck Art. 16387) inkubiert.

3.4.Untersuchung der Laktoseverdauung und der β -Galactosidase-Aktivität bei gnotobiotischen Göttinger Miniaturschweinen

Nachdem in Vorversuchen alle Vorbedingungen hinsichtlich der Versuchsdiätenbehandlung und des Alters der Tiere geklärt wurden, konnte ein Fütterungsversuch mit unterschiedlich behandeltem Kefir (mit Marker Cr-EDTA versetzt) an gnotobiotischen Göttinger Minischweinen vorgenommen werden.

3.4.1. Versuchstiere

Der Versuch wurde mit 6 gnotobiotischen männlichen Göttinger Minischweinen (Versuchstierzüchter Ellegard, Dänemark) durchgeführt. Sie wurden im Alter von 10 Wochen geliefert und über keimfreie Schleusen in die Versuchsisolatoren (s. 3.4.2.) überführt. Die Isolatoren wurden über eine spezielle Lüftung mit steriler Luft versorgt, deren Temperatur 23° C und relative Luftfeuchtigkeit 65% betrug.

Die Tiere wurden 2 Wochen an eine semi-synthetische Diät und Wasser ad lib.(s. 3.4.3.) statt Milch und an Anbindehaltung (s. 3.4.2.) gewöhnt. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere 12 Wochen alt und wogen ca. 7-8 kg.

3.4.2. Haltung

Die 6 Minischweine wurden in 2 Versuchsisolatoren (Metall und Plastik, Radolfzell) zu je 3 Tieren in Einzelboxen und Anbindehaltung gehalten. Der Isolator aus Edelstahl ist ein von oben genannter Firma hergestelltes Standardmodell für die Haltung von SPF (spezifisch-pathogenfreien) Minischweinen, das für den Versuch modifiziert wurde:

1. In der Stahlwandung wurde ein Loch (\varnothing ca. 12 cm) mit einem Zylinderrohr (nach unten offen) angebracht, das in einen mit Chloramin-Flüssigkeit gefüllten Behälter, der unter dem Isolator angebracht war, eintauchte. Dies gab die Möglichkeit, Proben steril in den Isolator einzubringen und zu entnehmen.
2. Ausrüstung der Käfigboxen mit einer Geräteanordnung zur quantitativen Sammlung von Kot. Die Tiere standen auf einer speziellen Bodenplatte (Tenderfoot), die etwa 13 cm über dem Boxenboden auf Stahlstäben auflag. Die Stahlstäbe waren mit Spezialverankerungen (Metall und Plastik, Radolfzell) in der Lochstahl-Boxenwand befestigt. Unter der Tenderfoot-Bodenplatte befand sich im hinteren Viertel der Käfigbox eine Stahlwanne mit hohem Rückteil, die der Kotsammlung diente und zur Kotentnahme unter der Bodenplatte hervorgeholt werden konnte.
3. Möglichkeit zur Anbindehaltung: Die Schweine wurden durch ein Geschirr aus Klettband (verstellbar zur Größenanpassung der noch wachsenden Schweine), um Brust und Hüften mit Verbindung, und Stahlketten über Spezialverankerungen (Metall und Plastik, Radolfzell) mit Karabinerhaken an der Lochgitter-Boxenwand fixiert. Die Fixation mußte derart erfolgen, daß die Tiere sich nicht drehen konnten, aber genug Freiheit zum Stehen und Liegen hatten.

Die Isolatorhaut bestand aus 0,8 mm starker Polypropylenfolie und wurde von einem Stahlgerüst gehalten.

3.4.3. Diäten

Als Versuchsdiäten wurden verschieden behandelte Laktobazillenpellets mit Kefir und Kefir pur als fermentiertes Milchprodukt eingesetzt. Allen Versuchsdiäten wurde Cr-EDTA als Marker in definierter Menge zugesetzt, um die exakte Verdaulichkeit der Laktose bestimmen zu können.

Als Modellsubstrat wurde Kefir gewählt, da dieser im Gegensatz zu Joghurt keine freie Galaktose enthält. Damit sollte die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse mit Untersuchungen an konventionellen Mischschweinen gesichert werden.

Die Versuchsdiäten wurden morgens verabreicht, nachmittags bekamen die Schweine eine semi-synthetische Diät, die von Dr. U. Hennig vom Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere FB Ernährungsphysiologie "Oskar Kellner", Rostock, zur Verfügung gestellt wurde (Anhang Tab. 23) Jede Versuchsdiät wurde erst direkt vor der Verabreichung an die Schweine zubereitet. Dazu wurde im Isolator gelagertem sterilen Kefir ein gesondert hergestelltes bestrahltes/ bzw. unbestrahltes Laktobazillenpellet (mußte bis zur Gabe im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden) beigemischt.

Herstellung des Sterilkefirs:

Der Kefir (Müller, Aretsried), wurde zur Inaktivierung enthaltener β -Galactosidase und zur Abtötung produkteigener Milchsäurebakterien für 5 min auf 75°C Kerntemperatur gebracht, die Laktosemenge bestimmt (s. 3.2.4.), und durch Laktosezugabe eine Konzentration von 40 g Laktose/l eingestellt, abgefüllt und zur Sterilisation mit γ -Strahlen (25 kGy) (Gamma-Service, Produktbestrahlung GmbH, Radeberg) bestrahlt.

Herstellung der Laktobazillenpellets:

a) bestrahlte Pellets:

Die Laktobazillen wurden in 21 l MRS-Bouillon angezüchtet, zentrifugiert und in 400 ml Phosphat-Puffer (pH

7,0) aufgenommen. Die in den Keimen eingeschlossene β -Galactosidase-Aktivität wurde nach Ultraschallbehandlung mit o-NPG als Substrat bestimmt und die Portionierung der Proben so vorgenommen, daß jedes Tier täglich eine Enzymmenge von ca. 400 IU/l Kefir erhielt. Diese Suspension wurde mit einer Dosis von 20 kGy mit γ -Strahlen bestrahlt. Die Proben sollten nicht länger als eine Woche gelagert werden, der Ansatz mußte also 2 mal pro Versuchsphase erfolgen, da die Diäten den Tieren über 2 Wochen verabreicht wurden. Die Laktobazillen-Portionen wurden erst direkt vor der Fütterung über die Tauchtankvorrichtung (s.3.4.2) in den Isolator geschleust und in den Kefir gemischt.

b) unbestrahlte, native Pellets:

Es wurde genau wie unter a) beschrieben gearbeitet. Die täglich aufgenommene Enzymmenge sollte ebenfalls bei ca. 400 IU/l Kefir liegen.

Die Keimkonzentration lag bei ca. 10^8 Keime/ml Kefir. Proben sollten nicht länger als eine Woche gelagert werden, der Ansatz mußte also 2 mal erfolgen, da die Diät den Tieren über 2 Wochen verabreicht wurde. Die Laktobazillen-Portionen wurden erst direkt vor der Fütterung über den Tauchtank in den Isolator geschleust und in den Kefir gemischt.

Es wurden 3 verschiedene Diäten verfüttert:

1. Steriler Kefir ohne Laktobazillen und β -Galactosidase-Aktivität
2. Steriler Kefir nach Zusatz von bestrahlten (Gesamtdosis 20 kGy, γ -Strahlen) = abgetöteten Laktobazillen mit intakter Zellwand und aktiver β -Galactosidase, überwiegend in den Keimen eingeschlossen.
3. Steriler Kefir nach Zusatz von lebenden Laktobazillen mit intakter Zellwand und aktiver β -Galactosidase, überwiegend in den Keimen eingeschlossen.

Semi-synthetische Diät:

Zusätzlich zur Versuchsdiät erhielten die Schweine eine bilanzierte semi-synthetische Diät (täglich 200 g), um den Energie- und Nährstoffbedarf der Tiere zu decken. Die Diät wurde von Dr. Hennig aus dem Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere FB Ernährungsphysiologie "Oskar Kellner" zur Verfügung gestellt. Zusammensetzung der Diät (siehe Anhang Tab. 21). Wasser erhielten die Tiere ad libitum.

3.4.4. Fütterungsversuch

Jedes Schwein erhielt als Morgenmahlzeit 500 ml der Versuchsdiät, vermengt mit jeweils 10 ml Marker CrEDTA und am Abend 200 g semi-synthetische Diät. Die gleichen 6 Tiere erhielten nacheinander die 3 verschiedenen Versuchsdiäten in der Reihenfolge 1-3, wobei es wichtig war, daß die Diät mit den lebenden Laktobazillen erst am Ende des Versuchs, also als letzte Diät verabreicht wurde, da die Tiere danach nicht mehr keimfrei waren. Die Diäten wurden jeweils 2 Wochen lang verabreicht. Zwischen den einzelnen Versuchsdiäten lag jeweils eine Zwischenphase von 2 Tagen, in der die Schweine nur semi-synthetische Diät erhielten, dann 300 g/Tier und Tag.

3.4.5. Probennahme und -behandlung

Es erfolgte eine orofäkale Bilanzierung der β -Galactosidase-Aktivitäten und der Laktosemengen (oral aufgenommen / fäkal ausgeschieden) unter Berücksichtigung des Markers Cr-EDTA.

Die Kotproben der Schweine wurden immer möglichst frisch gesammelt, bei 4°C gelagert und als Tagessammelprobe bearbeitet. Die Tages-Kotproben wurden homogenisiert (Stomacher 80, Laboratory Blender und Ultra-Turrax) und anschließend folgende Parameter bestimmt:

- β -Galactosidase-Aktivität in IU/l (mit und ohne Ultraschallbehandlung (Ultraschallprozessor UP 200S, Dr. Hielscher)), mit o-NPG als Substrat (s.3.2.2.)
- Laktosemenge in g (nach Enteiweißung mit Carrez-Reagenz) (s. 3.2.4.)
- Markermenge (Cr-EDTA) (s. 3.2.7.)
- Keimzahl in KbE (im Versuchsabschnitt mit lebende Laktobazillen) (s. 3.2.6.)

3.4.6. Sterilkontrollen:

Zum Ausschluß von Kontaminationen wurden in 3-tägigem Rhythmus aus den Kotproben Sterilkontrollen angefertigt.

Ein Aliquot des Kotes wurde steril in Stamm- und Thioglycolat-Nähr- (Firma Immunpräparate Berlin) Medium überimpft und bei Raumtemperatur und 37 °C inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurde kontrolliert, ob ein Keimwachstum vorhanden war, angezeigt durch Trübung um das Kotinoculum. Es wurde eine Gram-Färbung eines Ausstrichs auf einem Objektträger angefertigt.

Zusammensetzung des Stamm Medium:

1,0 g Protease Pepton
9,0 g Pepton aus Fleischextrakt
3,0 g NaCl
2,0 g Na₂HPO₄
3,0 g Fleischextrakt
4,0 g Hefeextrakt
0,5 ml Tween 80
1,5 g Agar
2,5 ml Salzlösung B
ad 1000 ml demineralisiertes Wasser, 10 min bei 121° C sterilisieren
+ 0,250 g Cystin (in HCl lösen)
+ 0,250 g Cystein
pH wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt, nochmalige Sterilisation im Dampftopf bei 100° C.

3.5. Untersuchung der Laktoseverdauung und der β -Galactosidase-Aktivität bei gnotobiotischen Ratten

Mit der gleichen Versuchsanordnung wie bei den Göttinger Minischweinen (s. 3.4.) wurde ein Versuch mit Ratten durchgeführt. Aus dem Vergleich der Ergebnisse sollten Erkenntnisse zur Übertragbarkeit auf andere Spezies und den Menschen gewonnen werden.

3.5.1. Versuchstiere

Dieser Versuch wurde mit 6 gnotobiotischen weiblichen Wistarratten (WAG/Rij Zucht Rehbrücke) durchgeführt. Sie waren zu Versuchsbeginn 12 Wochen alt und wogen 210-220 g. Während des Versuchs nahmen sie durchschnittlich noch 30 g zu.

3.5.2. Haltung

Die Ratten wurden einzeln in Stoffwechsellkäfigen (Techniplast) in einem Plastikisolator (Metall und Plastik, Radolfzell) gehalten. Der Isolator wurde über eine spezielle Lüftung mit steriler Luft versorgt, deren Temperatur 23° C und relative Luftfeuchtigkeit 65% betrug.

Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn mit Haltungsfutter und Wasser ad lib. ernährt.

Der Isolator verfügte über einen mit gesättigter Chloraminlösung gefüllten Tauchtank, der unter dem Isolator angebracht ist, um Proben steril in den Isolator einzubringen und zu entnehmen, ohne die große Schleuse zu nutzen.

Die Isolatorhaut bestand aus 0,8 mm starker Polypropylenfolie und wurde von einem Aluminiumgerüst gehalten.

3.5.3. Diäten

Die Versuchsdiäten und ihre Herstellung erfolgten wie unter 3.4.3. beschrieben.

Es wurden 3 verschiedene Diäten verfüttert:

1. Steriler Kefir ohne Laktobazillen und β -Galactosidase-Aktivität
2. Steriler Kefir nach Zusatz von bestrahlten (Gesamtdosis 20 kGy, γ -Strahlen) = toten Laktobazillen mit intakter Zellwand und aktiver β -Galactosidase, überwiegend in den Keimen eingeschlossen.
3. Steriler Kefir nach Zusatz von lebenden Laktobazillen mit intakter Zellwand und aktiver β -Galactosidase, überwiegend in den Keimen eingeschlossen.

Haltungsfutter:

Zusätzlich zur Versuchsdiät erhielten die Ratten Haltungsfutter aus eigener Herstellung, um den Energie- und Nährstoffbedarf der Tiere zu decken (Zusammensetzung siehe Tab. 22 im Anhang). Wasser erhielten die Tiere ad lib.

3.5.4. Fütterungsversuch:

Die Ratten erhielten genau wie die Schweine die 3 verschiedenen Versuchsdiäten nacheinander, die Diät mit lebenden Laktobazillen zum Schluß. Um dem Freßverhalten der Ratten gerecht zu werden wurde die Versuchsdiät (allerdings nur Kefir steril) über den gesamten Tageszeitraum (24 h) angeboten, in einer Menge, die durchschnittlich in diesem Zeitraum verzehrt werden konnte. Dazu wurden immer pro Ratte 60 ml Kefir und 12 g Pellets gemischt. Nach 24 h erfolgte die Auswaage der eventuell verbliebenen Futtermenge, um die tatsächliche Freßmenge zu bestimmen. Die Keime (abgetötet oder lebend) mit der enthaltenen β -Galactosidase-Aktivität wurden den Ratten täglich (2x) per Sonde getrennt vom Kefir verabreicht, damit das Enzym tatsächlich erst im Magen auf die im Kefir enthaltene Laktose einwirken kann. Hätte man es direkt mit der Kefirmahlzeit verabreicht, würde es schon im Futternapf die Laktose im Kefir abbauen, da die Ratten im Gegensatz zu den Schweinen nicht sofort das gesamte Futter verzehren, sondern lediglich nur einen Bruchteil und der Rest im Napf verbleibt.

3.5.5. Probennahme und -behandlung:

Die Kotproben der Ratten wurden immer möglichst frisch gesammelt, bei 4°C gelagert und als Tagessammelprobe bearbeitet. Die Tages-Kotproben wurden homogenisiert (Ultra-Turrax).

In ihnen wurde bestimmt:

- β -Galactosidase-Aktivität in IU/l (mit und ohne Ultraschallbehandlung (Ultraschallprozessor UP 200S, Dr. Hielscher)), bestimmt mit o-NPG als Substrat (s.3.2.2.)
- Laktosemenge in g (nach Enteiweißung mit Carrez-Reagenz) (s. 3.2.4.)
- Keimzahl in KbE (im Versuchsabschnitt mit lebende Laktobazillen) (s. 3.2.6.)

3.5.6. Sterilkontrollen:

Die Sterilkontrollen wurden wie unter 3.4.6. beschrieben durchgeführt

3.6.Statistische Auswertung

Alle Angaben erfolgten, wenn nicht anders angegeben als Mittelwerte mit den Standardabweichungen der Mittelwerte. Es wurden die Laktoseausscheidung, die Laktoseverdaulichkeit und die β -Galactosidase-Ausscheidung (freie und intrazelluläre β -Galactosidase) bei den Göttinger Minischweinen und bei den Ratten nach Erhalt der drei unterschiedlichen Versuchsdiäten auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft. Da bei den genannten Merkmalen nicht von einer symmetrischen Verteilung ausgegangen werden konnte, sondern eher angenommen werden mußte, daß eine rechtsschiefe Verteilung vorlag, wurden die Daten logarithmiert. Um auch die negativen Beobachtungen mit einbeziehen zu können, wurde als Transformation $\log(10x+1)$ gewählt.

Alle statistischen Auswertungen beziehen sich auf die transformierten Werte. Bezüglich jeder der Zielvariablen wurde die Nullhypothese: "die drei Diäten führen im Mittel zu übereinstimmenden Ergebnissen" überprüft. Als Modell wurde zunächst eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Faktor 1: Diät, Faktor 2: Tier) herangezogen. Wenn keine Wechselwirkung nachgewiesen werden konnte, wurden im Fall von global vorhandenen Diätunterschieden Einzelvergleiche der drei möglichen Diätkombinationen durchgeführt mit Bonferroni-Korrektur.

Das Signifikanzniveau wurde generell auf $\alpha = 0.05$ festgelegt.

Diese Auswertung erfolgte mit SPSS am Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung der FU-Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin.

4. Ergebnisse

4.1. Wachstumskurve von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1

Für die Arbeit war es von höchster Bedeutung, die größtmögliche Ausbeute an Laktobazillen mit der enthaltenen β -Galactosidase zu erhalten. Aus der für *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 angefertigten exemplarischen Wachstumskurve eines Tages war abzulesen, daß der Punkt, an dem die Log-Phase des Keimwachstums in die stationäre Phase übergeht, also wo genauso viele Keime absterben wie entstehen, nach einer Inkubationsdauer von 14 Stunden erreicht war. Die Keime sollten also möglichst nach 14 Stunden geerntet und weiterverarbeitet werden, um eine optimale Masse an lebenden Keimen zu erhalten. Abb. 1 zeigt den Kurvenverlauf für das Wachstum von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1.

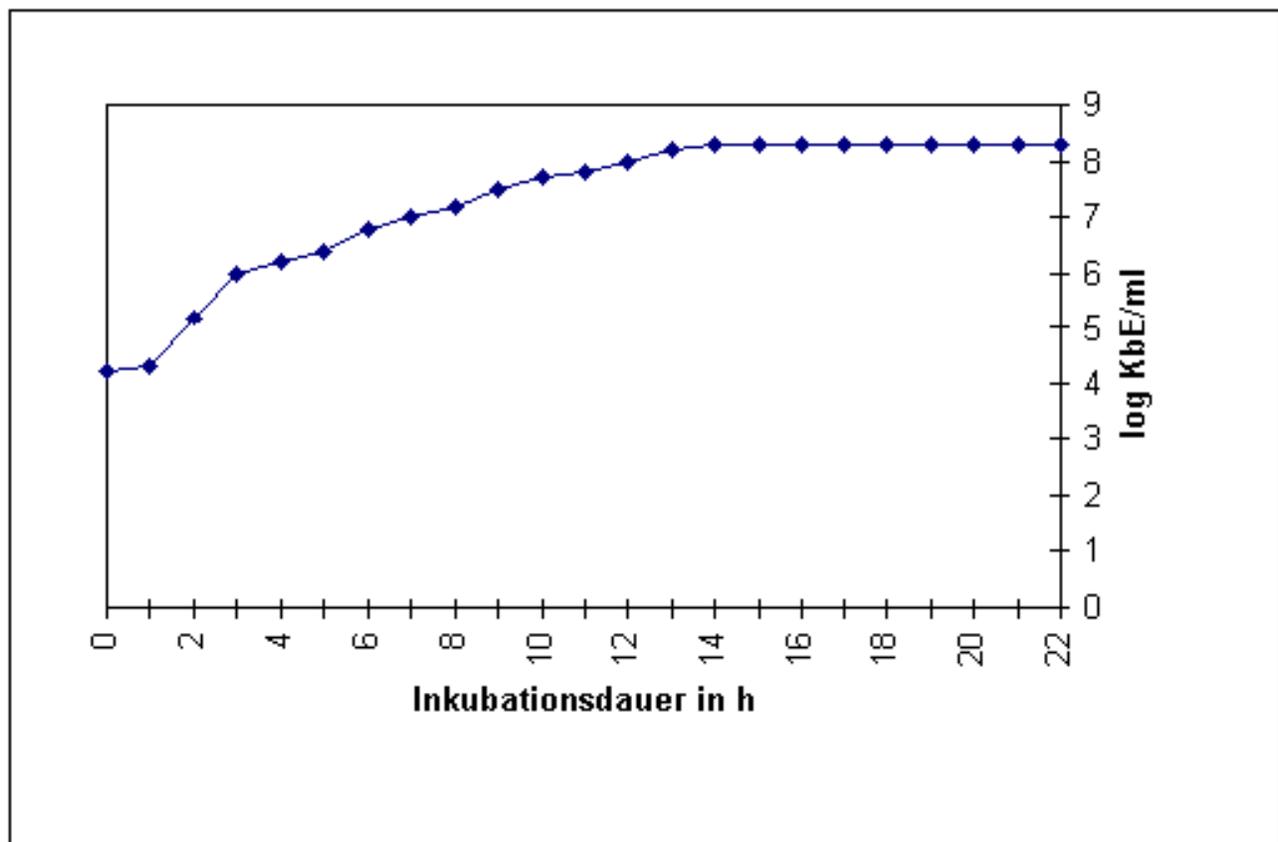


Abb. 1: Wachstumskurve für *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1, Anzucht in MRS-Bouillon bei 37° C, Angabe der Kolonie bildenden Einheiten in log (s. auch Tab. 3 im Anhang)

4.2. Prüfung des Laktobazillenstammes auf Reinheit

Die Prüfung des Stammes *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 im Hinblick auf sein Fermentationsspektrum bestätigte die Reinheit der einzusetzenden Ausgangskultur und des Lyophilisats. Bei insgesamt 9 Ansätzen, aus Anzuchten aus dem Laktobazillenlyophilisat (insgesamt 5 mal) und aus Kotproben (4 Kotproben) von gnotobiotischen Tieren nach Gabe des Laktobazillenstammes ergaben sich folgende Werte:

Glucose:	4-5	(positive/2 x bis stark positive/7 x Reaktion)
Fructose:	2-5	(intermediäre/2 x, positive/3 x bis stark positive/4 x Reaktion)
Mannose:	4	(positive/1 x Reaktion); <u>widersprechende Reaktion</u>
Lactose:	4-5	(positive/1 x bis stark positive/8 x Reaktion)
alle anderen:	0	(negative Reaktion)

Der Stamm war nur in der Lage Glukose, Fructose und Laktose zu metabolisieren (alle anderen Kohlehydrate nicht), d.h. es zeigten sich unter den möglichen 49 Reaktionen, die der Test bietet, keine (Identifikation laut Software 99,7 %) oder einmal eine (Identifikation laut Software 98,8 %) widersprechende Reaktion. Der Keim ließ sich so eindeutig als *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* identifizieren.

Nachdem diese Identifizierung mehrfach aus Anzuchten aus dem Laktobazillenlyophilisat (insgesamt 5 mal) und aus Kotproben (4 Kotproben) von gnotobiotischen Tieren nach Gabe des Laktobazillenstammes vorgenommen wurde und immer das selbe Ergebnis erbrachte, konnte als gesichert angenommen werden, daß es sich um einen reinen Stamm handelte.

4.3.β-Galactosidase-Aktivitäten in Proben nach in vitro Verdauung mit einem Pepsin/HCl-Gemisch

Die Messungen der β-Galactosidase-Aktivität (mit o-NPG als Substrat) wurden bei 4 verschiedenen Versuchsansätzen vorgenommen und ergaben:

- a. Bei pH 2 (entspricht dem Magenmilieu im leeren Zustand des Magens) nahm die Aktivität der freien β-Galactosidase (Probe ohne Behandlung mit Ultraschall gemessen) in den bestrahlten Kefir- und Pufferproben nach 5 min Inkubation erst zu, um dann drastisch abzufallen, wie Abb. 2 zeigt. Dieser Effekt war bei der Pufferprobe (13,2 IU/l nach 120 min Inkubation) noch stärker ausgeprägt als bei der Kefirprobe (137,6 IU/l nach 120 min Inkubation). Die Enzymaktivität in den unbestrahlten Proben nahm weitaus weniger ab. Dort fanden sich nach 120 min noch 305,6 IU/l (Kefir) und 340,6 IU/l (Puffer).
- b. Bei pH 4 (entspricht Magenmilieu im gefüllten Zustand) verringert sich die frei vorliegende β-Galactosidase (ohne Behandlung mit Ultraschall) in allen Proben nur wenig (bestrahlte Kefirprobe auf 302 IU/l; bestrahlte Pufferprobe auf 315,8 IU/l und unbestrahlte Pufferprobe auf 369 IU/l) nach 120 min, im Fall der unbestrahlten Kefirprobe steigt sie sogar an auf 448,4 IU/l (Abb. 3).
- c. Bei pH 2 und Messung der gesamten β-Galactosidase (nach Behandlung mit Ultraschall) sieht das Ergebnis ähnlich aus wie in a), also starker Abfall der Aktivitäten in den bestrahlten Proben (66,5 IU/l in der Kefirprobe; 124,2 in der Pufferprobe) und kaum Abfall in den unbestrahlten Proben (718,7 IU/l in der Pufferprobe). Hier stieg die Enzymaktivität in der unbestrahlten Kefirprobe sogar auf einen Wert (982,7 IU/l) über die Anfangsaktivität von 747,9 IU/l hinaus (Abb. 4).

- d. Bei pH 4 und Messung der gesamten β -Galactosidase (nach Behandlung mit Ultraschall) war bei den bestrahlten Proben allgemein ein Abfall über den gesamten Meßzeitraum zu verzeichnen. Nach 120 min Inkubation bei 37° C waren in der bestrahlten Kefirprobe noch 519 IU/l, in der Pufferprobe 543 IU/l zu messen. In beiden unbestrahlten Proben (in beiden 1040 IU/l) fand sich nach 120 min sogar ein Anstieg der Aktivität über die Aktivität von 750 IU/l am Beginn der Inkubation (Abb. 5).

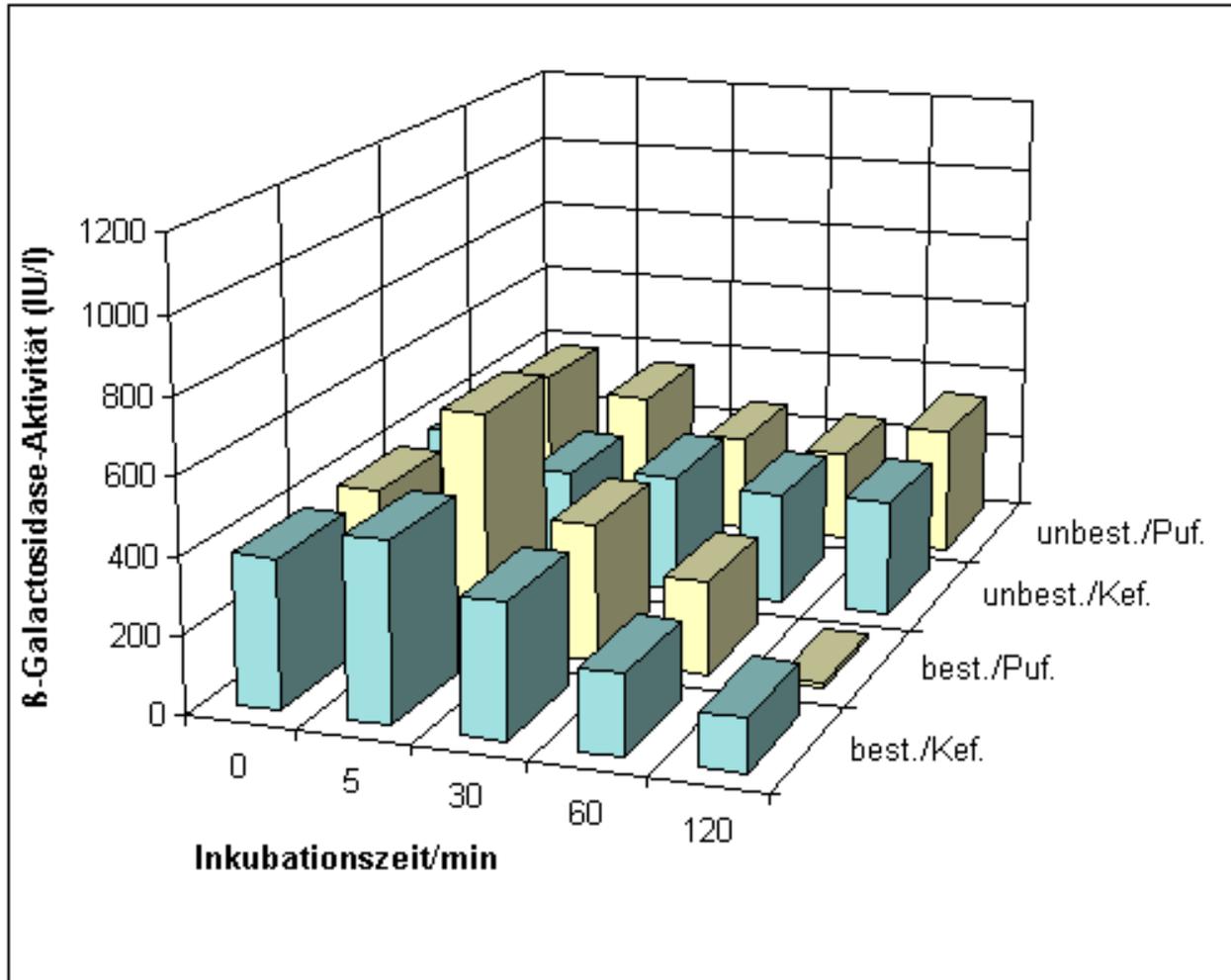


Abb. 2: Aktivitäten der freien β -Galactosidase in 4 verschiedenen Proben mit Laktobazillen nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch bei pH 2 (bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 4 im Anhang).

unbest./Puf. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Puffer
unbest./Kef. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Kefir
best./Puf. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Puffer
best./Kef. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Kefir

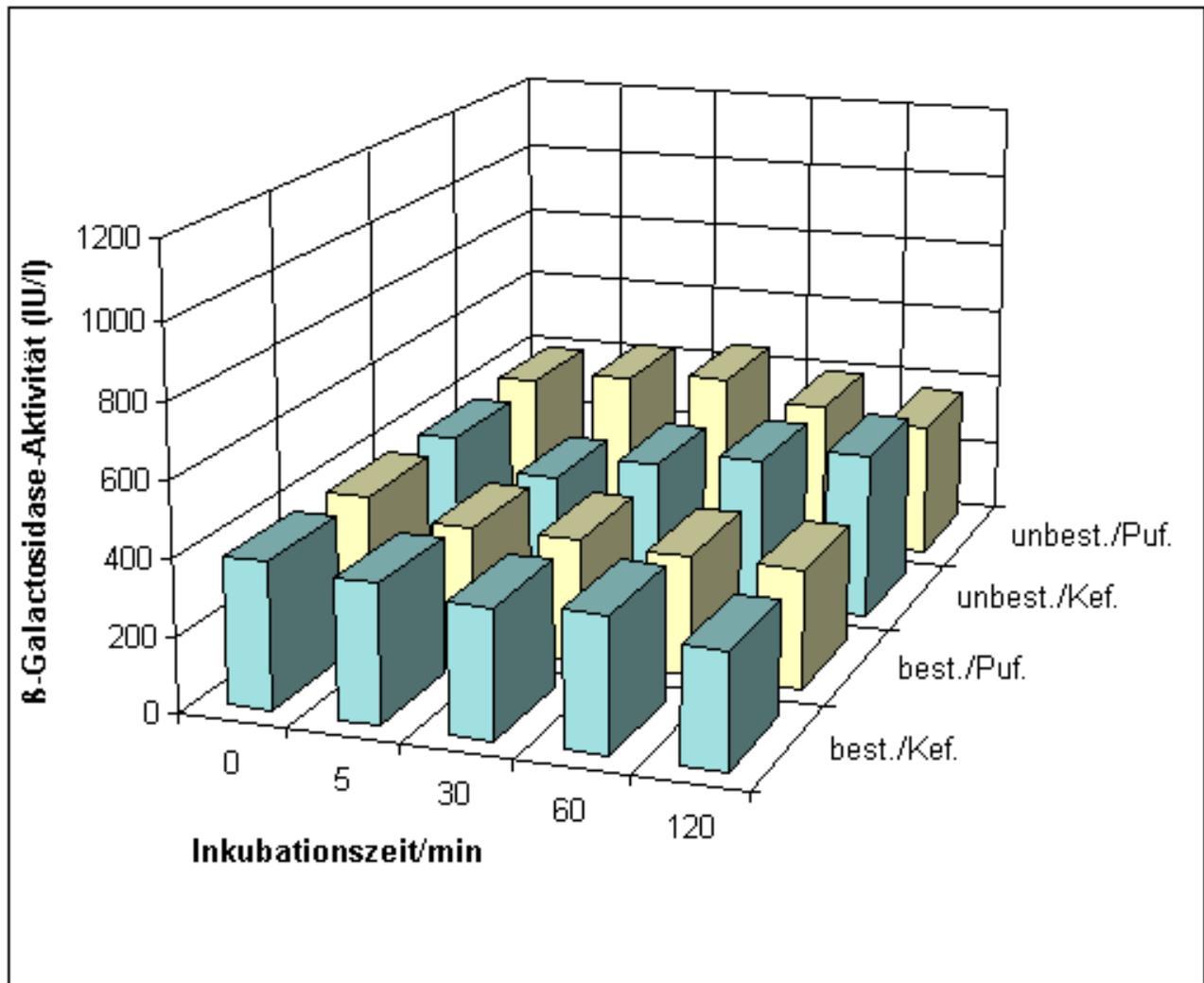


Abb. 3: Aktivitäten der freien β -Galactosidase in 4 verschiedenen Proben mit Laktobazillen nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch bei pH 4 (bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 5 im Anhang).

unbest./Puf. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Puffer
unbest./Kef. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Kefir
best./Puf. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Puffer
best./Kef. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Kefir

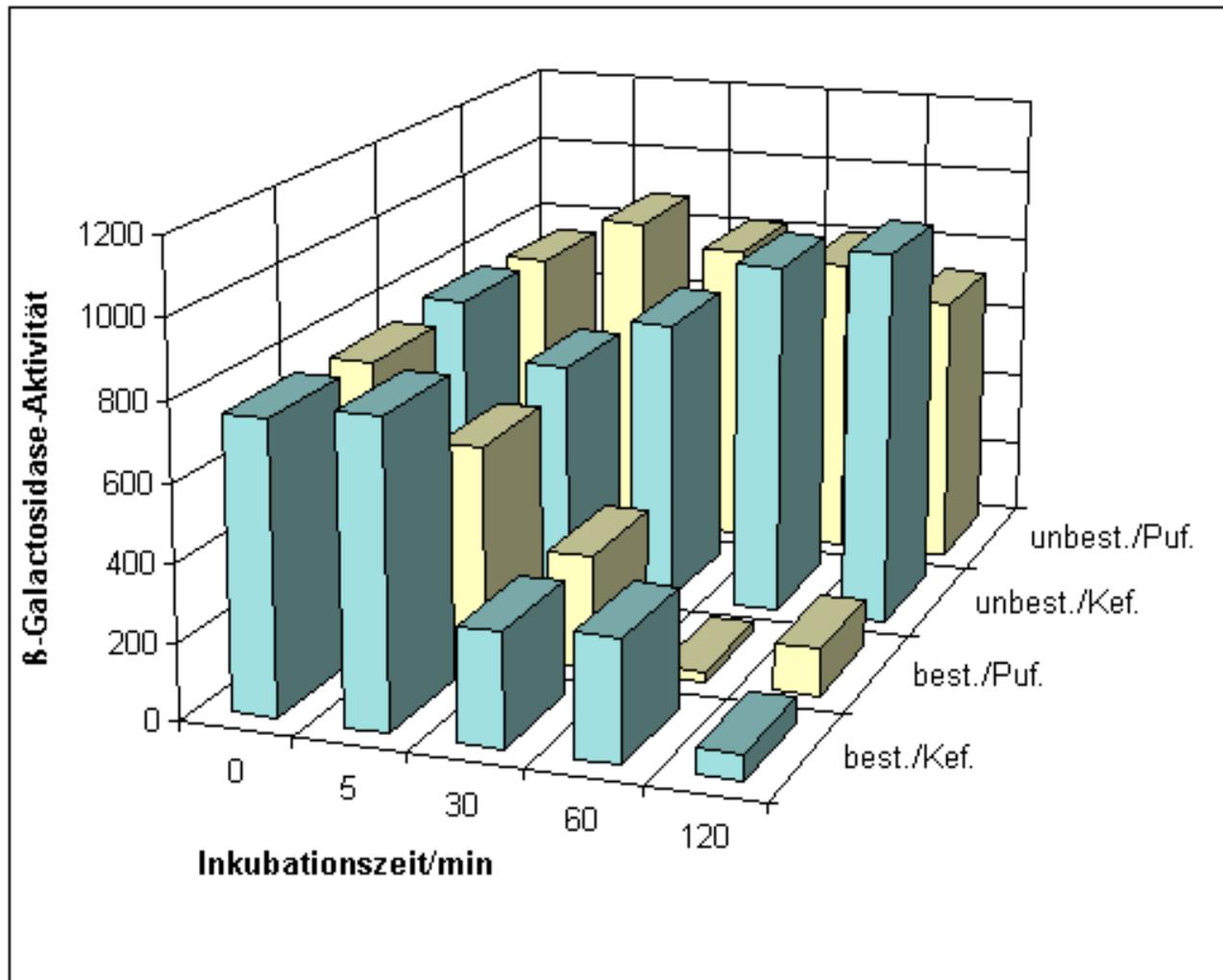
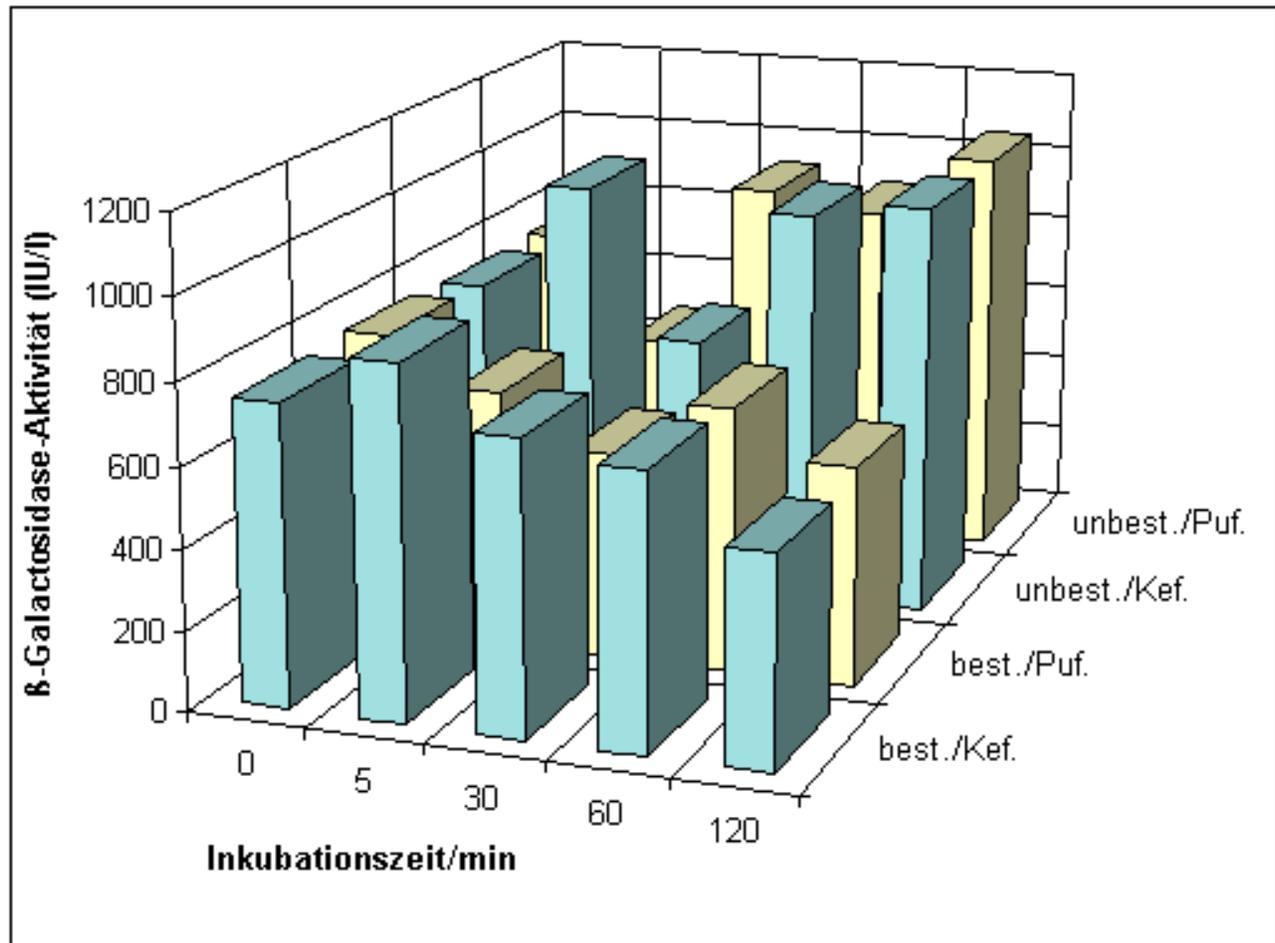


Abb. 4: Aktivitäten der Gesamt- β -Galactosidase in 4 verschiedenen Proben nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch bei pH 2 (bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 6 im Anhang).
 unbest./Puf. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Puffer
 unbest./Kef. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Kefir
 best./Puf. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Puffer
 best./Kef. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Kefir



**Abb. 5: Aktivitäten der Gesamt- β -Galactosidase in 4 verschiedenen Proben nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch bei pH 4 (bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 7 im Anhang).
 unbest./Puf. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Puffer
 unbest./Kef. = unbestrahltes Laktobazillenpellet resuspendiert in Kefir
 best./Puf. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Puffer
 best./Kef. = mit 20 kGy bestrahltes Laktobazillenpellet resusp. in Kefir**

Insgesamt konnte festgestellt werden, daß sich in den bei pH 2 inkubierten Proben die β -Galactosidase-Aktivität in den bestrahlten Proben sehr stark verringerte, wohingegen in den unbestrahlten Proben wenig bis gar kein Aktivitätsverlust zu finden war. Bei den bei pH 4 behandelten Proben gab es bei der freien β -Galactosidase kaum Unterschiede zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Proben, die Aktivität blieb ähnlich hoch, allerdings mußte bei Betrachtung der Gesamt- β -Galactosidase nach 120 min Inkubation ein mehr als doppelt so hoher Aktivitätsverlust der bestrahlten gegenüber der unbestrahlten Proben festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigten, daß in einem gefüllten Magen (pH 4) wie es nach der Gabe der Versuchsdiät im späteren Tierversuch der Fall wäre, die in der Diät enthaltene β -Galactosidase in für den Versuch relevanter Menge die Magenpassage überstehen würde.

4.4. Mukosale β -Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei Göttinger Minischweinen (nicht

gnotobiotisch, sondern konventionell gehalten)

Die in Abb. 6 gezeigten Verlaufskurven der mukosalen β -Galactosidase-Aktivitäten in 6 Dünndarmabschnitten (gemessen bei pH 5,5) bei 6 Göttinger Minischweinen stellten sich für jedes Tier individuell ganz unterschiedlich dar. Allgemein konnte aber festgestellt werden, daß die Aktivitäten in den vorderen Dünndarmabschnitten bis 50 % ab Magenausgang bei fast allen Tieren am höchsten lagen, um dann -außer bei Schwein 6- zum Ende hin mehr oder weniger stark abzufallen. Schwein 6 zeigte im letzten Dünndarmabschnitt die höchste β -Galactosidase-Aktivität in der Mukosa. Die höchste Aktivität der mukosalen β -Galactosidase überhaupt, fand sich bei Schwein 4 mit 14,24 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht) bei 30 % Dünndarmabschnitt, gefolgt von Schwein 2 mit 13,51 IU/g bei 30 % und 13,38 IU/g bei 50 % und von Schwein 3 mit 13,28 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht) bei 30 % Dünndarmabschnitt ab Magenausgang.

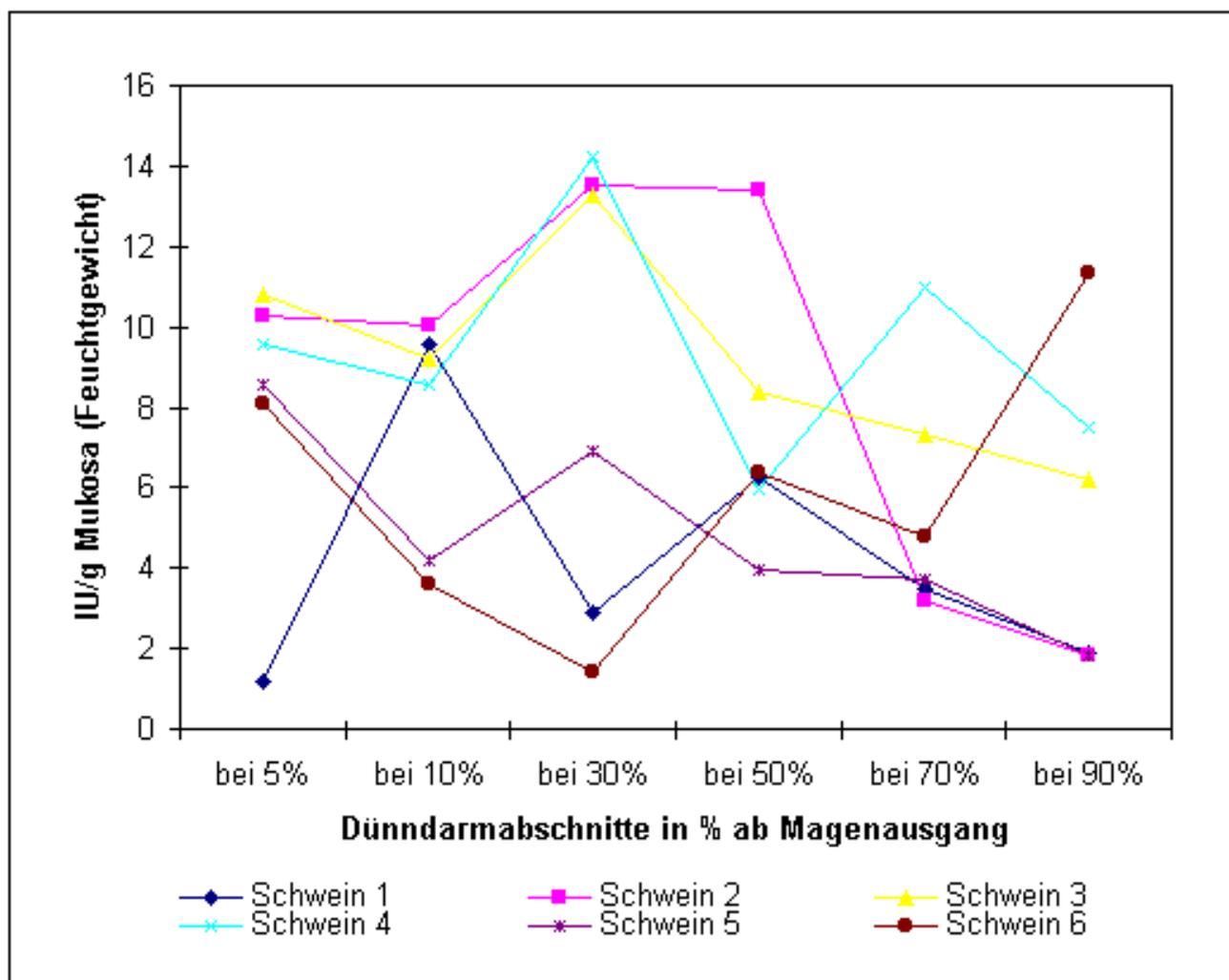


Abb. 6: β -Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei 12 Wochen alten Göttinger Minischweinen (6 Tiere), Bestimmung an 6 verschiedenen Dünndarmabschnitten (bestimmt mit Laktose als Substrat; bei pH 5,5) (s. auch Tab. 8 im Anhang).

Die niedrigsten β -Galactosidase-Aktivitäten in der Mukosa zeigten Schwein 1 mit 1,21 IU/g bei 5 %, Schwein 6 mit 1,44 IU/g bei 30 % und die Schweine 1, 2, und 5 mit 1,81-1,88 IU/g Feuchtgewicht bei 90 % Dünndarmabschnitte ab Magenausgang. Das Mittel aller β -Galactosidase-Aktivitäten der Mukosa aller Tiere in allen Dünndarmabschnitten lag bei etwa 7 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht). Die Daten ergaben, daß diese in der Mukosa nur noch geringfügig vorhandene β -Galactosidase einen Versuchsbeginn im Alter von 12 Wochen zulassen würde, denn sie kommt der bei erwachsenen Schweinen gefundenen durchschnittlich β -Galactosidase-Aktivität von ca. 5 IU/g Mukosafeuchtmasse sehr nahe. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die mukosale β -Galactosidase-Aktivität der Göttinger Minischweine die Versuchsergebnisse kaum beeinflussen würde.

4.5. Mukosale β -Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei der Ratte

Auch die Verlaufskurven der mukosalen β -Galactosidase-Aktivitäten bei 6 Ratten an 3 verschiedenen Abschnitten entlang des Dünndarms (gemessen mit Laktose als Substrat bei pH 5,5) ergaben wie in Abb. 7 zu sehen ist individuelle Unterschiede.

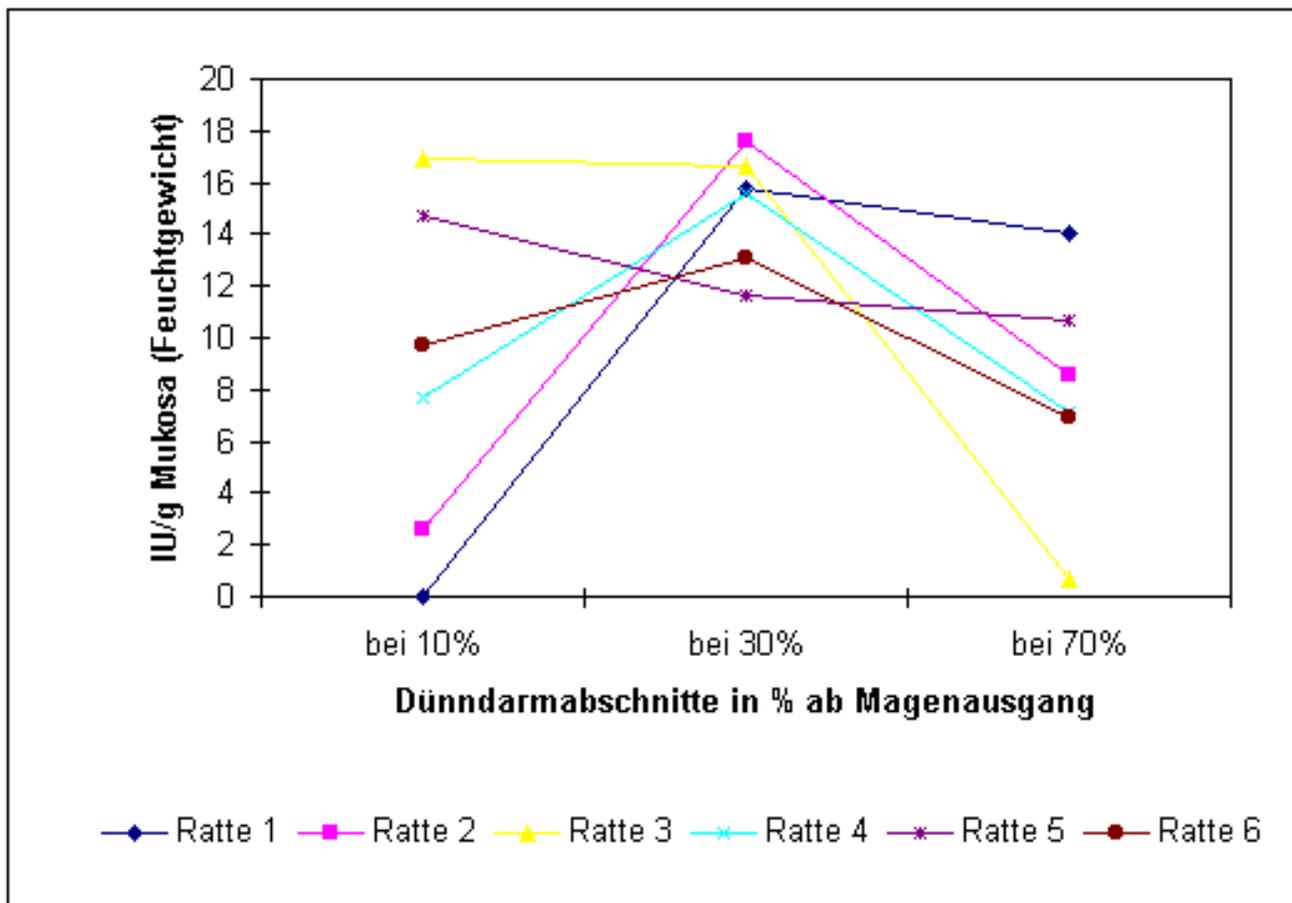


Abb. 7: β -Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei 12 Wochen alten Ratten (6 Tiere), Bestimmung an 3 Dünndarmabschnitten (bestimmt mit Laktose als Substrat; bei pH 5,5) (s. auch Tab. 9 im Anhang).

So zeigten die Ratten 1, 2, 4 und 6 die höchste Enzymaktivität in der Mukosa bei 30 % Dünndarmabschnitt ab Magenausgang, wobei bei den Ratten 1 und 2 die niedrigste Aktivität am Anfang des Dünndarms (bei 10 %) und bei den Ratten 4 und 6 die niedrigste Aktivität dagegen am Ende des Dünndarms (bei 70 %) gefunden wurde. Bei den Ratten 3 und 5 zeigte sich die höchste Aktivität der mukosalen β -Galactosidase am Anfang des Dünndarmes (bei 10 %), um dann bei beiden Tieren unterschiedlich stark zum Dünndarmende hin abzufallen. Allgemein die höchsten mukosalen β -Galactosidase-Aktivitäten der Ratten lagen bei etwa 17 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht); nämlich bei Ratte 2 mit 17,63 IU/g bei 30 % Dünndarmabschnitt und bei Ratte 3 mit 16,95 IU/g und 16,66 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht) bei 10 % bzw. 30 % Dünndarmabschnitt. Die niedrigsten mukosalen β -Galactosidase-Aktivitäten fand man bei Ratte 1 mit 0 IU/g bei 10 % Dünndarmabschnitt, bei Ratte 3 mit 0,65 IU/g bei 70 % Dünndarmabschnitt und bei Ratte 2 mit 2,58 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht) bei 10 % Dünndarmabschnitt ab Magenausgang. Die meisten Werte lagen in dem Bereich zwischen 8 und 15 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht). Das Mittel aller mukosalen β -Galactosidase-Aktivitäten aller Ratten in allen Dünndarmabschnitten lag bei etwa 10 IU/g Mukosa (Feuchtgewicht). Damit war die mittlere mukosale β -Galactosidase-Aktivität der Ratten höher als die der Schweine, jedoch lag sie generell bei beiden Tierarten so niedrig, daß eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch das mukosale Enzym im folgenden Hauptversuch vernachlässigt werden konnte. Beide Tiermodelle eigneten sich zur Durchführung des Versuchs.

4.6. β -Galactosidase-Aktivität und Keimstatus verschiedener Proben nach Behandlung mit ionisierender Strahlung (γ -Strahlen)

Nach der Behandlung mit γ -Strahlen zeigten die Proben sowohl auf Position 3 als auch 7 ohne vorherige Ultraschallbehandlung mit zunehmender Bestrahlungsdosis eine zunehmende β -Galactosidase-Aktivität. Es wurden hier ausschließlich die frei in der Probe vorliegenden Anteile des Enzyms gemessen. Die unbestrahlte Probe (Bestrahlungsintensität mit 0 in der Grafik angegeben) enthält zu allen Meßzeitpunkten kaum frei vorliegendes Enzym. Die auf Position 3 (s. Abb. 8) bestrahlten Proben enthielten bei hoher Bestrahlungsdosis (25 kGy) weniger freies Enzym, als die auf Position 7 (s. Abb. 9) bestrahlten. Der Anstieg des frei, außerhalb der Zellen vorliegenden Enzyms ist nach Bestrahlung auf Position 3 insgesamt geringer als nach Bestrahlung auf Position 7, auch nach einer Strahlendosis von 20 kGy liegt noch relativ wenig Enzym extrazellulär vor. Die Enzymmenge in den Proben ist nach Bestrahlung auf Position 3 relativ gleichbleibend zu den verschiedenen Meßzeitpunkten, die 3. Messung am 03.08.94 fiel mit etwas höheren Werten heraus, doch insgesamt waren die Unterschiede der einzelnen Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten nur gering. Nicht so bei Bestrahlung auf Position 7, dort laufen die Kurven weiter auseinander. Eindeutig ist hier eine Enzymabnahme fortlaufend von der ersten bis zur vierten Bestimmung nach 5 Wochen zu beobachten, wo nur noch etwa die Hälfte der maximal gemessenen Enzymaktivität (2. Messung, eine Woche nach Versuchsstart) vorzufinden war.

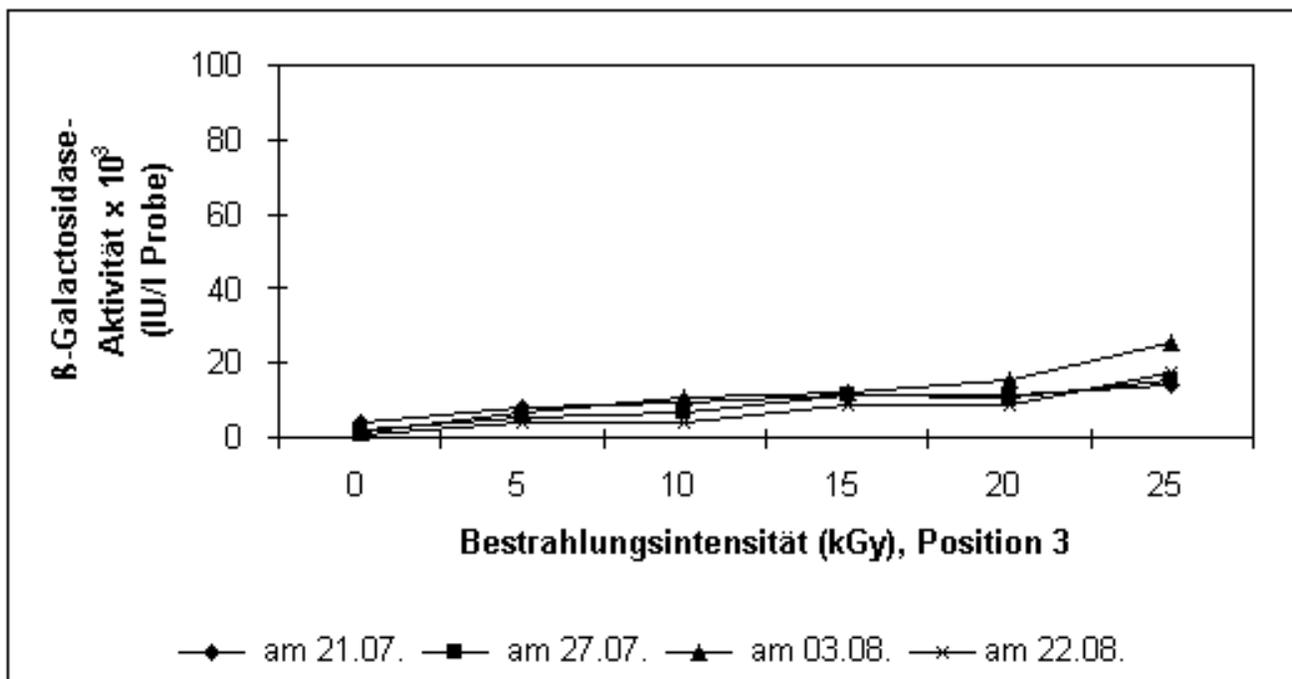


Abb. 8: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen (Bestrahlungsintensität- und position) auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets; Bestimmung an 4 Tagen im Zeitraum eines Monats (Bestrahlungsposition 3; ohne Ultraschallbehandlung; bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 10 im Anhang)

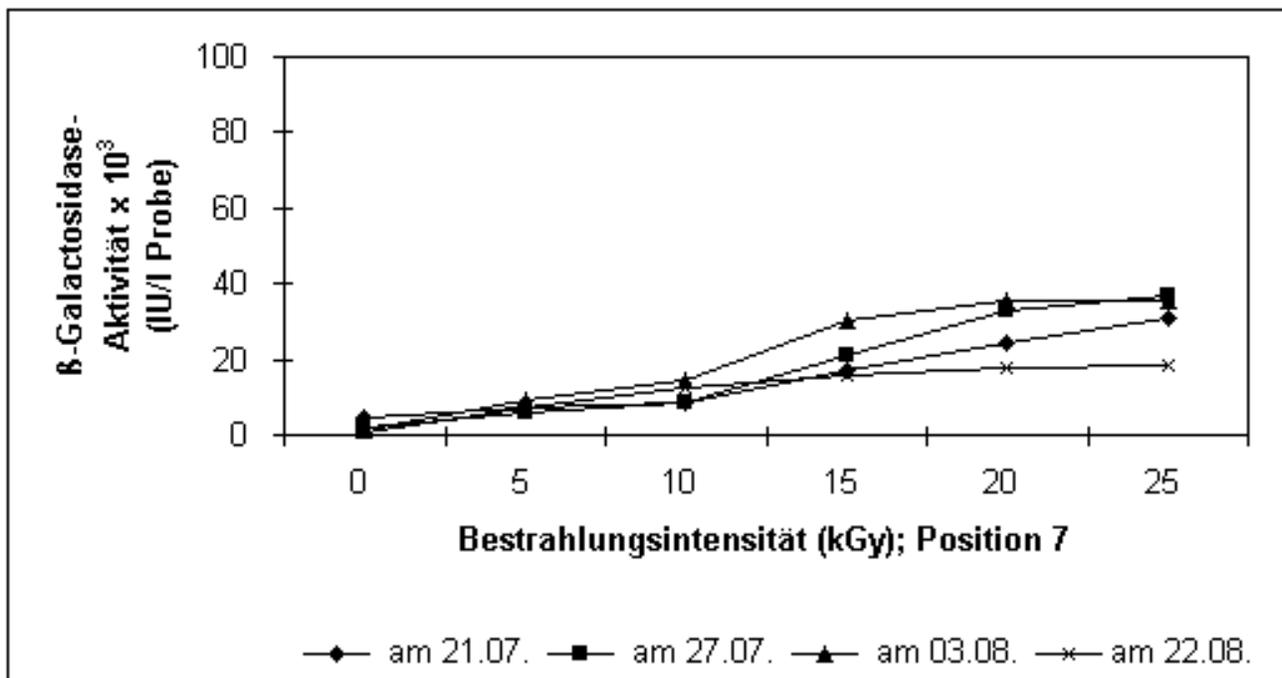


Abb. 9: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen (Bestrahlungsintensität- und position) auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets; Bestimmung an 4 Tagen im Zeitraum eines Monats (Bestrahlungsposition 7; ohne Ultraschallbehandlung; bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 11 im Anhang)

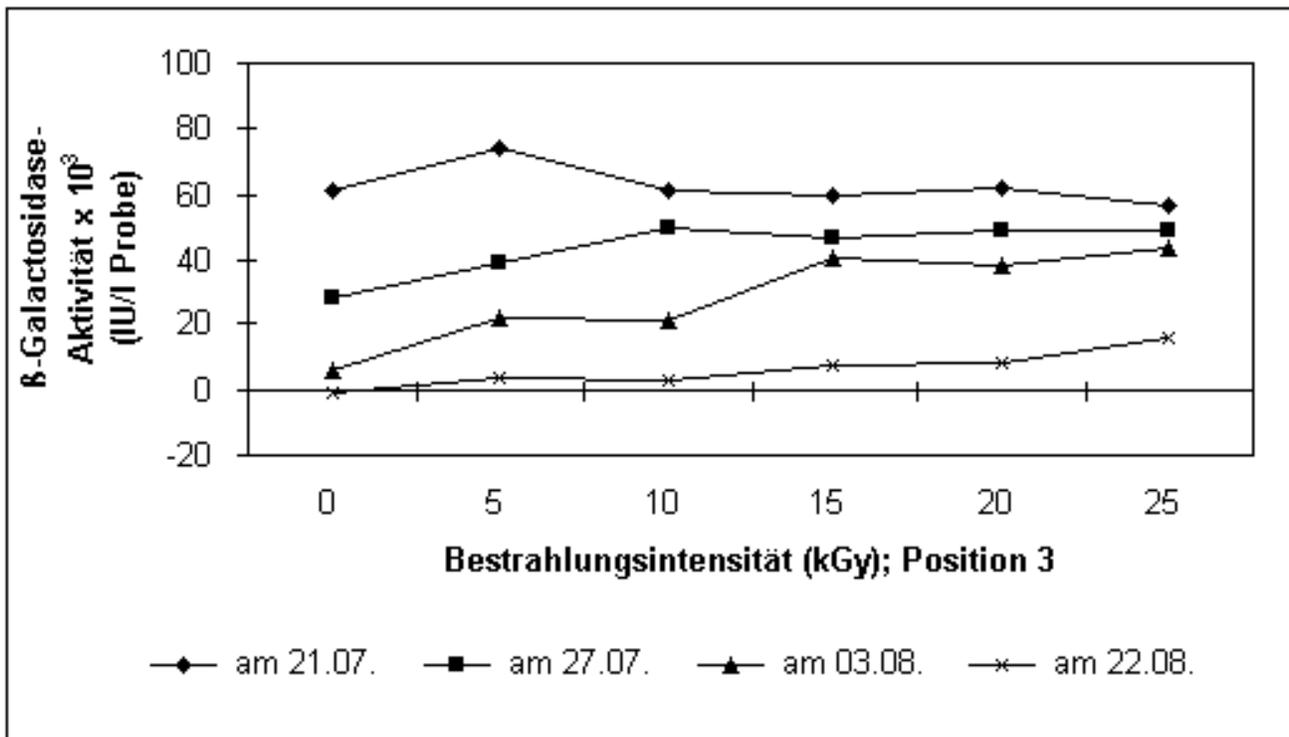


Abb. 10: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen (Bestrahlungsintensität- und position) auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets; Bestimmung an 4 Tagen im Zeitraum eines Monats (Bestrahlungsposition 3; mit Ultraschallbehandlung; bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 12 im Anhang)

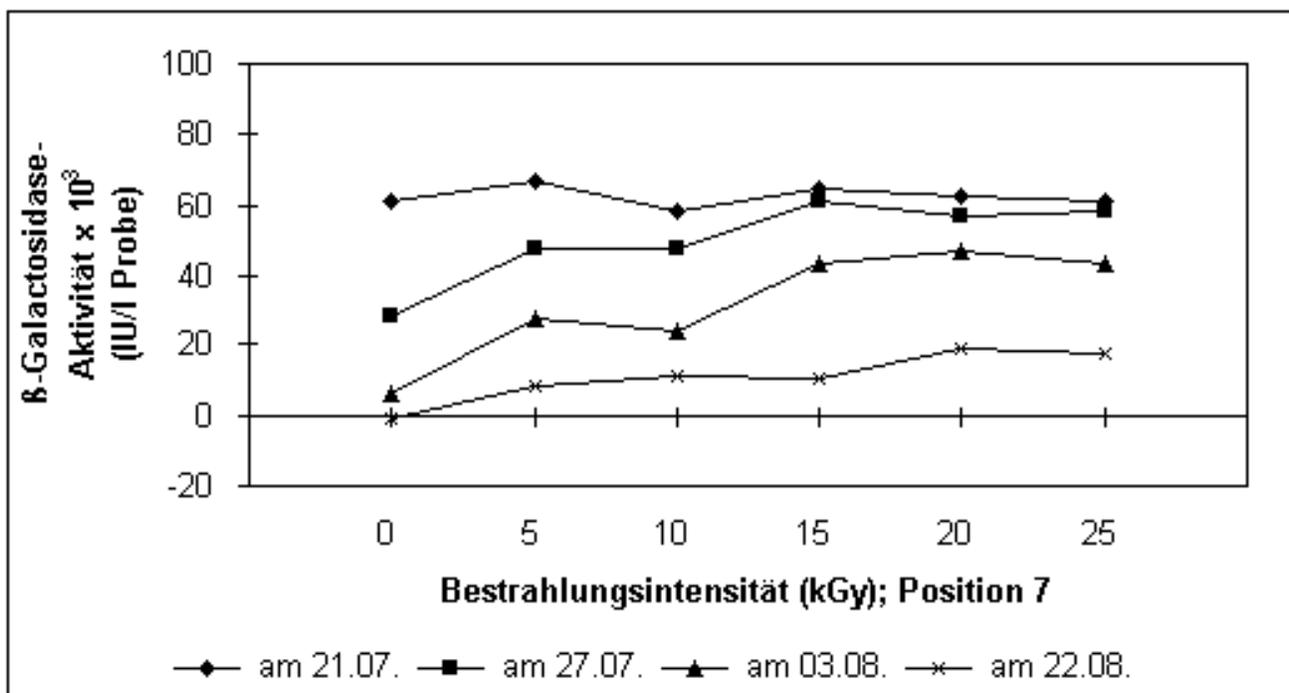


Abb. 11: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen (Bestrahlungsintensität- und position) auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets; Bestimmung an 4 Tagen im Zeitraum eines Monats (Bestrahlungsposition 7; mit Ultraschallbehandlung; bestimmt mit o-NPG als Substrat) (s. auch Tab. 13 im Anhang)

Bei der Messung der β -Galactosidase-Aktivität nach Ultraschallbehandlung (Abb. 10 und 11) zeigte sich, daß in der Höhe der Gesamt-Enzymaktivität zwischen beiden Bestrahlungspositionen kein Unterschied bestand und daß die β -Galactosidase-Aktivität während der einzelnen Bestimmungszeitpunkte relativ konstant blieb (eine Aktivitätszunahme war nur bei 10 bis 15 kGy zu verzeichnen), egal ob auf den beiden Positionen (3 und 7) mit 5 oder 25 kGy bestrahlt worden war. Bei allen Proben, auch bei der unbestrahlten Probe (Bestrahlungsintensität mit 0 in der Grafik angegeben), war allerdings festzustellen, daß die β -Galactosidase-Aktivität mit zunehmender Lagerdauer immer stärker abnahm. Nach 2 Wochen lag nur noch etwa die Hälfte bis zwei Drittel der ursprünglich vorhandenen Aktivitäten vor, sowohl bei Position-3-Proben als auch bei Position-7-Proben. Nach fünf Wochen war durchschnittlich nur noch etwa ein Sechstel der ursprünglichen Enzymaktivität vorhanden. Die Abtötung der Laktobazillen wurde bei allen bestrahlten Proben erreicht, auf keiner der von jeder Probe angelegten MRS- oder Blutagar-Platten konnte Bakterienwachstum festgestellt werden, weder nach aerober noch anaerober Inkubation.

4.7. Fütterungsversuch mit unterschiedlich aufbereitetem Kefir, durchgeführt beim gnotobiotischen Göttinger Minischwein

4.7.1. Überprüfung des gnotobiotischen Status der Göttinger Minischweine (Sterilkontrolle)

Eine Woche vor Versuchsbeginn zeigte sich in der Sterilkontrolle des Kotes bei einem Schwein (Schwein 2) ein Keimwachstum. Der Keim konnte bei den anderen Tieren nicht nachgewiesen werden. Der Keim wurde auf β -Galactosidase-Aktivität hin untersucht, mit negativem Ergebnis, d.h. er produzierte keine β -Galactosidase. In den Sterilkontrollen direkt vor Versuchsbeginn konnte kein Keim mehr nachgewiesen werden, aus der Betrachtung von Kotasstrichen vor Beginn der Diätgabe wurde das Fehlen von Keimen bestätigt (s. Abb. 16). In den Kontrollen, die bei 37° C inkubiert wurden, wurde genauso wenig ein Wachstum festgestellt, wie in den Kontrollen, die bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Beurteilung der Kontrollen im letzten Versuchsabschnitt (nach Gabe der viablen Laktobazillen) zeigten eine Reinkultur der verabreichten Laktobazillen. Ein zusätzlicher Ausstrich auf festen Nährböden und die Bestimmung der gewachsenen Keim mit Hilfe des api-Systems (s. 3.1.4.) bestätigten diesen Befund.

Nach diesen Feststellungen wurde als gesichert angesehen, daß die Göttinger Minischweine bis zum Versuchsende gnotobiotischen Status hatten und nicht mit Umweltkeimen kontaminiert waren.

4.7.2. Die Kotbeschaffenheit während der einzelnen Versuchsdiäten

Die in der Diät enthaltene Laktose beeinflusst wegen ihrer osmotischen Wirksamkeit je nach vorhandener Menge die Kotbeschaffenheit. Während der Gabe des sterilen Kefirs ohne Laktobazillen war der Kot aller Schweine dünnbreiig. Er wurde fester nach Gabe des Sterilkefirs mit inaktivierten (bestrahlten) Laktobazillen, genauso wie nach der Verabreichung des Kefirs mit den lebenden Laktobazillen.

4.7.3. Einfluß der Diäten auf die Laktoseausscheidung und die wahre, marker-korrigierte Verdaulichkeit der Laktose bei Göttinger Minischweinen

Die Laktoseausscheidungen von 6 Minischweinen über 14 Tage wurden während jeder der drei Versuchsdiäten im quantitativ über 24 Stunden gesammelten und dann homogenisierten Kot ermittelt. Da, wie unter 3.6. bereits beschrieben, beim statistischen Vergleich der Laktoseausscheidungen unter den drei Diäten nicht von einer symmetrischen Verteilung der Werte ausgegangen werden konnte, wurde mit den logarithmierten und zusätzlich transformierten ($x+1$; um auch negative Beobachtungen einbeziehen zu können) Daten weiter gearbeitet. Die nicht logarithmierten und transformierten Daten sind jeweils in den Klammern angegeben und in den Grafiken im Anhang wiederzufinden:

Während der Verabreichung der ersten Versuchsdiät (Sterilkefir ohne Laktobazillen) über 14 Tage lag die von den 6 Schweinen durchschnittlich täglich ausgeschiedene Laktosemenge (s. Abb. 12) bei $0,8 \pm 0,4$ ($7,4 \pm 1,2$; s. Abb. A 1) g/Tag, mit einer wahren Verdaulichkeit der Laktose (marker-korrigiert; s. Abb. 13) von $1,8 \pm 0,1$ (61 ± 25 ; s. Abb. A 2) %. Als die Tiere in der nächsten Versuchsphase zusätzlich mit dem Kefir bestrahlte Laktobazillen erhielten, fiel die täglich ausgeschiedene Laktosemenge auf $0,4 \pm 0,3$ ($2,1 \pm 1,9$) g ab, entsprechend dem Anstieg der wahren Verdaulichkeit der Laktose (marker-korrigiert) auf $1,98 \pm 0,03$ (95 ± 29) %. In der letzten Versuchsphase mit Diät 3 (Kefir + lebender Keim) sank sie auf nur $0,24 \pm 0,3$ ($1,3 \pm 1,1$) g/Tag, die wahre, marker-korrigierte Laktoseverdaulichkeit dagegen lag wie in der vorherigen Versuchsphase bei nur $1,98 \pm 0,07$ (95 ± 35) %.

Die statistische Auswertung der Ergebnissen ergab, daß es keine Wechselwirkungen zwischen den Tieren und den Diäten gab und daß ein Unterschied zwischen den drei Diäten bestand. Die Laktoseausscheidungen während der drei Diäten zeigten zueinander statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Die Laktoseausscheidungen der Minischweine waren nach Aufnahme von Kefir ohne Keim (Diät 1) statistisch signifikant höher als nach Aufnahme von Kefir mit inaktivierten (Diät 2) oder lebenden (Diät 3) Laktobazillen. Die Laktoseausscheidungen, die während der Aufnahme von Kefir mit inaktivierten Keimen (Diät 2) bei den Schweinen gemessen werden konnten, lagen auch statistisch signifikant höher als nach Verzehr von Kefir mit lebenden Keimen (Diät 3), jedoch zeigte sich hier, daß der Unterschied der durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedenen Laktosemenge zwischen diesen beiden Diäten etwas kleiner war als zwischen Diät 1 und 2, bzw. Diät 1 und 3 (s. Abb. A 1).

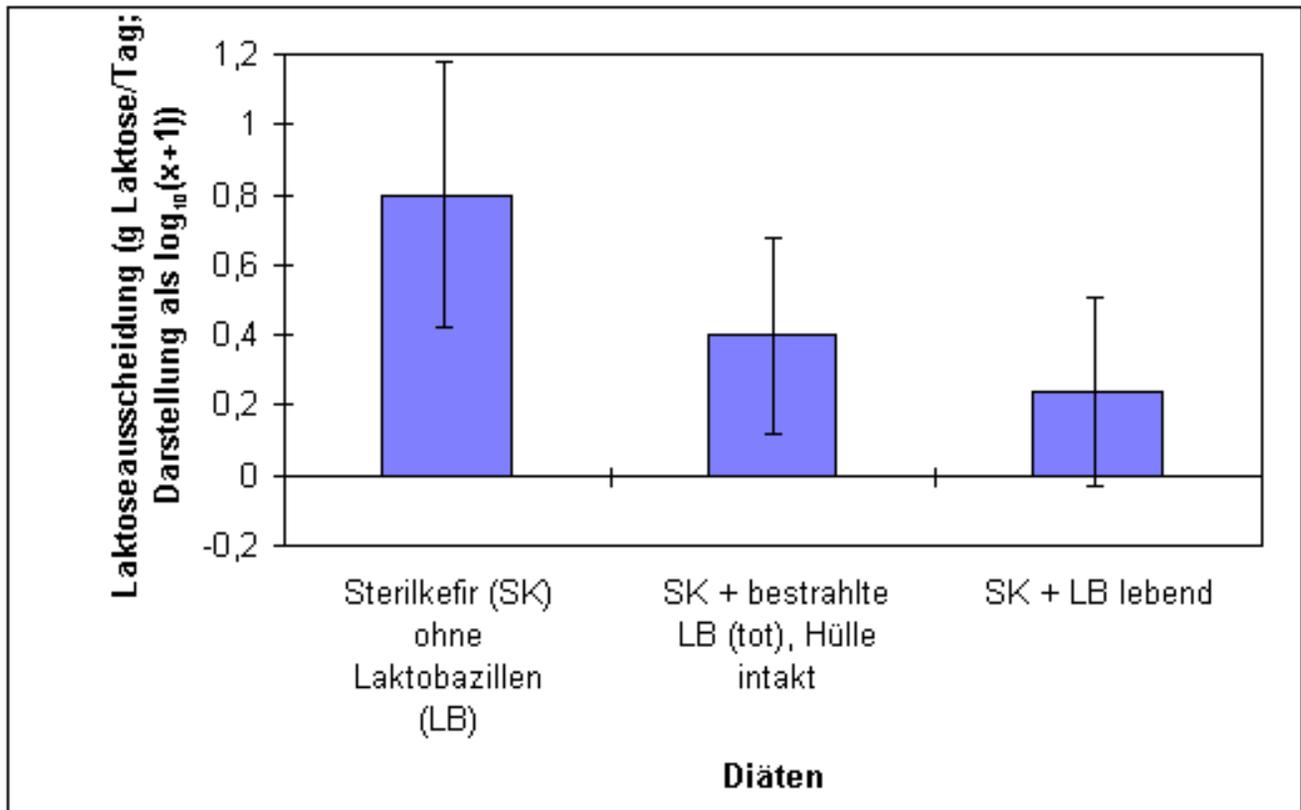


Abb. 12: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene Laktosemenge (Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen;

Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander (s. Tab. 14 a und Abb. A 1 und A 8 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6)

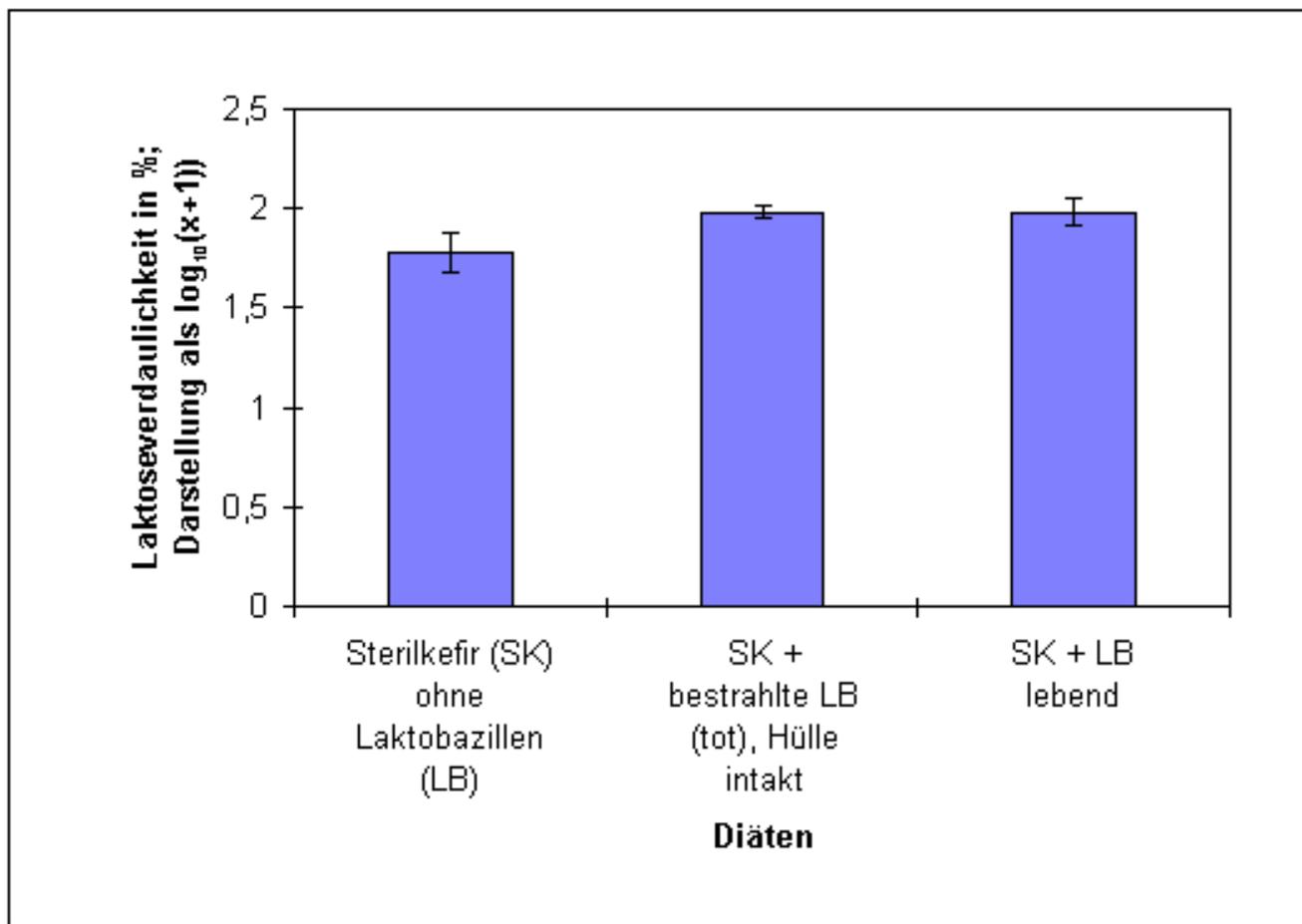


Abb. 13: Durchschnittliche wahre, marker-korrigierte Verdaulichkeit der Laktose in % (bestimmt mit Cr-EDTA als Marker; Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander (s. Tab. 15 a und Abb. A 2 und A 9 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6)

Anders verhielt es sich mit der marker-korrigierten Laktoseverdaulichkeit. Die Laktoseverdaulichkeit war nach der Aufnahme von Kefir ohne Laktobazillen (Diät 1) statistisch signifikant niedriger als nach Aufnahme von Kefir mit inaktivierten (Diät 2) oder lebenden (Diät 3) Laktobazillen. Keinen statistisch signifikanten Unterschied gab es zwischen der Laktoseverdaulichkeit nach Verzehr des Kefirs mit inaktivierten Laktobazillen (Diät 2) und der Laktoseverdaulichkeit nach Verzehr von Kefir mit lebenden Laktobazillen (Diät 3).

4.7.4. Einfluß der Diäten auf die Höhe der β -Galactosidase-Ausscheidung der Göttinger Minischweine

Bei der β -Galactosidase waren die Verhältnisse erwartungsgemäß genau umgekehrt wie bei der Laktose-Ausscheidung. Unter Diät 1 (Sterilkefir ohne Laktobazillen) schieden die Schweine fast keine β -Galactosidase aus: $0,02 \pm 0,12$ ($0,2 \pm 0,3$; s. Abb. A 3) IU/Tag extrazelluläre und $0,18 \pm 0,23$ ($0,8 \pm 0,7$; s. Abb. A 4) IU/Tag gesamte Enzymaktivität), wohingegen die Ausscheidung des Enzyms nach Aufnahme von lebenden Laktobazillen (Diät 3) sehr hoch war. Dies galt sowohl für Proben, in denen die freie β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) bestimmt wurde (s. Abb. 14), als auch für solche, in

denen die gesamte β -Galactosidase-Aktivität (s. Abb.15; mit Ultraschallbehandlung) gemessen wurde. Sie lag bei $0,8 \pm 0,7$ (18 ± 13) IU/Tag extrazelluläres Enzym, bzw. $1,2 \pm 0,6$ (32 ± 22) IU/Tag gesamtes Enzym. Unter Diät 2 nach Verzehr des Kefirs mit inaktivierten Laktobazillen wurden $0,4 \pm 0,5$ (4 ± 3) IU/Tag extrazelluläres Enzym, bzw. $0,9 \pm 0,4$ (11 ± 6) IU/Tag Gesamt-Enzym bestimmt.

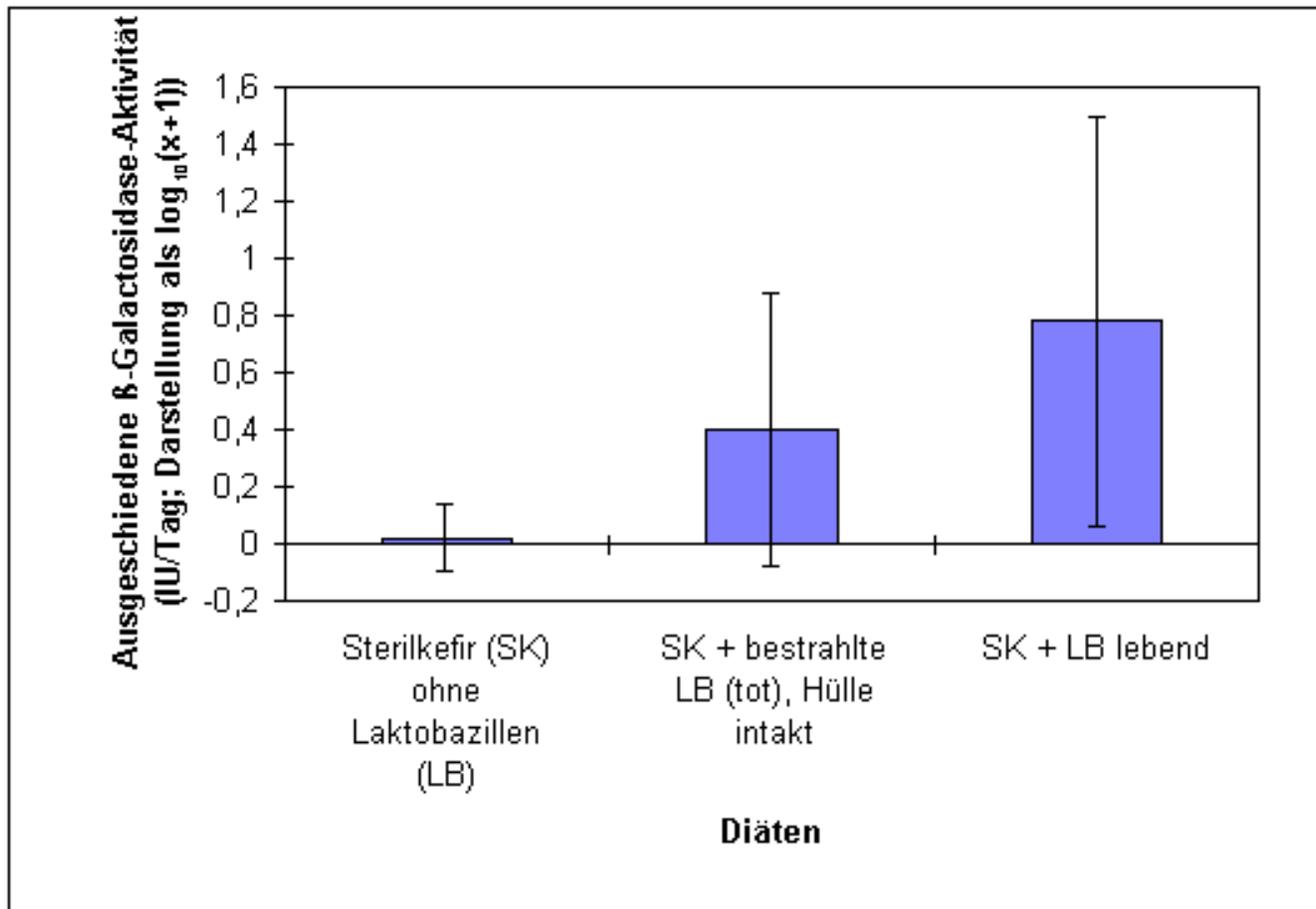


Abb. 14: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene freie (extrazelluläre) β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung; Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) bei gnotobiotischen Mischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat) Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander (s. Tab. 16 a und Abb. A 3 und A 10 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6)

Bei Einzelbetrachtung der Tiere (s. Abb. A 10 und A 11 im Anhang) ergab sich der gleiche Sachverhalt, hier sah man sogar, daß bei einzelnen Tieren während der ersten Diätphase überhaupt keine Enzymaktivität im Kot gefunden wurde.

Die statistische Auswertung der Ergebnissen ergab, daß es keine Wechselwirkungen zwischen den Tieren und den Diäten gab und daß ein Unterschied zwischen den 3 Diäten bestand. Die Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität im Kot der Mischweine nach der Aufnahmen von Sterilkefir ohne Laktobazillen (Diät 1) lag statistisch signifikant niedriger als nach der Aufnahme sowohl von Kefir mit inaktivierten (Diät 2) als auch viablen (Diät 3) Laktobazillen. Die Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität im Kot der Tiere nach Verzehr von Diät 2 war statistisch niedriger als nach Verzehr der Diät 3. Wurde das freie Enzym betrachtet, lagen die

β -Galactosidase-Aktivitäten insgesamt etwas niedriger, es zeigten sich aber sonst die gleichen Verhältnisse. Es ergaben sich also statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit dem Kot ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivitäten aller drei Diätperioden.

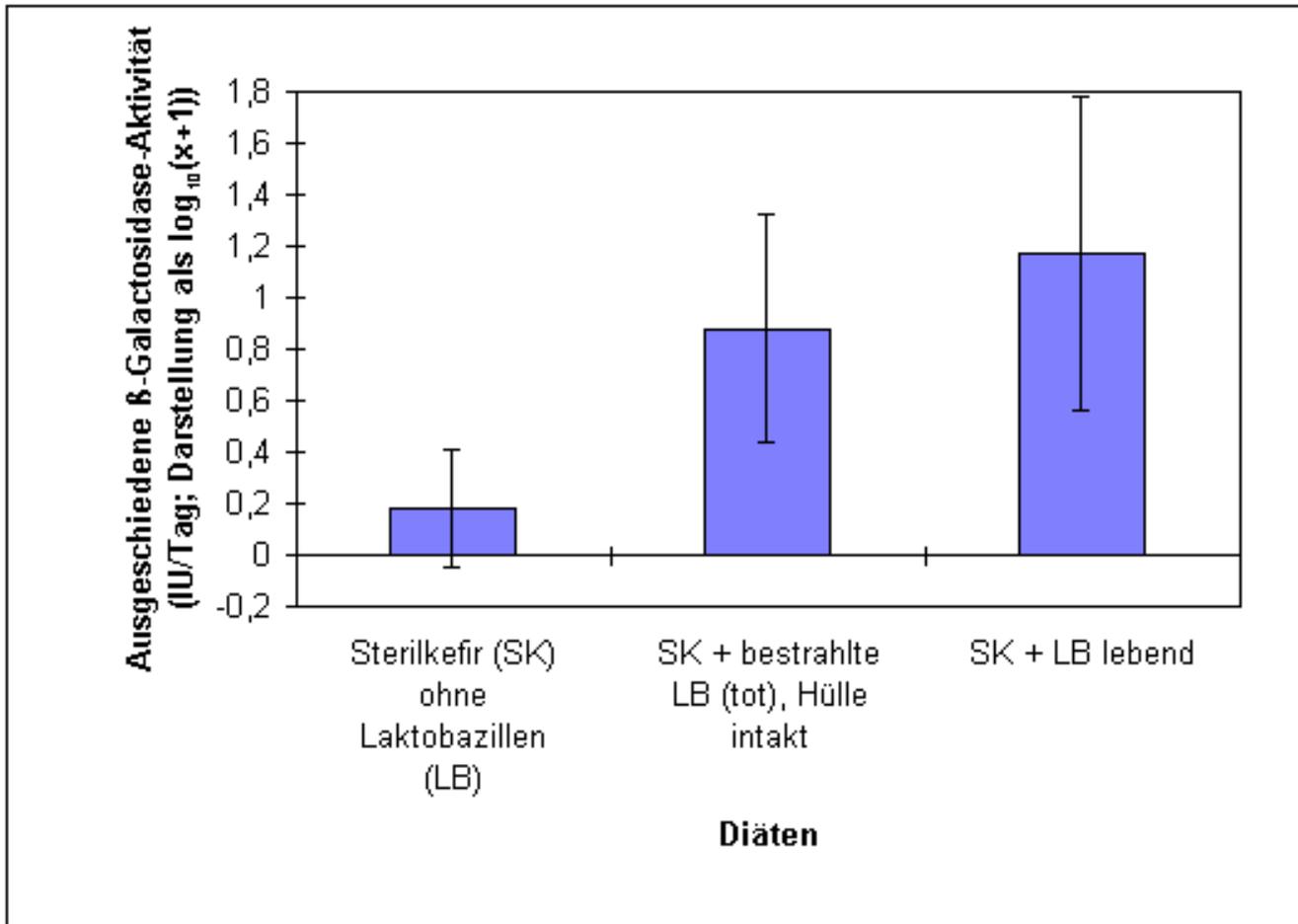


Abb. 15: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung; Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat) Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander (s. Tab. 17 a und Abb. A 4 und A 11 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6)

4.7.5. Keimzahlen in der Diät und im Kot der Göttinger Minischweine im dritten Versuchsabschnitt nach Verabreichung der viablen Laktobazillen

Die Bestimmung der Keimzahl der viablen Laktobazillen erfolgte mit dem Plattentropfverfahren (s. 3.2.6.) in der dritten Versuchsperiode aus der Versuchsdiät und aus dem Kot der einzelnen Tiere. Die Bestimmung ergab für die Versuchsdiät gleichbleibende Werte, die bei 4×10^8 KBE/ml (log 8,3) Kefir lagen und nur sehr gering variierten. Die lebenden Laktobazillen wurden 4 Tage verabreicht, dann folgten 4 Tage, an denen keine Keime gegeben wurden und weitere 9 Tage, an denen die Schweine die lebenden Keime erneut bekamen. Durch die Ermittlung der Zahl der ausgeschiedenen Keime sollte in Erfahrung gebracht werden, ob dieser

Laktobazillenstamm in der Lage wäre im Magen-Darm-Trakt zu überdauern, oder ob nach Abbruch der Gabe die Keimzahl wieder abnehmen würde. Die Keimzahlen, die aus dem Kot bestimmt wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es wurde festgestellt, daß in den ersten beiden Tagen nach der Keimgabe noch keine Laktobazillen im Kot zu finden waren. Am 3. Tag stieg die Keimzahl auf 4×10^3 KbE/g (log 3,4) Feuchtkot an, erreichte am 4. und 5. Tag 3×10^4 KbE/g (log 4,3) Feuchtkot, um dann nach ausbleibender Keimgabe ab dem 5. Tag wieder abzufallen auf 0. Erst 2 Tage nach erneuter Keimgabe (am 10. Tag) stieg die Keimzahl wieder auf 9×10^4 KbE/g (log 4,8) Feuchtkot an, um sich bei diesem Wert einzupendeln. Die Höchste Keimzahl wurde mit 6×10^5 KbE/g (log 5,4) Feuchtkot am 15. Tag erreicht. Insgesamt konnte festgestellt werden, daß es immer etwa 2 Tage dauerte, bis sich die Änderung in der Diät (mit/ohne Laktobazillen) auf die Keimzahl im Kot auswirkte, was mit der ca. 48-stündigen oro-fäkalen Transitzeit gut übereinstimmt. Die Keimzahlen im Kot machten deutlich, daß die Laktobazillen relativ schnell wieder aus dem Magen-Darm-Trakt verschwanden, wenn die ständige Zufuhr über die Diät fehlte.

Tabelle 1:

Dekadischer Logarithmus der durchschnittlichen Keimzahlen im Kot von Minischweinen (n=6) unter der Diät 3 (Kefir mit lebenden Laktobazillen) an den einzelnen Tagen

Angaben in log/g Feuchtkot; (Werte = $X \pm S_x$; n = 6)

* = lebende Laktobazillen in der Diät

grau = Sterilkefir

Datum	log Keimzahl	Standardabw
27.03.1995*	0	0
28.03.1995*	0	0
29.03.1995*	3,4	2,1
30.03.1995*	4,3	2,2
31.03.1995	4,3	2,3
01.04.1995	3	1,8
02.04.1995	1,4	1,4
03.04.1995	1,2	1,8
04.04.1995*	0	0
05.04.1995*	0	0
06.04.1995*	4,8	0,7
07.04.1995*	4,2	0,9
08.04.1995*	4,8	1,5
09.04.1995*	4,7	2,4
10.04.1995*	5,4	0,8

11.04.1995*	5,3	2,5
12.04.1995*	4,6	2,0

Die Abb. 16 und 17 stellen die Verhältnisse der Keimzahlen im Kot der Schweine vor und nach der Applikation der Laktobazillen dar. Im Kot der keimfreien Tiere befanden sich keine Mikroorganismen, im Kot der mit Laktobazillen monoassoziierten Göttinger Minischweine konnte man eine große Anzahl von gram-positiven, schlanken Stäbchen sehen.

Abb. 16: Kotasstrich eines Schweines vor Versuchsbeginn (Vergrößerung 1:1500)

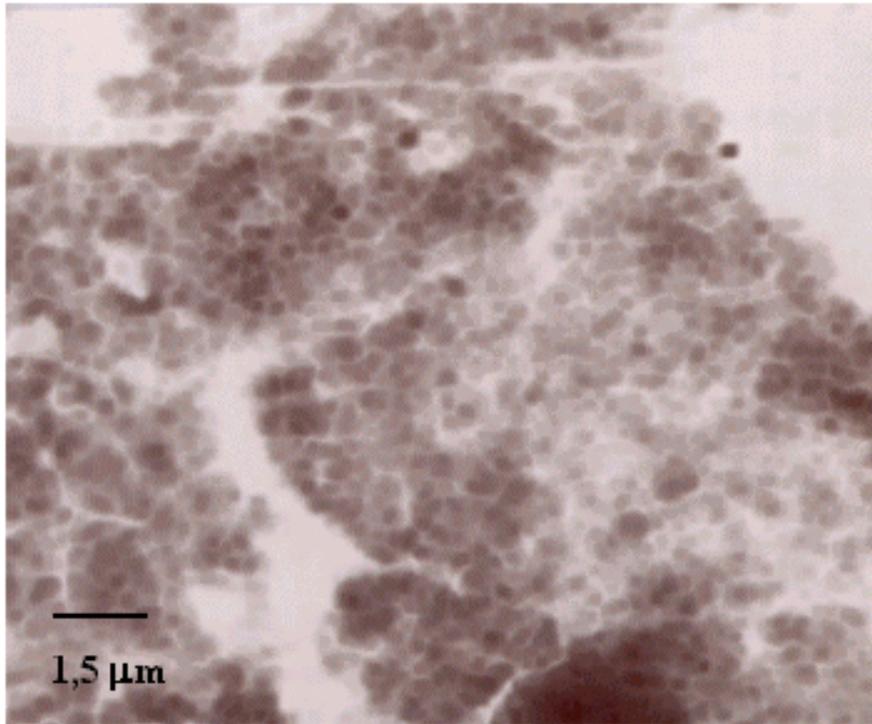
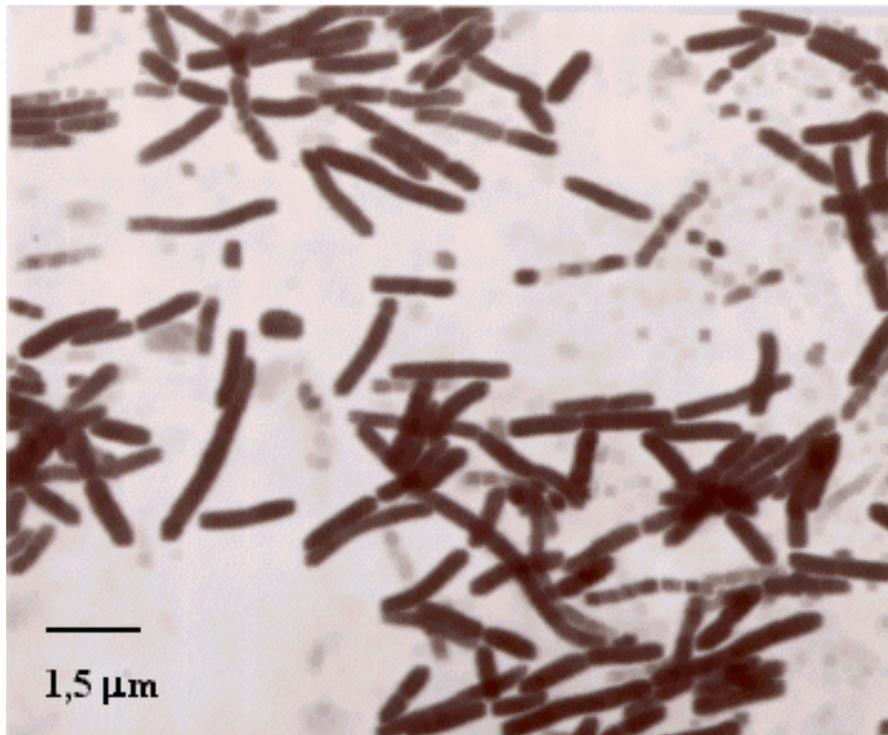


Abb. 17: Kotasstrich eines Schweines nach erstmaligem Erhalt des Kefirs mit den lebenden (Vergrößerung 1:1500)



4.8. Fütterungsversuch mit unterschiedlich aufbereitetem Kefir, durchgeführt bei der gnotobiotischen Ratte

4.8.1. Überprüfung des gnotobiotischen Status der Ratten (Sterilkontrolle)

Die zur Feststellung des Status durchgeführten Sterilkontrollen, waren negativ, die Ratten waren keimfrei (Vergleich s. 4.7.1).

4.8.2. Kotbeschaffenheit während der einzelnen Versuchsdäten

Der Rattenkot war während aller Versuchsdäten geformt. Allerdings war er während der ersten Diät etwas weicher als bei den beiden folgenden Diäten.

4.8.3. Einfluß der Diäten auf die Laktoseausscheidung der Ratten

Die Laktoseausscheidungen von 6 Tieren über 14 Tage wurden während jeder der drei Versuchsdäten im quantitativ über 24 Stunden gesammelt und dann homogenisierten Kot ermittelt. Da, wie unter 3.6. bereits beschrieben, beim statistischen Vergleich der Laktoseausscheidungen unter den drei Diäten nicht von einer symmetrischen Verteilung der Werte ausgegangen werden konnte, wurde mit den logarithmierten und zusätzlich

transformierten ($x+1$; um auch negative Beobachtungen einbeziehen zu können) Daten weiter gearbeitet. Die nicht logarithmierten und transformierten Daten sind jeweils in den Klammern angegeben und in den Grafiken im Anhang wiederzufinden:

Die in Abb. 18 dargestellte von 6 Ratten durchschnittlich ausgeschiedene Laktosemenge lag während der ersten Versuchsdät (Sterilkefir ohne Laktobazillen) bei $0,51 \pm 0,17$ ($2,5 \pm 0,4$; Anhang Abb. A 5) g/Tag. Während der zweiten Versuchsdät, wo die Tiere mit dem Kefir zusätzlich bestrahlte (tote/inaktivierte) Laktobazillen erhielten, nahm die Laktosemenge ab und lag bei $0,33 \pm 0,16$ ($1,3 \pm 0,2$) g/Tag. Der Unterschied zur ersten Diät war statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die statistische Auswertung der Ergebnisse ergab, daß es keine Wechselwirkungen zwischen den Tieren und den Diäten gab und daß ein Unterschied zwischen den drei Diäten bestand. In der letzten Versuchsphase bei Gabe von Kefir mit lebendem Keim sank die ausgeschiedene Laktosemenge auf $0,23 \pm 0,22$ ($0,78 \text{ g} \pm 0,13$) g/Tag, der Unterschied zur ersten Diät war genau wie zuvor statistisch signifikant. Die Laktoseausscheidung war also nach Aufnahme von Kefir mit Laktobazillen, die β -Galactosidase-Aktivität enthielten, signifikant niedriger als nach Aufnahme von Kefir ohne Keim (Diät 1; keine β -Galactosidase-Aktivität). Die Laktoseausscheidung nach Aufnahme von Kefir mit inaktivierten Laktobazillen mit β -Galactosidase-Aktivität (Diät 2) war auch statistisch signifikant höher als nach Verzehr von Kefir mit lebenden Laktobazillen mit β -Galactosidase-Aktivität (Diät 3), allerdings war auch hier, genau wie bei den Minischweinen der Unterschied der durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedenen Laktosemenge nicht so groß wie nach Verzehr von Diät 1 zu den beiden Diäten 2 und 3.

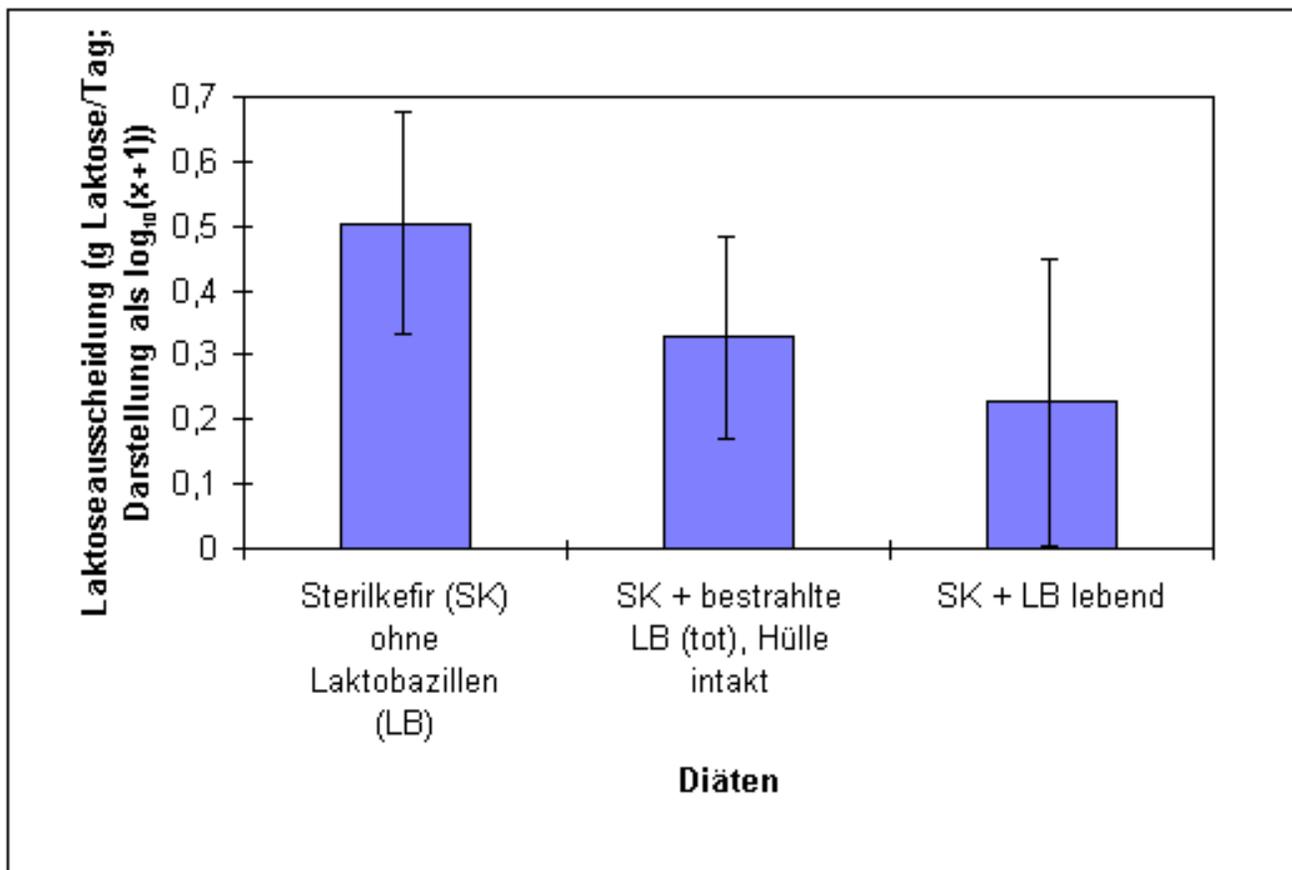


Abb. 18: Durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedene Laktosemenge (Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) bei gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen
 Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander
 (s. Tab. 18 a und Abb. A 5 und A 12 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

4.8.4. Einfluß der Diäten auf die Höhe der β -Galactosidase-Ausscheidung der Ratten

Auch die β -Galactosidase-Ausscheidungen wurden von 6 Tieren über 14 Tage während jeder der drei Versuchsdiäten im quantitativ über 24 Stunden gesammelten und dann homogenisierten Kot ermittelt. Da auch hier, wie unter 3.6. bereits beschrieben, beim statistischen Vergleich der β -Galactosidase-Ausscheidungen unter den drei Diäten nicht von einer symmetrischen Verteilung der Werte ausgegangen werden konnte, wurde mit den logarithmierten und zusätzlich transformierten ($x+1$; um auch negative Beobachtungen einbeziehen zu können) Daten weiter gearbeitet. Die nicht logarithmierten und transformierten Daten sind jeweils in den Klammern angegeben und in den Grafiken im Anhang wiederzufinden:

Die Verhältnisse bei der β -Galactosidase-Ausscheidung (s. Abb. 19 und 20) verhielten sich genau umgekehrt zu den Werten der Laktoseausscheidung. Nach Verzehr von Sterilkefir ohne Laktobazillen über 2 Wochen schieden die Ratten fast keine β -Galactosidase aus: $0,01 \pm 0,06$ ($0,5 \pm 0,8$; s. Abb. A 6 im Anhang) IU/Tag extrazelluläres, bzw. $0,005 \pm 0,02$ ($0,01 \pm 0,009$; s. Abb. A 7 im Anhang) IU/Tag gesamtes Enzym. Dahingegen war die Ausscheidung des Enzyms nach Aufnahme von lebenden Laktobazillen sehr hoch. Dies galt sowohl für Proben, in denen die freie β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) bestimmt wurde (s. Abb. 19), als auch für solche, in denen die Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität (s. Abb. 20; mit Ultraschallbehandlung) gemessen wurde. Die β -Galactosidase-Aktivitäten lagen bei $1,88 \pm 0,31$ (90 ± 11) IU/Tag extrazelluläres, bzw. $2,14 \pm 0,4$ (181 ± 27) IU/Tag gesamtes Enzym. Während Diät 2, nach Gabe von abgetöteten Laktobazillen, wurden $0,42 \pm 0,3$ ($2 \pm 0,6$) IU/Tag extrazelluläres und $0,42 \pm 0,3$ ($2,3 \pm 0,6$) IU/Tag gesamtes Enzym bestimmt. Bei Einzelbetrachtung der Tiere (s. A 13 und A 14 im Anhang) ergab sich der gleiche Sachverhalt, einzelne Tiere zeigten während der ersten Diät überhaupt keine Enzymaktivität.

Die statistische Auswertung der Ergebnissen ergab, daß es keine Wechselwirkungen zwischen den Tieren und den Diäten gab und daß ein Unterschied zwischen den drei Diäten bestand. Die freie β -Galactosidase-Aktivität (ohne Behandlung der Probe mit Ultraschall) im Kot der Ratten nach der Aufnahme von Sterilkefir ohne Laktobazillen (Diät 1) lag statistisch signifikant niedriger als nach der Aufnahme sowohl von Kefir mit inaktivierten (Diät 2) als auch viablen (Diät 3) Laktobazillen. Die freie β -Galactosidase-Aktivität im Kot der Tiere nach Verzehr von Diät 2 war statistisch signifikant niedriger als nach Verzehr der Diät 3. Wurden die Proben mit Ultraschall behandelt, lagen die β -Galactosidase-Aktivitäten insgesamt höher, doch die Verhältnisse der Enzymaktivitäten untereinander während der unterschiedlichen Diäten stimmten mit denen beim extrazellulär erfaßten Enzym überein. Die Vergleiche der Diäten untereinander zeigten zwischen allen drei Diäten statistisch signifikante Unterschiede.

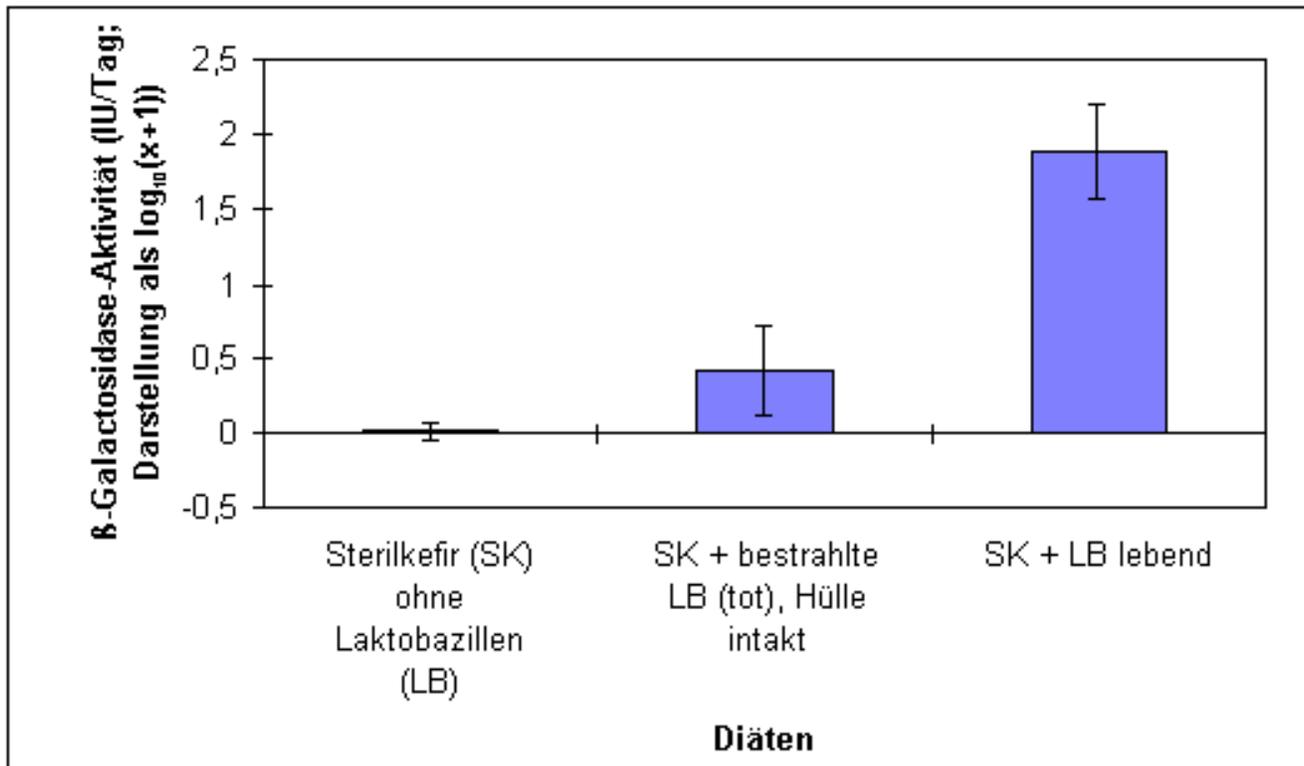
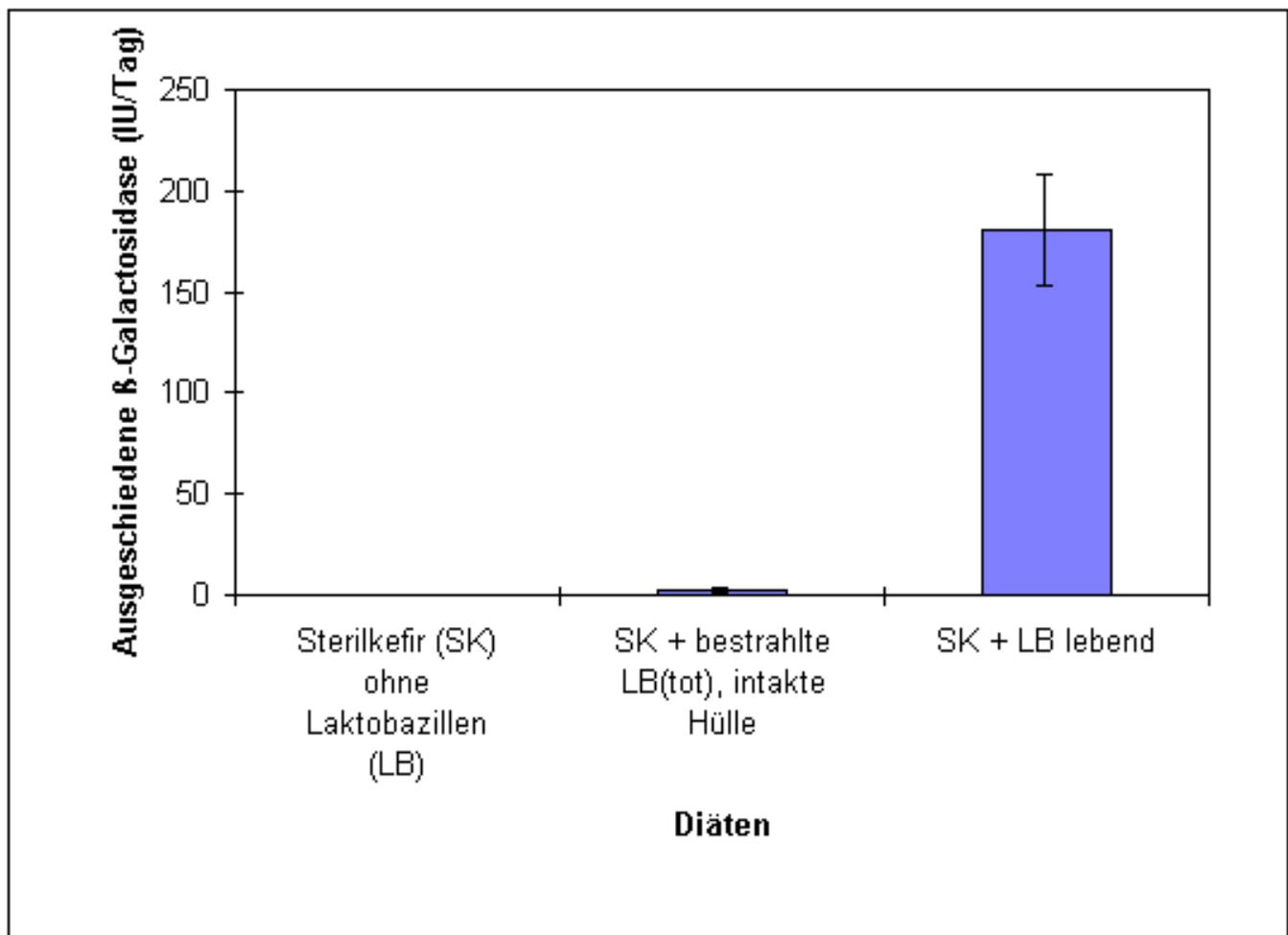


Abb. 19: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (extrazellulär; ohne Ultraschallbehandlung; Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat)
 Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander
 (s. Tab. 19 a; Abb. A 6 und A 13 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6)



**Abb. 20: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (gesamt; mit Ultraschallbehandlung; Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat)
Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander
(s. Tab. 20 a; Abb. A 7 und A 14 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6)**

4.8.5. Keimzahlen in der Diät und im Kot der Ratten nach Verabreichung der viablen Laktobazillen

Die Bestimmung der Keimzahlen der lebensfähigen Laktobazillen erfolgte mit dem Plattentropfverfahren (s. 3.2.6.) in der dritten Versuchsperiode aus der Versuchsdiaät und aus dem Kot der einzelnen Tiere.

In der Versuchsdiaät ergab die Bestimmung gleichbleibende Werte, die bei $6,2 \times 10^8$ KbE/ml (log 8,4) Kefir lagen und nur sehr gering variierten. Die Keimzahlen, die aus dem Kot bestimmt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Entgegen dem Versuch beim Schwein (s. 4.6.4.), wo die Keimzahl im Kot nach Keimgabe erst sehr allmählich anstieg, wurde bei der Ratte sofort nach der Verabreichung der Laktobazillen ein starker Anstieg der Keimzahl im Kot auf 3×10^8 KbE/g (log 8,2) Feuchtkot verzeichnet. Diese Keimzahl blieb während der ersten 3 Tage (Tage an denen der Keim appliziert wurde) konstant, um schließlich allmählich an den Tagen abzufallen, an denen die Laktobazillen den Ratten nicht verabreicht wurden. Am letzten Tag der 4-tägigen keimfreien Diät lag die im Kot gefundene Keimzahl mit 3×10^4 KbE/g (log 4,3) Feuchtkot am niedrigsten. Gleich nach erneuter Keimapplikation stieg auch die Keimzahl im Kot der Ratten wieder an, um dann unter ständiger täglicher

Keimzufuhr (durchschnittlich $6,2 \times 10^8$ KbE/ml (log 8,4) Kefir) über die Nahrung sich konstant bei einer Keimzahl von durchschnittlich $7,5 \times 10^8$ KbE/g (log 7,6) Feuchtkot einzupendeln. Die Keimmengen im Kot der Ratten änderten sich im Gegensatz zu den der Schweinen nicht mit 2-tägiger Verzögerung, sondern abrupt, sofort nach der Keimgabe. Jedoch wurde auch hier eine allmähliche Keimabnahme nach einem Stop der Keimzufuhr verzeichnet.

Tabelle 2:

Dekadischer Logarithmus der durchschnittlichen Keimzahlen im Kot von Ratten (n=6) unter der Diät 3 (Kefir mit lebenden Laktobazillen) an den einzelnen Tagen

Angaben in log/g Feuchtkot; (Werte = $X \pm S_x$; n = 6)

* = lebende Laktobazillen in der Diät

grau = Sterilkefir

Datum	log Keimzahl	Standardabw
27.05.1995*	8,2	0,4
28.05.1995*	8,2	0,3
29.05.1995*	7,5	0,4
30.05.1995	6,7	0,8
31.05.1995	6,6	0,5
01.06.1995	4,6	0,7
02.06.1995	4,3	1,3
03.06.1995*	4,4	1,1
04.06.1995*	7,8	0,5
05.06.1995*	7,6	0,2
06.06.1995*	7,7	0,2
07.06.1995*	7,6	0,3
08.06.1995*	7,7	0,2
09.06.1995*	7,7	0,3
10.06.1995*	7,5	0,3

Die Abb. 21 und 22 stellen die mikrobiologischen Verhältnisse im Kot der Ratten vor und nach der Applikation der Laktobazillen dar. Im Kot der keimfreien Ratten befanden sich keine Mikroorganismen, im Kot der mit Laktobazillen monoassoziierten Tier konnte man eine große Anzahl von gram-positiven, schlanken Stäbchen sehen.

Abb. 21: Kotausstrich einer Ratte vor Versuchsbeginn (Vergrößerung 1:1500)

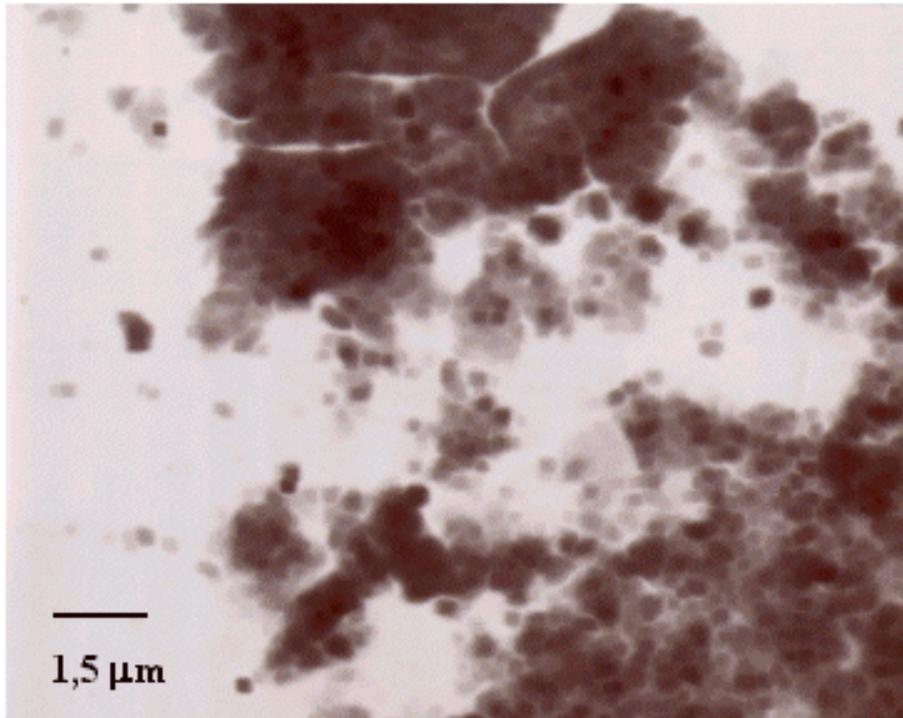
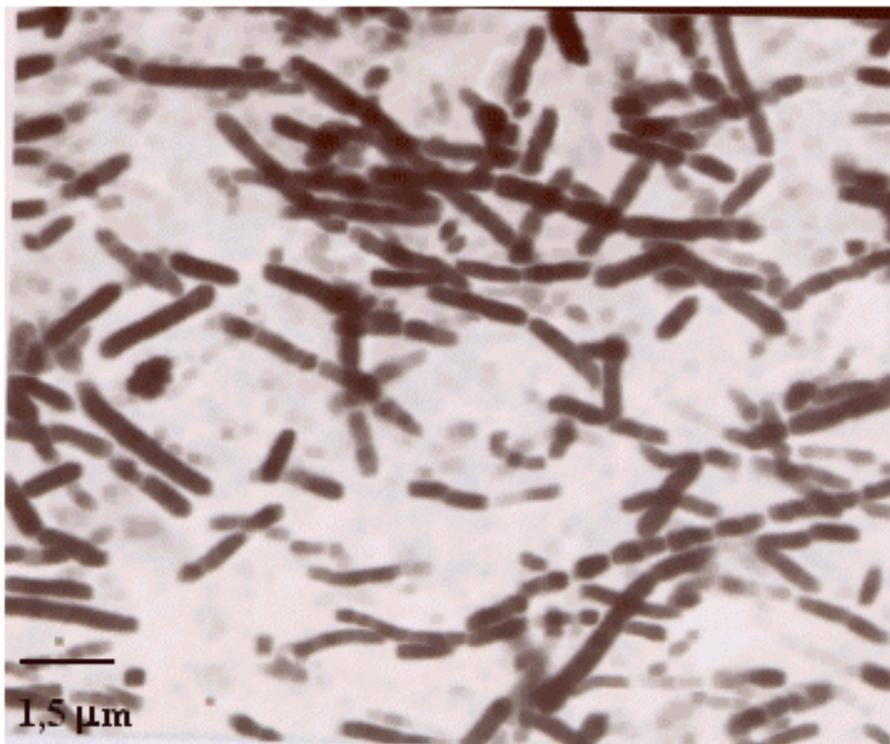


Abb. 22: Kotausstrich einer Ratte nach erstmaligem Erhalt des Kefirs mit den lebenden Laktobazillen (Vergrößerung 1:1500)



5.Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die bessere Verträglichkeit fermentierter Milchprodukte gegenüber nicht fermentierten Milchprodukt bei Laktoseintoleranten an das Vorhandensein viabler Keime im Produkt gebunden ist. Mit anderen Worten oder ob auch Produkte mit abgetöteten Laktobazillen aber intakter β -Galactosidase den gleichen Effekt haben. Dazu bedurfte es der Klärung einiger für den späteren Tierversuch relevanter Vorbedingungen.

5.1.Vorversuche

5.1.1.Reinheit und Wachstumsbedingungen des im Versuch verwendeten Laktobazillen-Stammes

Die Ermittlung der Reinheit des verwendeten Laktobazillen-Stammes war von eminenter Wichtigkeit, da in den Fütterungsversuchen mit gnotobiotischen Tieren gearbeitet wurde. Bei diesen Tieren könnten schon einzelne Fremdkeime eine Kontamination verursachen, d.h. sie könnten die Möglichkeit finden sich massenhaft im Tier zu vermehren. Der Laktobazillen-Stamm wurde mittels api-System definitiv als rein identifiziert. Da nur einmal bei 9 Prüfungen eine widersprechende biochemische Reaktion festgestellt wurde, wurde davon ausgegangen, daß es sich um reines Lyophilisats von Laktobazillen handelte.

Um den Fütterungsversuch bei gnotobiotischen Minischweinen durchführen zu können, mußten fermentierte Milchprodukte mit einer größtmöglichen Menge von lebenden Laktobazillen hergestellt werden. Wenn sich die Keime in einer Anzuchtkultur am Ende der logarithmischen Wachstumsphase befinden, konnte mit der höchsten Ausbeute an wirklich viablen Laktobazillen gerechnet werden. Nach unseren Untersuchungen war dieser Punkt nach 14 Stunden erreicht, wenn bei einer Temperatur von 37° C in MRS-Bouillon inkubiert wurde. Die Inkubationstemperatur entsprach der Körpertemperatur der Versuchstiere (Göttinger Minischwein und Ratte).

Wie aus der Wachstumskurve zu ersehen ist gab es 2 Zeitstufen, während derer sich die Keimzahl in der Anzucht nicht veränderte, einmal zwischen 6 und 7 Stunden und einmal zwischen 9 und 12 Stunden Inkubationsdauer. Während dieser Zeit stagnierte das Keimwachstum. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, denn an den Anzuchtbedingungen wurde während dieser Zeit nichts verändert. Nachdem die Keime nach 12 Stunden Inkubationsdauer nochmals weiter wuchsen, mußte das Ende der logarithmischen Wachstumskurve bei 14 Stunden angenommen werden, denn danach veränderte sich die

Keimzahl innerhalb der nächsten 8 Stunden, die noch gemessen wurden in der Anzucht nicht mehr, sondern blieb bei $\log 8,3$ ($4,8 \cdot 10^8$) KbE/ml. Dies wurde durch Wiederholungen des Versuchs bestätigt.

Als Fazit ergab sich, daß alle Laktobazillen-Hauptkulturen für die Versuche unter den oben besprochenen Bedingungen zur optimalen Ausbeute an lebenden Laktobazillen angezüchtet werden sollten. Darüber hinaus wurde davon ausgegangen, daß die verabreichten Laktobazillen sich bei einer mindestens 12 stündigen Darmpassage unter den gegebenen Temperaturverhältnissen ausreichend vermehren und sich gegebenenfalls ansiedeln konnten.

5.1.2.β-Galactosidase-Aktivitäten in Proben nach einer in vitro Verdauung in einem Pepsin/HCl-Gemisch

Da nach der Aufnahme von Milch und Milchprodukten die Hydrolyse der enthaltenen Laktose mit anschließender Laktoseabsorption erst im Dünndarm erfolgt, war es wesentlich, daß die dafür verantwortliche, mit dem Milchprodukt verabreichte β-Galactosidase nicht bereits bei der Magenpassage zerstört wird. Die Empfindlichkeit der verschiedenen Laktobazillenstämme gegenüber Magensaft und auch gegenüber Gallenflüssigkeit ist sehr unterschiedlich, und somit auch die Möglichkeit, daß die in ihnen enthaltene β-Galactosidase im Dünndarm auf die in der Nahrung enthaltene Laktose einwirken kann. CONWAY et al. (1987) untersuchten vier verschiedene Milchsäurebakterien-Stämme hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit im Magenmilieu und fanden, daß *Lactobacillus acidophilus*-Stämme wesentlich besser in der Lage sind die im Magenmilieu herrschenden Bedingungen zu überstehen, als *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus*, oder als *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (beides Kulturkeime in Joghurts zu finden).

Da in der Literatur keine quantitativen Angaben zur Stabilität der β-Galactosidase aus Laktobazillen gegenüber peptischem Verdau zu finden waren, wurde ein Vorversuch durchgeführt, um zu erkunden, ob die mikrobielle β-Galactosidase des verwendeten Stammes *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 in der Lage ist die Magenpassage zu überstehen.

Die bei niedrigem pH 2 beobachteten Aktivitätsverluste der β-Galactosidase waren damit zu erklären, daß das aus den Laktobazillen wegen Zerstörung der Zellmembranen durch den Magensaft ausgetretene Enzym dem Angriff durch Peptidasen nun schutzlos ausgesetzt war. In den bestrahlten Proben ist dieser Aktivitätsverlust drastischer als in den unbestrahlten Proben, was zu dem Schluß führte, daß die Zellmembranen durch die Bestrahlung für das Enzym durchlässig wurden. Daß die Zellmembran ein Schutz des Enzyms gegenüber Verdauung bietet, zeigten auch SHAH und JELEN, 1990, die Laktobazillen-Zellwände mit Ultraschallwellen zerstörten und danach ebenso einen Aktivitätsverlust der β-Galactosidase im Magenmilieu feststellten.

Der anfängliche Anstieg der Enzymaktivität ist dadurch zu erklären, daß ein größerer Teil der die β-Galactosidase beherbergenden toten (durch die Bestrahlung abgetöteten) Laktobazillen vom Pepsin/HCl-Gemisch angegriffen wurde, d.h. ihre Zellwand zerstört und somit die β-Galactosidase freigesetzt wurde, welche nun bei Bestimmung der extrazellulären β-Galactosidase-Aktivität erfaßt wurde. Die rapide Abnahme der β-Galactosidase in den bestrahlten Proben (gegenüber den unbestrahlten

Proben) bei pH 2 rührt vermutlich daher, daß sowohl das Enzym selbst als auch ganz besonders die Zellmembran der Keime durch die Bestrahlung derart verändert wurden, daß sie gegenüber dem stark sauren Milieu des leeren Magens weniger resistent waren als Laktobazillen und β -Galactosidase, die keiner Bestrahlung ausgesetzt wurden. Dies wird deutlich, bei der Betrachtung der unbestrahlten Proben; in ihnen nahmen sowohl die extrazelluläre als auch die gesamte β -Galactosidase kaum ab. In der unbestrahlten Kefirprobe war sogar ein Anstieg der β -Galactosidase-Aktivität mit der Dauer der Inkubationszeit zu verzeichnen. Das beruhte vermutlich auch auf einer autolytischen Zerstörung der Laktobazillenzellmembran mit anschließendem Austritt des Enzyms.

Beim Vergleich der bestrahlten und unbestrahlten Pufferproben zu den bestrahlten und unbestrahlten ungepufferten Kefirproben wurde deutlich, daß die extrazelluläre und die Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität in bestrahlten Pufferproben stärker und teilweise auch schneller abnahm als in den Kefirproben, was vermutlich durch die gute Pufferungskapazität fermentierter Milchprodukte gegenüber dem sauren Magenmilieu bedingt wurde (SAVAIANO und LEVITT, 1987). Auch MARTINI et al. (1985) wiesen nach, daß der pH-Wert des Mageninhalts nach der Aufnahme von 440 g Joghurt für eine Stunde über 3,0 blieb und auch nach 3 Stunden noch über 2,5 lag. In den unbestrahlten Kefirproben kam dieser positive Einfluß der Pufferungskapazität gegenüber den Pufferproben kaum zum tragen, es zeigten sich kaum Unterschiede.

Der gleiche Versuch wurde bei pH 4 nochmals durchgeführt, um die postprandialen Verhältnisse des Magens zu simulieren. Es konnte deutlich gezeigt werden, daß die Aktivität der frei in der Probe vorliegende β -Galactosidase auch nach einer Inkubationsdauer von 2 Stunden nur geringfügig abnahm. Die Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität sank bei den bestrahlten Proben ebenfalls nur wenig, bei den unbestrahlten Proben stieg sie stark an, sogar bis auf Werte von 33% über der Ausgangsaktivität an, wofür bis jetzt aber eine Erklärung fehlt.

Die mikrobielle β -Galactosidase von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 übersteht, wie der Versuch zeigte, die Magenpassage bei Bedingungen wie sie nach einer Mahlzeit vorzufinden wären (gefüllter Magen mit höherem pH) gut. Nicht alle Keime aus fermentierten Milchprodukten sind in gleichem Maße dazu befähigt die Magenpassage zu überstehen und dabei das intrazelluläre Enzym vor einer Denaturierung durch den Magensaft zu schützen (CONWAY et al. 1987). Dabei ist möglicherweise eine intakte Zellstruktur für die Erhaltung der β -Galactosidase unerlässlich. So zeigten MARTINI et al., 1987a und SHAH und JELEN, 1990, daß die β -Galactosidase-Aktivität in mit Ultraschall behandelten Keimen, deren Zellmembran zerstört war, rasch und vollständig verloren ging, wenn das nun ungeschützte Enzym einem pH von 3,0 bis 4,0 ausgesetzt wurde.

CONWAY et al. 1987 fanden, daß die Überlebenszeit von *Lactobacillus bulgaricus* (heute *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus*) zwischen der von *Lactobacillus acidophilus* und der von *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (andere in fermentierten Milchprodukten häufige Kulturen) lag, wenn die Keime dem Magenmilieu ausgesetzt waren. Mit der Untersuchung, ob Fermentationskeime und die in ihnen enthaltene β -Galactosidase in der Lage sind die Magenpassage zu überstehen, befaßten sich noch weitere Autoren (KILARA und SHAHANI, 1976; ROBINS-BROWN und LEVINE, 1980; HOOD und ZOTTOLA, 1988; POCHARD et al., 1989), die zu ähnlichen Ergebnissen kamen und für die

verschiedensten Milchsäurebakterien unterschiedliche Bedingungen fanden, die deren β -Galactosidase inaktivierten.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse dieser Versuchsanordnung, daß nach einem Verzehr der verwendeten Laktobazillen in Kefir, also einem fermentierten Milchprodukt, genügend β -Galactosidase die Magenpassage überstehen könnte, um sich im Dünndarm auf die Laktosehydrolyse auszuwirken, wobei die β -Galactosidase in lebenden Keimen jedoch besser geschützt zu sein scheint als in durch Bestrahlung mit γ -Strahlen abgetöteten Keimen. Dabei scheint der pH-Wert des Magensaftes wichtiger zu sein als die Unversehrtheit der Zellmembranen bzw. die Viabilität der eingesetzten Keime.

5.1.3. Die mukosale wirtseigene β -Galactosidase-Aktivität im Dünndarm von Göttinger Minischweinen und Ratten

Wie in der Einleitung aufgeführt, nimmt die Aktivität der mukosalen, wirtseigenen β -Galactosidase mit zunehmendem Lebensalter ab. Wie aus unseren Untersuchungen ersichtlich ist, sind sowohl beim Minischwein als auch bei der Ratte bereits nach 12 Lebenswochen annähernd die Werte der erwachsenen Tiere erreicht (KIDDER und MANNERS, 1980). Erwachsene Tiere sind aufgrund ihrer niedrigen mukosalen β -Galactosidase-Aktivität genau wie Laktosemalabsorber nicht in der Lage die Laktose in Milchprodukten zu hydrolysieren. Zu diesem Zeitpunkt konnte folglich mit dem Versuch begonnen werden, da die wirtseigene β -Galactosidase-Aktivität ähnlich niedrige Werte aufwies wie bei einem menschlichen Laktosemalabsorber.

Die Ergebnisse, die beim Göttinger Minischwein erlangt wurden, zeigten, daß die Aktivität der wirtseigenen β -Galactosidase (pH 5,5) hauptsächlich in den vorderen Dünndarmabschnitten, bis 50 % ab Magenausgang lokalisiert war, in den hinteren Dünndarmabschnitten nahm die Aktivität stärker ab. Die höchsten mukosalen β -Galactosidase-Aktivitäten lagen bei etwa 14 IU/g Feuchtmukosa, die niedrigsten bei 1-2 IU/g Feuchtmukosa. Das Mittel aller β -Galactosidase-Aktivitäten bei allen Scheinen in allen Dünndarmabschnitten lag mit etwa 7 IU/g Feuchtmukosa genau dazwischen. Allerdings waren die individuellen Unterschiede zwischen den Schweinen recht groß (s. die einzelnen Verlaufskurven in Abb. 6, in 4.4.) was in der Literatur allerdings auch von MANNERS und STEVENS (1972) bestätigt wird. Die Werte korrespondieren mit ihren Ergebnissen; allerdings führten sie die Bestimmung des Enzyms bei pH 6,0 durch und erhielten Werte bis zu 10 IU/g Mukosafeuchtmasse in den vorderen und bis zu 6 IU/g Mukosafeuchtmasse in den hinteren Darmabschnitten bei 8 Wochen alten Schweinen (Landrasse, Sattelschwein). Die geringfügig höheren Werte im Versuch könnten zum einen dadurch zustande gekommen sein, daß in einem anderen pH-Bereich gemessen wurde (Wirkoptimum der mukosalen β -Galactosidasen bei ca. pH 5,5 liegt), zum anderen, daß die Enzymbestimmung im Versuch sofort nach der Tötung der Tiere erfolgte, ohne vorherige Lagerung, die die Enzymaktivität negativ beeinflussen könnte, wie in der Arbeit oben genannter Autoren.

Die Untersuchungen bestätigten die Annahme, daß die untersuchten Dünndarmmukosaprobe der Göttinger Minischweine im Alter von 12 Wochen eine so geringe β -Galactosidase-Aktivität enthielten, daß sie mit der bei erwachsenen Tieren vorgefundenen vergleichbar war (MANNERS und STEVENS, 1972; STEVENS und KIDDER, 1972; KIDDER und MANNERS, 1980). Auch andere Autoren beschreiben, daß die β -Galactosidase-Aktivität bei Schweinen nach der ersten Lebenswoche stark abnimmt (BAILY, KITTS und WOOD, 1956; WALKER, 1959; HARTMAN et al., 1961; MANNERS und STEVENS, 1972; KIDDER und MANNERS, 1976, 1978; AUMAITRE und CORRING, 1978) und bei 8 Wochen alten Tieren nur noch in den proximalen Dünndarmabschnitten zu bestimmen war (SAMBROOK, 1979). Auch bei den 12 Wochen alten Ratten konnte der gleiche Sachverhalt festgestellt werden. Zwar lagen hier die Enzymaktivitäten insgesamt etwas höher (höchste Werte bei 16 IU/g Feuchtmukosa, das Mittel aller β -Galactosidase-Aktivitäten in allen Dünndarmabschnitten bei allen Tieren bei 10 IU/g Feuchtmukosa), aber immer noch nahe der oben in der Literatur gefundenen Werte. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß bei unseren Untersuchungen die Aktivität der β -Galactosidase des Wirts vernachlässigbar klein war gegenüber der zugeführten mikrobiellen β -Galactosidase-Aktivität. 12 Wochen alte Göttinger Minischweine und 12 Wochen alte Ratten konnten daher als geeignete Tiermodelle für die zu untersuchende Fragestellung angesehen werden. Allerdings mußte bedacht werden, daß die wirtseigene β -Galactosidase-Aktivität von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Faktoren abhängig ist, die nicht berücksichtigt werden konnten und deren Einfluß im späteren Tierversuch nicht ausgeschlossen werden konnte. Einen Einfluß auf die intestinale β -Galactosidase-Aktivität zeigten: Keimstatus der Dünndarmflora (BUTS et al., 1986; SCHULZE und ZUNFT, 1991), der Verzehr von Laktose und anderen Kohlenhydraten (PERGOLIZZI et al., 1977; KOLDOVSKY et al., 1983; LEICHTER et al., 1984; GODA et al., 1984), die Energiezufuhr (FREUND et al., 1991) und auch die Schilddrüsenhormone (FREUND et al., 1989; LIU et al., 1992). Die Fütterungsversuche wurden außerdem mit gnotobiotischen Tieren durchgeführt, bei denen die intestinale β -Galactosidase-Aktivität höher liegt, als bei Tieren, die unter konventionellen Bedingungen gehalten werden (ZUNFT und SCHULZE, 1991). Diese Einflüsse konnten nicht berücksichtigt werden, weil der methodische Aufwand zur Abgrenzung der intestinalen von der mikrobiellen β -Galactosidase zu hoch gewesen wäre. Es gab keine Möglichkeit, den Dünndarmchymus der Tiere während des Fütterungsversuchs zu untersuchen.

5.1.4. Einfluß der Bestrahlung mit γ -Strahlen auf die β -Galactosidase-Aktivität und den Keimstatus von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *Bulgaricus*

Als für die absolute Inaktivierung/Abtötung der Keime im fermentierten Milchprodukt am besten geeignete Methode erwies sich die Bestrahlung mit γ -Strahlen (in einer Kobalt-Strahlenquelle). Da γ -Strahlen vor allem die replikativen Anteile der Zelle angreifen (RETEL et al., 1993; FRANCHET-BEUZIT et al., 1993; FEIG et al., 1994; EWING und DAMSKER, 1995;), konnte davon ausgegangen werden, daß sie bereits gebildete Proteine, wie auch die β -Galactosidase weitgehend unbeschädigt lassen.

Die frei in Laktobazillenpellet-Proben vorliegende β -Galactosidase (extrazellulär) zeigte ohne Bestrahlung geringe Aktivität (0-5 IU/l Probe). Sie stieg mit zunehmender Bestrahlungsdosis auf das

5-fache bis 7-fache an. Die Abhängigkeit der extrazellulären Enzymaktivität sowohl von der Bestrahlungsdosis als auch von der Bestrahlungsintensität läßt vermuten, daß es bei Einwirkung niedrigerer Intensitäten (Position 7) über einen längeren Zeitraum zu einer stärkeren Schädigung der Zellmembranen und daher zu einem stärkeren Austritt des Enzyms in das umgebende Medium kam, als bei kurzzeitiger Einwirkung höherer Intensitäten (Position 3). Da die Zunahme der extrazellulären β -Galactosidase-Aktivität erst nach längerer Lagerungszeit festgestellt wurde, liegt die Vermutung nahe, daß entweder die Zellmembranen auch beschädigt worden waren, oder daß andererseits eine langsame Lyse der Zelle durch in ihr freigesetzte Enzyme das Austreten der β -Galactosidase ermöglichte.

Die Gesamt-Aktivität des Enzyms in den Proben nahm ab, je länger die Proben gelagert wurden. Auch dieser Effekt trat deutlicher hervor, wenn mit hohen Bestrahlungsdosen bestrahlt wurde, denn nach 5 Wochen war in der Probe, die mit 25 kGy bestrahlt wurde, nur noch die Hälfte der Ausgangsaktivität zu messen, d.h. die Lagerstabilität der β -Galactosidase nahm ab, was vermutlich genauso das Resultat der Freisetzung von intrazellulären Peptidasen sein könnte. Zum Erhalt der freien β -Galactosidase in den Laktobazillenpellet-Proben war es von Vorteil, die Bestrahlungsposition nah an der Strahlenquelle (Position 3) zu wählen, die Bestrahlung ist dort intensiver, wodurch die Bestrahlungszeiten verkürzt wurden. Während der Zeit, in der sich die Proben in der Strahlenquelle befanden (Bestrahlungszeit), war keine Kühlung möglich, wodurch die sehr temperaturempfindliche β -Galactosidase inaktiviert werden konnte, was ebenfalls eine Erklärung für den stärkeren Aktivitätsverlust bei Bestrahlung auf Position 7, mit längeren Bestrahlungszeiten, sein könnte.

Die Bestrahlungsdosis hatte keinen Einfluß auf die intrazelluläre Enzymaktivität in der Probe, die gleichbleibend bei 60 IU/l Probe lag, sowohl wenn nah an der Strahlenquelle, als auch weiter davon entfernt bestrahlt wurde. Die unbestrahlte Probe enthielt die gleiche β -Galactosidase-Aktivität, was ebenfalls darauf hindeutete, daß das Enzym durch die Bestrahlung in seiner Wirksamkeit nicht verändert wurde.

Die Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität nahm jedoch um so stärker ab, je länger die Proben gelagert wurden. Dabei war es unerheblich, ob sie bestrahlt waren oder nicht, denn auch die Aktivität in der unbestrahlten Probe nahm über 5 Wochen bis auf 0 ab. Eine Erklärung für einen derart starken Abfall der Enzymaktivität der nicht bestrahlten Proben in dieser Versuchsanordnung könnte darin liegen, daß die Proben als Laktobazillenpellets gelagert wurden, d.h. nicht in einem Puffer aufbewahrt wurden, der der Stabilisierung von Enzymen dient. Allerdings kam es in hier nicht dokumentierten Ansätzen nicht immer zu diesem schlechten Ergebnis der Lagerungsstabilität, obwohl die Lagerung immer unter gleichen Bedingungen erfolgte.

Nach einer Woche war die Enzymaktivität in der unbestrahlten Probe bereits bis auf die Hälfte des Ausgangswertes gesunken, was die Vermutung bestätigte, daß die reinen Laktobazillenpellets nicht geeignet waren, lange gelagert zu werden. Die Abnahme der Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität in den bestrahlten Proben war ab einer Strahlendosis von 15 kGy in der ersten Woche gering. Mit der Länge der

Lagerungszeit nahm die Enzymaktivität stärker ab, um nach 5 Wochen bei nur noch ca. einem Viertel der Ausgangsaktivität zu liegen.

Aus den Beobachtungen ergaben sich folgende Bedingungen, die einzuhalten waren, um eine möglichst hohe β -Galactosidase-Aktivität nach der Bestrahlung zu erhalten:

- a. kurze Bestrahlungsdauer bei hoher Intensität,
- b. kurze Lagerzeiten,
- c. kühle Lagerung bei 4 °C.

Nichtbeachtung der Bedingungen b + c führte vermutlich zu einer allmählichen Erhöhung der Permeabilität der Bakterienzellmembranen, so daß das Enzym ins Medium austrat. Das ungeschützte Enzym verliert relativ schnell seine Aktivität, zumal ebenfalls aus ihren Zellkomponenten freigesetzte Proteasen zusätzlich zur Inaktivierung beitragen können.

5.2.Laktosemenge, β -Galactosidase-Aktivität und Keimzahlen im Kot gnotobiotischer Göttinger Minischweine nach Aufnahme dreier unterschiedlich aufbereiteter Kefirdiäten

Im Versuch wurde der Einfluß von drei unterschiedlich zusammengesetzten Diäten auf der Basis von einem fermentierten Milchprodukt auf die Laktoseverdauung im Darm gnotobiotischer Göttinger Minischweinen untersucht. Der Versuch wurde erst durchgeführt, nachdem alle entscheidenden Vorbedingungen hinsichtlich der Tiere (Alter, Keimstatus) und der Diäten (β -Galactosidase-, Laktose- und Keimgehalt) überprüft und eingehalten worden waren (s. 5.1.-5.4.). Die Klärung der Frage, ob die Schweine zu allen Zeiten des laufenden Versuchs den gnotobiotischen Status behielten, war von außerordentlicher Wichtigkeit. Nur damit konnte gesichert werden, daß ein Einfluß auf die Laktoseverdauung durch andere Keime als jener, die in der Versuchsdiät befindlich waren, ausgeschlossen werden konnte. In dazu während aller Versuchsphasen durchgeführten Sterilkontrollen wurden keine den Versuch störenden Fremdkeime gefunden. Der bei einem einzelnen Schwein vor Versuchsbeginn gefundene Fremdkeim zeigte zum einen keine β -Galactosidase-Aktivität, zum anderen vermehrte er sich scheinbar nicht, denn er konnte in den folgenden Versuchsabschnitten nicht mehr nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen störte er den Versuch nicht.

Weil die Tiere in der Versuchsdiät 3 mit lebenden Laktobazillen monoassoziiert wurden, war es erforderlich diese Versuchsdiät an das Ende des Gesamtversuchs zu setzen. Nur unter dieser Voraussetzung war es möglich den Versuch an den gleichen Tieren durchzuführen, die Gabe der drei verschiedenen Diäten erfolgte nacheinander.

Nur unter solchen Voraussetzungen konnte die Bestimmung der fäkalen Laktosemenge, β -Galactosidase-Aktivität und Laktobazillen (Lebendzellzahl und Morphologie) aussagekräftige Ergebnisse erbringen. Nur bei gnotobiotischen Tieren ist es möglich, mit einfachsten Mitteln die Proben für die Bestimmung der direkten Meßparameter zu erhalten.

Ein weiteres direktes Verfahren zur Ermittlung der Höhe der Laktosehydrolyse nach Aufnahme einer laktosehaltigen Mahlzeit ist die Messung des postprandialen Plasmagalaktosespiegels. Dieses Verfahren ist viel genauer und leichter übertragbar, als die häufig angewandte Bestimmung der Wasserstoffexhalation, ein drittes Verfahren zur Bestimmung der Höhe der Laktoseverdauung. SAVAIANO et al. (1984) und LEREBOURS und SOMMERSET (1993) bemängelten den Atemwasserstofftest. Sie bezeichneten ihn als eine nur wenig exakte Methode zur Bewertung der intestinalen Laktosehydrolyse nach der Aufnahme unterschiedlich fermentierter Milchprodukte, da Menge und Zusammensetzung der ansässigen Mikroflora, der intestinale pH-Wert und die Blutzirkulation zu große Einflüsse auf den Test haben. Trotzdem wird diese Methode immer noch häufig angewandt, da sie die Probanden am wenigsten belastet.

In dieser Arbeit haben wir uns für die direkte quantitative Bestimmung der Laktosemenge im Kot der Versuchstiere entschieden, denn durch den Einsatz gnotobiotischer Göttinger Minischweine und Ratten konnte die Auswirkung der mit der Diät verabreichten mikrobiellen β -Galactosidase auf den Laktoseabbau im Darminhalt der Tiere nach Gabe von Milchprodukten direkt gemessen werden, d.h. ohne Beeinflussung durch eine vorhandene Darmflora. Das Fehlen einer Darmflora gestattet beim gnotobiotischen Tier weiterhin direkte Schlüsse darauf, ob und in welcher Menge a) die β -Galactosidase und b) die lebenden Laktobazillen die Magen-Darm-Passage ohne Schädigung überstanden haben, indem man diese Parameter direkt im Kot bestimmt. Bei konventionell gehaltenen Tieren wäre dies nicht möglich, da viele Vertreter der Darmflora selbst in der Lage sind, β -Galactosidase zu produzieren und somit die Laktose zu verwerten. Die unkomplizierte Probennahme ohne Eingriffe belastete die Tiere nicht und ermöglichte Verlaufsuntersuchungen an Einzeltieren über längere Zeiträume. Damit konnte auch in einer kleinen Versuchsgruppe, wie in dieser Arbeit, der Einfluß der individuellen Streubreite minimiert werden.

Die signifikanten Unterschiede der im Kot gemessene Laktosemenge und damit der wahren Laktoseverdaulichkeit (marker-korrigiert) zwischen Diät 1 (Sterilkefir ohne Keim und somit ohne β -Galactosidase-Aktivität) und Diät 2 (Kefir mit abgetöteten Laktobazillen mit β -Galactosidase-Aktivität) sowie zwischen Diät 1 und Diät 3 (Kefir mit lebenden Laktobazillen mit β -Galactosidase-Aktivität) zeigten deutlich, daß der Einfluß der verabreichten β -Galactosidase mit den Laktobazillen erheblich war. Die fäkale Laktosemenge unter Diät 1 war signifikant höher als unter Diät 2 oder Diät 3. Dementsprechend war die wahre, marker-korrigierte Laktoseverdaulichkeit unter Diät 1 signifikant niedriger als unter Diät 2 und 3. Die mit dem Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei den Minischweinen war nach Verzehr des Kefirs mit den inaktivierten Keimen (Diät 2) statistisch signifikant höher als nach Verzehr von von Kefir mit lebenden Keimen (Diät 3). Allerdings war der Unterschied zwischen den Laktoseausscheidungen nach Aufnahme dieser beiden Diäten nicht so groß wie zu den Ausscheidungen nach Aufnahme des Kefirs ohne den Keim (s. Abb.12). Die statistische Auswertung basiert auf den dekadischen Logarithmen + 1 der eigentlichen Ausgangsdaten, um von einer annähernd symmetrischen Verteilung der Daten ausgehen zu können. Würde man die Ausgangsdaten zur Auswertung heranziehen (s. Abb. A 1), gäbe es nur einen ganz geringen Unterschied in den Laktoseausscheidungen nach Verzehr der Diäten mit den inaktivierten zu den lebenden Keimen. Dieses

Ergebnis erhält man auch, wenn man die Laktoseverdaulichkeit betrachtet, wo nach Aufnahme dieser beiden Diäten kein statistisch abzusichernder Unterschied besteht. Abschließend kann also geschlossen werden, daß die Laktoseverwertung der Minischweine nach Aufnahme der Kefirmahlzeit ohne Keime, also somit ohne β -Galactosidase-Aktivität, geringer ist als nach Verzehr der Kefirmahlzeiten mit inaktivierten oder lebenden Laktobazillen, d.h. also den Diäten mit β -Galactosidase-Aktivität, wobei auch zwischen der Laktoseverwertung nach diesen beiden Diäten ein Unterschied besteht, der aber kleiner ist.

Die β -Galactosidase-Aktivitäten im Kot unter den verschiedenen Diäten zeigten zueinander immer statistisch signifikante Unterschiede; sie waren während der ersten Diät jeweils immer am niedrigsten und während der dritten Diät immer weitaus am höchsten.

Daß auch nach Gabe der ersten Versuchsdiät, die keine β -Galactosidase enthielt, geringste Mengen des Enzyms im Kot zu messen waren, lag vermutlich daran, daß es sich hierbei vermutlich um wirtseigenes, mukosales Enzym handelte. Auf Grund seiner geringen Menge konnte es die Versuchsergebnisse jedoch nur unerheblich beeinflussen. Die Menge der mukosalen, wirtseigenen β -Galactosidase wurde vermutlich wie schon beschrieben (s. 5.3.) besonders durch die Verabreichung von Laktose in der Diät (PERGOLIZZI et al., 1977; KOLDOVSKY et al., 1983; LEICHTER et al., 1984; GODA et al., 1984) und den gnotobiotischen Status der Schweine (ZUNFT und SCHULZE, 1991) beeinflusst.

Bei Verabreichung sterilen Kefirs (Diät 1) war die ausgeschiedene Laktosemenge im Kot hoch. Das zeigt, daß die mit der Versuchsdiät verabreichte Laktose, wegen der fehlenden β -Galactosidase-Aktivität des fermentierten Milchprodukts im Darm der Schweine nicht hydrolysiert werden konnte und diesen unverdaut passiert hat. Auch im Dickdarm konnte keine Laktosehydrolyse mehr stattfinden, da hier bei den gnotobiotischen Tieren keine Mikroorganismen vorhanden waren, die β -Galactosidasen für den Laktoseabbau hätten produzieren könnten.

Die Laktosewerte, die zur Bilanzierung herangezogen wurden, sind mit einem Fehler behaftet. Dieser mögliche Fehler konnte durch nicht auszuschließende Sammelverluste bei der Kotsammlung entstehen. Durch den Einsatz eines nicht-absorbierbaren Markers (Cr-EDTA) konnten derartige Fehler ausgeschaltet werden. Der Vergleich der Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der nicht marker-korrigierten Werte der Laktosebilanzierung mit den Ergebnissen nach Markerkorrektur ergab eine weitestgehende Übereinstimmung.

Allerdings waren die Unterschiede zwischen den Laktoseausscheidungen nach Verzehr von Kefir mit inaktivierten Laktobazillen (mit β -Galactosidase-Aktivität) statistisch signifikant höher gegenüber denen nach Verzehr von Kefir mit lebenden Laktobazillen, was sich bei der Betrachtung der Laktoseverdaulichkeit nach Verzehr dieser beiden Diäten nicht bestätigte (keine statistisch abzusichernden Unterschiede). Die Fehler durch Sammelverlust könnten eventuell einen geringen Einfluß auf das Ergebnis ausgeübt haben, der den genannten Unterschied der Ergebnisse hervorgerufen haben könnte.

Zur Verdaulichkeitsbestimmung einer Substanz mittels Marker, mußte ein solcher gewählt werden, welcher die gleiche Passagegeschwindigkeit im Darm wie die Laktose hatte. Der Marker mußte also eine Substanz sein, die ebenfalls mit der flüssigen Phase des Nahrungsbreis wanderte. Nach Vergleich der

unterschiedlichsten Marker schien Cr-EDTA, der am besten geeignete zu sein.

Im ersten Versuchsabschnitt (Diät 1) waren die fäkale β -Galactosidase-Aktivität niedrig und der fäkale Laktosegehalt hoch, dementsprechend war die Laktoseverdaulichkeit gering. Im Gegensatz dazu stieg in den folgenden beiden Versuchsperioden die fäkale β -Galactosidase-Aktivität an, in Periode 3 nochmals stärker als in Periode 2. Die oral zugeführte Laktose wurde dementsprechend zu einem erheblichen Teil durch das nun vorhandene Enzym hydrolysiert. Die Höhe der im Kot gemessenen β -Galactosidase war nicht streng umgekehrt proportional zu der gemessenen Laktose. Es konnte festgestellt werden, daß im Kot während der Gabe der lebenden Laktobazillen zum einen die Enzymaktivität höher und zum anderen die im Kot wiedergefundene Laktosemenge geringer, die über den Marker bestimmte Laktoseverdaulichkeit dagegen somit höher war als nach Versuchsdiät 2 unter Gabe von abgetöteten Laktobazillen. Allerdings waren bei der ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivität und bei der ausgeschiedenen Laktosemenge die Unterschiede statistisch signifikant, doch bei der Laktoseverdaulichkeit ließ sich, wie bereits oben gesagt, ein Unterschied zwischen Diät 2 und 3 nicht statistisch absichern. Der Unterschied könnte zum einen dadurch erklärt werden, daß die bestrahlten (inaktivierten) Laktobazillen (Diät 2) teilweise durch die Behandlung mit γ -Strahlen gelitten hatten und für die Magensäure leichter angreifbar wurden (somit auch das Enzym) (s. 5.4.), zum anderen dadurch, daß die lebenden Laktobazillen (Diät 3) gemeinsam mit der Laktose weiter in den Dickdarm transportiert wurden und dort wahrscheinlich noch in der Lage waren β -Galactosidase zu produzieren, da sie, wie die Anzucht aus dem Kot bewies, noch vermehrungsfähig waren. Dazu waren die abgetöteten Keime nicht in der Lage.

Das Ansiedlungsverhalten von Laktobazillen im Darm nach der Verabreichung lebender Keime (insbesondere mit Milchprodukten) haben schon viele Autoren untersucht, nicht nur beim Schwein, sondern gerade auch beim Menschen.

So stellten GOLDIN et al.(1992) fest, daß *Lactobacillus* GG, ein vom Menschen isolierter Laktobazillenstamm, verabreicht in einer fermentierten Milch- oder Getreidepräparation oder als gefrorenes Konzentrat, in der Lage war, sich im menschlichen Darm, nach einmaliger Gabe anzusiedeln. *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* war dem-entgegen nicht in der Lage, den menschlichen Magen-Darm-Trakt zu besiedeln und konnte nicht aus den Faeces isoliert werden (FINEGOLD et al., 1977). So wäre möglicherweise ein Laktobazillenstamm, der speziell im Verdauungskanal von Schweinen gefunden wird (PEDERSEN & TANNOCK, 1988), besser geeignet nach oraler Gabe im Magen-Darm-Trakt der gnotobiotischen Göttinger Minischweine zu verweilen als *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus*, der nachweislich nicht die Tendenz zeigte im Verdauungstrakt von Mensch oder Tier überdauern zu können (CONWAY et al., 1987). Von vielen Autoren wurde diese Wirtsspezifität beim Ansiedlungsverhalten von Laktobazillen beschrieben (FULLER, 1973; SUEGARA et al., 1975, BARROW et al., 1980; TANNOCK et al., 1982 und LIN, J. H.-C. & SAVAGE, 1984). Um also Laktobazillen eine Chance zu geben an der Darmwand zu adhären, müßte man solche Keime verwenden, die zuvor aus dem Kot der entsprechenden Tierart/bzw. Mensch isoliert worden sind, d.h. man muß die Wirtsspezifität (GOLDIN et al., 1992; FINEGOLD et al., 1977) berücksichtigen. Daß es nicht zur Besiedlung des Dünndarmes mit den Laktobazillen kam, lag sicherlich daran, daß der verwendete Stamm ein typischer Joghurtkulturkeim ist, der nicht die Tendenz zeigte sich an der Dünndarmmukosa anzulagern.

Die Mechanismen, die zur Ansiedlung führen, können ganz unterschiedlicher und vielfältiger Art sein (WADSTRÖM, 1987), wie über spezielle Oberflächenproteine der Laktobazillen (SUEGARA et al., 1975; CONWAY & KJELLEBERG 1989; SHERMAN & SAVAGE, 1986), hohe Oberflächenhydrophobizität (WADSTRÖM et al., 1987; SAVAGE, 1992) oder besondere Kohlenhydratkomponenten in der Zellwand (BARROW et al., 1980). TANNOCK (1981) stellte fest, daß Laktobazillenstämme, die nicht in der Lage waren die Epithelien des Magen-Darm-Trakts zu besiedeln, wie dies vermutlich auch bei dem mit fermentierten Milchprodukten verabreichten *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* der Fall war, sich im Gastrointestinaltrakt auch nicht etablieren konnten. Er begründete dies mit dem Phänomen der mikrobiellen Interferenz.

Allerdings ist die oben genannte Vermehrungsfähigkeit höchstens als transiente Besiedlung des Darms durch den verabreichten Laktobazillenstamm anzusehen, da die Keime nach Verabreichungsstopp recht schnell wieder aus dem Darm verschwinden, wie die untersuchten Keimzahlen während Versuchsphase 3 im Kot deutlich machten. Nachdem über 4 Tage Laktobazillen verabreicht wurden, stieg die im Kot gemessene Keimzahl nach einer Verzögerung von 2 Tagen rasch auf durchschnittlich 10^4 KbE/g Feuchtkot an. Die Verzögerung war mit der durchschnittlichen Dauer zu erklären, die die Nahrung (und somit auch verabreichte Keime) benötigte, um den Magen-Darm-Kanal zu passieren. Während einer kurzen Zwischenperiode von 4 Tagen in Versuchsphase 3, während der keine Laktobazillengabe erfolgte, sank die Keimzahl im Kot mit zwei Tagen Verzögerung langsam wieder auf 10^0 KbE/g Feuchtkot ab. In der Verdünnung von 1:10 konnten teilweise noch einzelne Kolonien beobachtet werden. Sobald Laktobazillen erneut verabreicht wurden, stieg auch wieder die Keimzahl im Kot auf Werte von durchschnittlich $10^{4.8}$ KbE/g Feuchtkot an (ebenfalls nach 2 Tagen Verzögerung). Eine dauerhafte Besiedlung mit dem verwendeten Laktobazillenstamm konnte für die Göttinger Minischweine mit diesen Daten jedenfalls nicht nachgewiesen werden, obwohl eine Behinderung durch eine bereits vorhandene Darmflora ausgeschlossen war.

Zusammenfassend zu den Untersuchungen an gnotobiotischen Göttinger Minischweinen kann gesagt werden, daß die fäkale Laktoseausscheidung durch Verabreichung von toten/inaktivierten oder lebenden β -Galactosidase-enthaltenden Laktobazillen signifikant vermindert wurde, weitestgehend unabhängig von der Viabilität der verabreichten Keime. Damit wurde das präventive und therapeutische Konzept weiter untermauert, daß oral aufgenommene, mikrobielle β -Galactosidasen zu einer Steigerung der Laktosespaltung und -metabolisierung führen.

Also kann ein Mangel an wirtseigener β -Galactosidase (Laktoseintoleranz) durch den Zusatz von β -Galactosidase produzierenden Mikroorganismen zur Nahrung (fermentierte Milchprodukte) kompensiert werden (DE VRESE, 1994; DE VRESE et al., 1992; MARTEAU et al., 1990; LEREBOURS et al., 1989; DEVIT et al., 1988; MARTINI et al., 1991a und b, 1987a; GARVIE et al., 1984; SAVAIANO et al., 1984; KOLARS et al., 1984; GILLILAND und KIM, 1984)

Aus den bislang veröffentlichten Untersuchungen ließ sich nicht ableiten, ob die Förderung der intestinalen Laktosehydrolyse und -resorption durch fermentierte Milchprodukte an das Vorhandensein lebender Keime gebunden ist. Die Tatsache, daß sogar der Verzehr von β -Galactosidase in Tablettenform zu einer verbesserten Laktoseverdauung bei Laktosemalabsorbern führte, scheint zwar dafür zu sprechen, daß lebende Keime nicht unbedingt erforderlich sind. Jedoch zeigte ein Vergleich der Effizienz einer β -Galactosidase-Tablette mit der von Joghurt mit lebenden Keimen, daß letzterer deutlich überlegen war. ONWULATA et al. (1989) zeigten, daß nach dem Verzehr von 400 ml Milch, 400 ml Milch plus β -Galactosidase-Tablette (verzehnte Enzymaktivität 756 IU) oder 454 g Joghurt (verzehnte Enzymaktivität 454 IU) innerhalb von 5 Stunden 33, 29 oder aber nur 12 ppm Wasserstoff bei einem Wasserstoff-Exhalations-Test abgeatmet wurden.

Eine Vielzahl von experimentellen Arbeiten schien deutlich zu beweisen, daß lebende Keime für eine gesteigerte Laktosehydrolyse notwendig sind. Allerdings wurden in den meisten Arbeiten fermentierte Milchprodukte mit lebenden Keimen im Vergleich zu ihren pasteurisierten Pendanten betrachtet. Die Wärmebehandlung zur Keimabtötung war meist zugleich mit irreversibler Inaktivierung der β -Galactosidase verbunden, somit blieb unklar, ob die Effekte den Unterschieden der Enzymaktivität oder der Abtötung durch die Pasteurisierung zuzuschreiben waren.

In einem anderen Versuch haben KOTZ et al. (1991) durch Zugabe freier β -Galactosidase einen Joghurt hergestellt, der eine 6-fach höhere Enzymaktivität zeigte als das Ausgangsprodukt (handelsüblicher Joghurt). Man erwartete, daß die enthaltene Laktose (20 g Laktose in 240 ml Joghurt) bei Gabe des Produkts an laktoseintolerante Personen, vollständig verdaut werden müsse. Tatsächlich wurde aber ein postprandialer Anstieg der Atemwasserstoffexhalation als Folge des Laktoseeinstroms in den Dickdarm gemessen. Also war ein großer Teil der Laktose auch nach Verabreichung dieser hohen β -Galactosidase-Aktivität nicht hydrolysiert worden. Zwar war der gemessene Anstieg der Menge abgeatmeten Wasserstoffs geringer als nach Gabe normalen Joghurts oder Milch (157 ppm x h gegenüber 256 bzw. 292 ppm x h), aber die erwartete große Wirkung blieb aus. Daraus schlossen die Autoren, daß die zusätzliche extrazelluläre β -Galactosidase während der Magenpassage inaktiviert worden sei und somit lebensfähige Mikroorganismen im fermentierten Milchprodukt notwendig wären, um eine gute Verträglichkeit bei laktoseintoleranten Personen zu gewährleisten. MARTINI et al. (1987 b) fanden analog dazu, daß in vitro in ultraschallbehandelten Joghurtproben die β -Galactosidase-Aktivität bei Ansäuerung auf pH-Werte (4,0), wie sie im Magen nach Joghurtverzehr gemessen wurden, stark abnahm, was bei gleichartiger Ansäuerung von nicht behandelten Proben nicht festzustellen war.

Alle bisherigen Arbeiten konnten keine eindeutige Antwort auf die Frage geben, ob lebende Laktobazillen gegenüber abgetöteten einen stärkeren Effekt auf die intestinale Laktosehydrolyse bei Laktosemalabsorbern haben. Die vorliegende Arbeit konnte mit den Ergebnissen etwas mehr Klarheit schaffen. Eine größere Wirksamkeit lebender gegenüber abgetöteter Laktobazillen, deutete sich in den unterschiedlichen Laktoseausscheidungen nach der Gabe der entsprechenden Diäten an (ein statistisch signifikanter Unterschied), konnte aber nicht bestätigt werden nach Betrachtung der Laktoseverdaulichkeit nach Gabe der beiden Diäten (kein statistisch signifikanter Unterschied).

Es konnte die Feststellung gemacht werden, daß der Einsatz viabler Keime etwas vorteilhafter für die Erzielung des gewünschten Effektes, nämlich gesteigerter Laktoseverwertung im Versuchstier war, als der Einsatz durch Bestrahlung inaktivierter Keime. Bei dem Milchprodukt mit abgetöteten Laktobazillen war bereits innerhalb weniger Tage ein stärkerer Abfall der Aktivität der β -Galactosidase zu verzeichnen, als bei dem Milchprodukt mit viablen Keimen. Die abgetöteten Laktobazillen wiesen eine geringere Lagerstabilität der β -Galactosidase auf, was auch Untersuchungen zur Lagerstabilität von Laktobazillen von DE VRESE (1992) zeigten.

Erklären ließ sich die geringere Lagerstabilität der β -Galactosidase abgetöteter Laktobazillen am ehesten durch eine allmähliche Lyse der Zellen und einen Austritt der β -Galactosidase mit nachfolgender Inaktivierung. Dies tritt bei einem fermentierten Milchprodukt mit abgetöteten Laktobazillen schneller ein als bei einem nativen Milchprodukt. Ein Produkt mit lebenden Keimen ist folglich wegen der höheren Lagerstabilität besser für eine praktische Anwendung geeignet.

Abschließend kann geschlußfolgert werden:

Die Viabilität der Laktobazillen in fermentierten Milchprodukten ist zwar für die Förderung der Laktoseverdauung nicht unbedingt erforderlich, wohl aber vermutlich das Vorhandensein einer intakten Zellhülle als mechanischer Schutz der intrazellulären β -Galactosidase während der Magenpassage. Die Effizienz des fermentierten Milchprodukts wird dadurch gesteigert.

5.3. Laktosemenge, β -Galactosidase-Aktivität und Keimzahlen im Kot gnotobiotischer Ratten nach Aufnahme dreier unterschiedlich aufbereiteter Kefirdiäten

Die Ergebnisse, die dieser Versuch erbrachte, deckten sich mit denen aus dem Versuch mit den gnotobiotischen Göttinger Minischweinen. Beide Versuche wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wobei die Sammlung der Kotproben bei den Ratten aufgrund der wirksameren Stoffwechselfähigkeit vollkommener war. Daher konnte auf Einsatz des Markers Cr-EDTA für die Bestimmung der Verdaulichkeit der Laktose verzichtet werden.

Auch bei den Ratten war die ausgeschiedene Laktosemenge mit $2,5 \pm 0,4$ g/Tag im ersten Versuchsteil unter der Diät 1, Sterilkefir ohne Laktobazillen (ohne β -Galactosidase) am höchsten, gegenüber $1,3 \pm 0,2$ g Laktose/Tag im zweiten Versuchsteil nach Gabe von Sterilkefir mit abgetöteten Laktobazillen und $0,78 \pm 0,13$ g Laktose/Tag im dritten Versuchsteil nach Gabe von Kefir mit lebenden Laktobazillen. Der Unterschied war, wie bei den Schweinen, statistisch signifikant. Der Unterschied zwischen den Ausscheidungen nach Verzehr den beiden Diäten mit Laktobazillen (lebend bzw. abgetötet) mit β -Galactosidase-Aktivität war, wie bei den Schweinen ebenfalls statistisch signifikant, die im Kot

gefundene Laktosemenge nach Aufnahme von Kefir mit inaktivierten Laktobazillen war statistisch signifikant höher als die nach Aufnahme von Kefir mit lebenden Laktobazillen. Allerdings war der Unterschied der durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedenen Laktosemengen, genau wie bei den Minischweinen, zwischen den Diäten mit den abgetöteten bzw. lebenden Laktobazillen (Diät 2 und 3) etwas geringer als dieser beiden Diäten zu der Diät (Diät 1) ohne Laktobazillen. Zu diesen Ergebnissen kam man, nachdem die Daten auf der Basis des dekadischen Logarithmus + 1 ausgewertet worden sind und zusätzlich ein besonders bei Ratte 1 unter der Diät 3 (s. Einzelwerte im Anhang in der Tabelle 27) herausfallender Wert (12,82 g Laktose/Tag) zurückgenommen wurde. Wird dieser Wert hingegen in die Auswertung einbezogen, so gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Laktoseausscheidungen nach Verzehr der Diäten 2 und 3 mehr. Es war nicht abzuklären, warum es zu einer derart hohen Laktoseausscheidung bei dem einen Tier kam.

Allgemein kann man davon ausgehen, auch nach Vergleich mit den Ergebnissen beim Minischwein, daß die fäkale Laktoseausscheidung durch Verabreichung von inaktivierten oder lebenden β -Galactosidase-enthaltenden Laktobazillen signifikant vermindert wurde; also wurde das Konzept untermauert, daß oral aufgenommene mikrobielle β -Galactosidasen zu einer Steigerung der Laktosespaltung und -metabolisierung führen. Die größere Wirksamkeit lebender gegenüber inaktivierter/abgetöteter Laktobazillen deutete sich zwar in den unterschiedlichen Laktoseausscheidungen der Ratten (und auch der Minischweine) nach Aufnahme der entsprechenden Diäten an, ließ sich letztendlich aber aus oben genannten Gründen nicht absolut eindeutig absichern, obwohl die Statistik signifikante Unterschiede lieferte.

Ähnliche Verhältnisse wie beim Minischwein wurden auch bei der täglichen, von den Ratten mit dem Kot ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivität gefunden. Unter der ersten Diät ohne Laktobazillen lag diese ebenfalls nahe null, genau wie bei den Göttinger Minischweinen. Anders als bei den Schweinen war nach Verzehr der zweiten Diät mit abgetöteten Laktobazillen, kaum Enzymaktivität im Kot zu bestimmen (logarithmierte und transformierte Werte ohne Klammern und Ausgangsdaten, also nicht logarithmierte, nicht transformierte Werte in Klammern): $0,42 \pm 0,3$ ($2 \pm 0,6$) IU/Tag extrazelluläre bzw. $0,42 \pm 0,3$ ($2,3 \pm 0,6$) IU/Tag Gesamt-Enzymaktivität). Eine enorm hohe β -Galactosidase-Aktivität mit $1,88 \pm 0,31$ (90 ± 11) IU/Tag extrazellulär, oder $2,14 \pm 0,4$ (181 ± 27) IU/Tag gesamt, war dagegen nach Verzehr von lebenden Laktobazillen im Rattenkot zu verzeichnen. Damit konnten die beim Schwein gefundenen statistisch signifikanten Unterschiede der ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivität zwischen Diät 1 und 3 bestätigt werden. Auch die fäkale β -Galactosidase-Aktivität nach Verzehr des Kefir mit inaktivierten Laktobazillen war statistisch signifikant geringer als nach Verzehr des Kefirs mit lebenden Laktobazillen.

Warum derart große Unterschiede der ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivitäten bei Schweine und Ratte bestanden, obwohl die verabreichten Enzymaktivitäten ebenso, wie die Laktosemengen, bezogen auf die verzehrte Diätenmenge identisch waren, konnte nicht geklärt werden.

Einen Ansatz für eine mögliche Erklärung bietet die Betrachtung der Keimzahlen der Laktobazillen im Kot unter der dritten Diät mit den lebenden Keimen. Durchschnittlich wurden bei den Ratten etwa $10^{7.6}$ KbE/g Feuchtkot gefunden und bei den Schweinen dagegen nur $10^{4.8}$ KbE/g Feuchtkot. Eine höhere Zahl an Keimen pro g Kot ließ auch eine größere Enzymmenge und damit eine höhere Aktivität erwarten.

Die Unterschiede der β -Galactosidase-Aktivität spiegelten sich jedoch bei der ausgeschiedenen Laktosemenge im Kot nur tendenziell wieder. In dieser Hinsicht waren die Ergebnisse der Versuche mit beiden Tierarten durchaus direkt miteinander vergleichbar.

Mit den im Rattenversuch erzielten Ergebnissen konnten die bei den Schweinen gesammelten Ergebnisse untermauert werden. Zusätzlich wurde auf diese Weise gezeigt, daß sich auch Ratten als Tiermodell für den gewählten Versuchsaufbau eignen. Angesichts der gleichen Ergebnisse bei zwei unterschiedlichen Tiermodellen ist es so wahrscheinlicher, daß die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Laktosemalabsorber gegeben ist.

6. Zusammenfassung

Die weltweit häufigste Ursache für Milchunverträglichkeit ist der Mangel an intestinaler β -Galactosidase, wodurch es zur Laktosemalabsorption kommt. Viele Untersuchungen belegen, daß fermentierte Milchprodukte aufgrund ihres Gehalts an mikrobiellen β -Galactosidasen von Laktosemalabsorbern sehr viel besser vertragen als unfermentierte Milch.

Ziel der Arbeit war es zur Klärung der Frage beizutragen, ob die intestinale Laktosehydrolyse (mit anschließender Absorption der Spaltprodukte) durch die mikrobiellen β -Galactosidasen aus fermentierten Milchprodukten an die Präsenz *lebender* Keime im Produkt gebunden ist und ob diese mit dem Milchprodukt zugeführten Keime in der Lage sind sich im Magen-Darm-Trakt anzusiedeln.

Zu diesem Zweck wurden Fütterungsversuche an gnotobiotischen Göttinger Minischweinen und gnotobiotischen Ratten durchgeführt, mit denen der Einfluß von abgetöteten gegenüber lebenden Laktobazillen (jeweils mit gleichen Enzymaktivitäten) im fermentierten Milchprodukt auf die Laktosehydrolyse untersucht wurde. Dem wurde zum Vergleich eine Diät ohne Keime, folglich ohne β -Galactosidase-Aktivität, gegenüber gestellt.

In Vorversuchen wurden des Wachstumsverhalten und die Reinheit des verwendeten Laktobazillen-Stammes, der Einfluß der Magenpassage *in vitro* und der Lagerungsdauer auf die Laktobazillen und die Aktivität der in ihnen enthaltene β -Galactosidase sowie Höhe der intestinalen β -Galactosidase-Aktivität in unterschiedlichen Dünndarmabschnitten der Versuchstiere untersucht.

Im Hauptversuch erhielten jeweils 6 Tiere beider Tierarten nacheinander 3 unterschiedliche Diäten fermentierten Milchprodukts, deren Laktosegehalt aber identisch war (40 g/l), über jeweils 2 Wochen hinweg. In der ersten Diät waren keine Laktobazillen enthalten, die zweite Diät enthielt mit γ -Strahlen abgetötete und die dritte Diät lebende Laktobazillen. Die beiden letzteren Diäten enthielten jeweils gleiche β -Galactosidase-Aktivitäten (ca. 400 IU/l), in der ersten Diät war keine Aktivität zu vorhanden. Zusätzlich zu den Versuchsdiäten erhielten die Tiere entweder eine semi-synthetische Diät (Schweine) oder ein Pelletfutter (Ratten), um den täglichen Energie- und Nährstoffbedarf der Tiere zu decken. Dieses Zusatzfutter wurde auch für jeweils zwei Tage zwischen den einzelnen Diäten verabreicht.

Der Einfluß dieser drei Diäten auf die intestinale Laktosehydrolyse wurde in beiden Tierarten durch die orofäkale Laktosebilanzierung ermittelt, im Fall des Schweineversuchs, zusätzlich korregiert mit Werten eines nicht resorbierbaren Markers. Neben der Laktosebilanz wurde eine orofäkale β -Galactosidasebilanz erhoben. Um das Adhäsionsverhalten festzustellen wurde während der dritten Versuchsdiät mit den

lebenden Keimen nach drei Tagen für insgesamt vier Tage mit der Keimgabe ausgesetzt, danach erfolgte die Keimgabe über weitere 7 Tage. Während der gesamten Periode wurden die Keimzahlen im Kot der Tiere bestimmt, um eventuelle Unterschiede zu ermitteln.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Die mit dem Kot ausgeschiedene Laktosemenge war sowohl bei den Schweinen als auch bei den Ratten während der ersten Versuchsdiät hoch und sank unter den beiden folgenden Versuchsdiäten stark ab. Zwischen den Laktosemengen im Kot unter Diät 2 verglichen mit Diät 3 waren, ebenso wie jeweils zu Diät 1, statistisch signifikante Unterschiede zu finden, die aber etwas geringer waren als die beider Diäten (3 und 2) zu Diät 1. Dieses Ergebnis bei den Schweinen wurde auch nach Bezug auf die Markerwerte nicht verändert. Es zeigte sich, daß die Verdaulichkeit der Laktose in Diät 1 wesentlich geringer war als in Diät 2 und 3. Die Laktoseverdaulichkeit von Gruppe 2 und 3 war nicht signifikant unterschiedlich.
- Gegensätzlich zur Laktose verhielt sich die im Kot nachweisbare β -Galactosidase-Aktivität. Während Diät 1 wurden geringste Mengen bis gar keine β -Galactosidase-Aktivität gemessen, unter Diät 2 stieg sie an, um während Diät 3 den höchsten Wert zu erreichen. Die Unterschiede aller drei Diäten zueinander waren statistisch signifikant.
- Der verabreichte Laktobazillenstamm war nicht in der Lage sich im Dünndarm der gnotobiotischen Minischweine und Ratten dauerhaft zu etablieren, er verschwand nach Aussetzen der oralen Zufuhr innerhalb von Tagen, d.h. der Transitzeit entsprechend, wieder aus dem Darm.

Aus diesen Ergebnissen konnte folgender Schluß gezogen werden:

Die intestinale Laktosehydrolyse nach Aufnahme von fermentierten Milchprodukten war dann am höchsten, wenn mit der Diät mikrobielle β -Galactosidase aufgenommen wurde, dabei machte es nur einen geringen Unterschied, ob die Laktobazillen lebten oder abgetötet waren; die intestinale Laktosehydrolyse war unter der Diät mit lebenden Laktobazillen etwas höher als unter der Diät mit den abgetöteten. Wesentlich war, daß das Enzym, geschützt durch die Hülle der Laktobazillen, die Magenpassage überstehen konnte, ohne durch Magensäure und Proteasen zerstört zu werden. Dies wurde deutlich in in vitro Versuchen zur Prüfung des Überstehens der Magenpassage gezeigt. Diesen Schutz bieten mit γ -Strahlen behandelte (abgetötete) Laktobazillen fast genauso gut wie lebende Laktobazillen. Solange die Zellmembran der Keime intakt ist, ist es für die Förderung der intestinalen Laktosehydrolyse nicht essentiell, daß die Keime viabel sind.

Investigations to determine whether viable microorganisms are required during intestinal lactose hydrolysis of fermented milk products by microbial β -galactosidase using gnotobiotic Göttingen minipigs

Summary

The most common reason worldwide for the indigestibility of milk is the lack of β -galactosidases in the small intestine, leading to the malabsorption of lactose. Fermented dairy products are very often much better tolerated than raw (not fermented) milk, because of the microbial β -galactosidases they contain.

The aim of this thesis was to elucidate the question as to whether lactose hydrolysis in the small intestine requires the presence of living bacteria (with their microbial β -galactosidases) in fermented dairy products and whether the bacteria of these dairy products are able to colonize the gut.

To this end several feeding experiments with gnotobiotic Göttingen Minipigs and gnotobiotic rats were carried out to investigate the influence of killed versus living bacteria in fermented dairy products. A bacteria-free diet without β -galactosidase activity was fed as a control.

In preliminary experiments the growth and the purity of the lactobacillus-strain were examined. In addition, the influence of the passage through the stomach on β -galactosidase activity was tested as well as effects of the storage of lactobacilli on the β -galactosidase activity. In another preliminary experiment the intestinal β -galactosidase activity of the pigs and rats was investigated in different parts of the small intestine.

In the main experiment six animals of both species were fed sequentially (over a period of two weeks) with three different fermented dairy product-diets each having an identical lactose content (40g/l). The first diet contained no lactobacilli, the second diet contained lactobacilli, which had been killed by γ -rays and the third diet contained living lactobacilli. In the first diet there was no β -galactosidase activity, whereas both the second and the third diet possessed the same β -galactosidase activity (400 IU/l). The experimental diets were supplemented with another feed to cover the energy and nutrient requirements. This additional feed was given between the different diets for two days.

The influence of these three diets on the lactose hydrolysis in the intestine was investigated by comparing the relationship between the lactose which was eaten and that which was defecated. In the porcine model system the data were corrected with a marker which could not be absorbed in the intestine. In addition to the lactose relationship that of the β -galactosidase was also determined. During the third diet, which contained viable bacterial cultures, the dose of the bacteria was stopped for four days after an initial

period of including them for three days, in order to find out if the bacteria could adhere to the intestine. After the break, viable cultures were once more included in the diet for another seven days. Throughout the entire period, the number of bacteria was determined in the feces of the animals to document possible differences.

The results were as follows:

- The quantity of lactose which was eliminated in the feces was high during the first diet, in both the rodent and the porcine systems, and dropped significantly in both of the subsequent diets. The differences between the fecal lactose content of diet two and three and diet two and one were statistically significant. However the former was more pronounced than the latter. The same results were found after comparison of the data after marker correction. It was shown that the digestibility of the lactose under the first diet was much lower than under the second and third diet. The lactose digestibility between diet two and three was not found to be statistically significantly different.
- In contrast to the data for lactose, the β -galactosidase activity data showed differences. Under diet one very low amounts of the β -galactosidase activity could be measured. Under diet two the activity rose and reached the maximum level under diet three. The differences between all three diets were statistically significant.
- The lactobacillus strain used was unable to colonize the small intestine of the Göttingen Minipigs and the rats for any length of time. After stopping the dose per os, the bacteria disappeared from the gut after several days corresponding to the transit time.

The following conclusions could be drawn from the experiments presented in this thesis:

The intestinal lactose hydrolysis after eating fermented dairy products was highest where microbial β -galactosidase was presented in the diet. There was not a great difference if the bacteria were viable or non-viable; the intestinal lactose hydrolysis was a little bit higher under the diet with the viable lactobacilli compared to those under the diet with the non-viable bacteria. However it was important for the survival of the enzyme during the passage through the stomach that it be protected by the cell wall of the lactobacilli. As it would otherwise be destroyed by the acid and proteases in the stomach. This was shown by in vitro experiments. Nearly the same level of protection was given by the γ -ray-inactivated bacteria as by the living lactobacilli. As long as the membrane of the cells were intact it was not essential for lactose hydrolysis that the bacteria were viable.

7. Literaturverzeichnis

ALM, L. 1982: Effect on fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *J. Dairy Sci.* 65: 346-352.

AROLA, H. & TAMM, A. 1994: Metabolism of lactose in the human body. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 29: Suppl. 202, 21-25.

ASP, N.G. et al. 1970a: Rat small-intestinal β -galactosidases. *Biochem. J.* 117: 369-375.

ASP, N.G. et al. 1970b: Human small-intestinal β -galactosidases. *Biochem. J.* 121: 299-308.

ASP, N.G., BERG, N. O., DAHLQVIST, A., JUSSILA, J., SALMI, H. 1971: The activity of three different small intestinal β -galactosidases in adults with and without lactase deficiency. *Scan. J. Gastr.* 6: 755-762.

ASP, N.G., DAHLQVIST, A. 1974: Intestinal β -galactosidases in adult low lactase activity and congenital lactase activity. *Enzymes* 18: 84-102.

ASP, N.G., DAHLQVIST, A., KOLDOVSKY, O. 1969: Human Small-Intestinal β -Galactosidases. *Biochem. J.* 114: 351-359.

AUMAITRE, A., CORRING, T. 1978: Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. II. Intestine and intestinal disaccharidases. *Nutr. Metabol.* 22: 244-255.

AURICCHIO, S., RUBINO, A., LANDOLT, M., SEMENZA, G., PRADER, A. 1963: Isolated intestinal lactase deficiency in the adult. *Lancet* i. 324-326.

AURICCHIO, S., MAURI, L. 1993: Cellular Basis of Adult-Type Hypoplasia. *Common Food Intolerance 2: Dyn. Nutr. Res. Basel, Karger, vol3: 93-101.*

BANZET, N., HEIBER_LANGER, I., SALDANA, J.-L., LEMAY, P., BALNY, C. 1992: Pressure and

temperature effect on activity and stability of *E. coli* β -Galactosidase. *High Pressure and Biotechnology* 224: 179-181.

BAILEY, C.B., KITTS, W.D., WOOD, A.J. 1956: The development of digestive system of the pig during its pre-weaning phase of growth. B. Intestinal lactase, sucrase and maltase. *Can. J. Animal Sci.* 36: 51-58.

BARROW, P. A., BROOKER, B. E., FULLER, R. & NEWPORT, M. J. 1980: The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 48: 147-150.

BECKER, D. E., ULLREY, D. E. & TERRILL, S. W. 1954: A Comparison of Carbohydrates in a Synthetic Milk Diet for the Baby Pig. *Archs. Biochem. Biophys.* 48: 178.

BESNIER, M. O., BOURLIOUX, P., FOURNIAT, J., DUCLUZEAU, R., AUMAITRE, A. 1983: Influence de l'ingestion de yogourt sur l'activite lactasique intestinale chez des souris axeniques ou holoxeniques. *Ann. Microbiol.* 134 A: 219-230.

BLACK, R. E., LEVINE, M. M., CLEMENTS, L., LOSONSKY, G., HERRINGTON, D., BERMAN, S. & FORMAL, S. 1987. Prevention of shigellosis by a *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* bivalent vaccine. *J. Infect. Diseases* 155: 1260-1265

BRAND, M. & KÜHN, I. 1987: Photometrische Bestimmung von Cr-EDTA als Cr-Diphenylkarbazon-Komplex im Darminhalt und Kot nach Kjeldahlaufschluß. *Arch. Anim. Nutr.* 37: 452-453.

BRENNER, D. J., HALL, E. J., RANDERS-PEHRSON, G., MILLER, R. C. 1993: Mechanistic considerations on the dose-rate/LET dependence of oncogenic transformation by ionizing radiations. *Radiat. Res.* 3: 365-369.

BROOKER, B. E. und FULLER, R. 1975: Adhesion of Lactobacilli to the Chicken Crop Epithelium. *J. Ultrastruc. Arch.* 52: 21-31.

BUCHANAN, R. E., GIBBON, J. E. (Hrsg.) 1993: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9.

Auflage Williams und Wilkins, Baltimore.

BÜLLER, H.A., VAN WASSENAER, A.G., RAGHAVAN, S., MONTGOMERY, R.K., SYBICHI, M. A. 1989: New insights into lactase and glycosylceramidase activities of rat lactase-phloizin hydrolase. *Am. J. Physiol.* 257: G616-G623.

BÜLLER, H. A. und GRAND, R. J. 1990: Lactose intolerance. *Annu. Rev. Med.* 41: 141-148.

BUTS, J.-P., BERNASCONI, P., VAN CRAYNEST, M.-P., MALDAGUE, P., DE MEYER, R. 1986: Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatric Res.* 20: 192-196.

CANTEY, J. R. 1987 Prevention of bacterial infections of mucosal surfaces by immuneseecretory IgA. *Secretory Immunity and Infection* pp. 461-470 (Eds J. R. McGhee, J. Mestecky and J. L. Babb). New York: Plenum Press (Advances in Experimental Medicine and Biology 107).

CARLSON, P. & BRATTHALL, D. 1985. Secretory and serum antibodies against *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in relation to ingestion of fermented milk products. *Acta Otoloto. Scand.* 43: 147-153.

CHATEAU, N., DESCHAMPS, A. M., SASSI, H. 1994: Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 42-44.

CHAUVIÈRE, G., COCONNIER, M.-H., KERNEIS, S., FOURNIAT, J., SERVIN, A. L. 1992: Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Mikrobiol.* 138: 1689-1696.

COATES, M. E., FULLER, R., HARRISON, G. F., LEV, M., SUFFOLK, S. F. 1963: Germ-free chicks. *Brit. J. Nutr.* 17: 141.

COCONNIER, M.-H., KLAENHAMMER, T. R., KERNEIS, S., BERNET, M.-F., SERVIN, A. 1992: Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* Juni: 2034-2039.

- COLLINGTON, G. K., PARKER, D. S., ARMSTRONG, D. G.: The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of the digestive enzyme activity in the pig. *Brit. J. Nutr.* 64: 59-70.
- CONWAY, P. L., JOUPER_JAAN, A., KJELLEBERG, S. 1985: Protein mediated adhesion to mouse stomach tissues. *Abstr. Annu. Meet. Am. Socie. Microbiol.* I 74: 158.
- CONWAY, P. L., GORBACH, S. L. & GOLDIN, B. R. 1987: Survival of Lactic Acid Bacteria in the Human Stomach and Adhesion to Intestinal Cells. *J. Dairy Sci.* 70: 1-12
- CONWAY, P. L. und KJELLEBERG, S. 1989: Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to the mouse stomach squamous epithelium. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1175-1186.
- CULLIS, P. M., ELSY, D., FAN, S., SYMONS, M. C. 1993: Marked effect of buffers on yield of single- and double-strand breaks in DNA irradiated at room temperature and at 77 K. *Int. J. Radiat. Biol.* 63 (2): 161-165.
- CUMMINGS, J. H., JENKINS, D. J. A. & WIGGINS, H.S. 1976: Measurement of the mean transit time of dietary residue through the human gut. *Gut* 17: 210-218.
- DAHLQVIST, A. 1961: Intestinal carbohydrases of a new-born pig. *Nature* 190, 31-32.
- DAHLQVIST, A., HAMMOND, J. B., CRANE, R. K., DUNPHY, J. V., LITTMANN, A. 1963: Intestinal lactase deficiency and lactose intolerance in adults. *Gastroenterology* 45: 488-491.
- DAHLQVIST, A. 1984a: Lactose intolerance. *Nutr. Abst. Rev. Clin. Nutr.* 54: 8, 649-658.
- DAHLQVIST, A. 1984b: β -Galactosidase (lactase). In *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 4, pp. 227-230 [H. U. Bergmeyer, editor]. Weinheim: Verlag Chemie.
- DALY, C. 1992: Probiotics, Fact or Fiction: Lactic Acid Bacteria and Milk Fermentations aus *SCI Biotech. Group Meeting*: 544-548.

- DALY, M. J., OUYANG, L., FUCHS, P., MINTON, K. W. 1994: In vivo damage and recA-dependant repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. J. Bacteriol. 12: 3508-3517.
- DANIELS, E. M. 1990: Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Dimerization of aminopeptidase N and lactase-phlorizin hydrolase. Biochemistry 29: 305-308.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. 1960: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23: 130-135.
- DE SIMONE, C. 1986. Microflora, yogurt and the immune system. Int. J. Immunotherapy, suppl. 11: 19-23
- DEWIT, O., POCHART, P. & DESJEUX, J. T. 1988: Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yoghurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. Nutrition 4: 131-135.
- DE VRESE, M., KELLER, B., BARTH, C. A. 1992: Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase of kefir. Brit. J. Nutr. 67: 67-75.
- DE VRESE, M. 1992: Lagerungsstabilität der mikrobiellen β -Galactosidase in Joghurt. Dmz 20: 574-578.
- DE VRESE, M. 1994: Ernährungsphysiologische und gesundheitliche Bedeutung von lebenden Keimen in fermentierten Milchprodukten. Deutsche Milchwirtschaft 45/19: 884-889.
- DEWITT, O., POCHART, P., DESJEUX, J.-F. 1988: Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after laktose, milk, fresh or heated yogurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. Nutrition 4: 131-135.
- DOWNS, A. M., MCDONALD, I. W. 1964: The chromium-51 complex of ethylene-diamine tetraacetic acid as soluble rumen marker. Brit. J. Nutr. 18: 153-162.

DRING, L. G. 1987: Methods for Studying Metabolism and Distribution in vivo of Radiolabelled Drugs. Biochem. toxic. - a practical approach, SMELL, K., MULLOCK, B. (eds.) IRL Press, Oxford, Washington; 3-21.

ENGLYST, H. N. und KLINGMAN, S. M 1990: Classification of dietary starch into categories of specific physiological importance. In *Dietary Fiber*, ed. D. Krichevsky, C. Bonfield, J. W. Anderson, pp. 49-65, New York: Plenum Press.

ERGEBNISBERICHT ZUM FORSCHUNGSPROJEKT VO (EWG) NR. 1116/92 VOM 30.04.1992: Prüfung der Essentialität lebender Keime für die Förderung der intestinalen Laktosehydrolyse durch die mikrobielle β -Galactosidase fermentierter Milchprodukte. Bundesanstalt für Milchforschung Kiel, Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung.

ESCHER, J. C., DE KONING, N. D., VAN ENGEN, C. G. J., ARORA, S., BÜLLER, H. A., MONTGOMERY, R. K., GRAND, R. J. 1992: Molecular basis of lactase level in adult human. J. Clin. Invest. 89: 480-483.

EWING; D., DAMSKER, K. E. 1995: Hydroxyl radicals and DNA double-strand breaks in X-irradiated E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 207 (3): 957-962.

FARROW, J. A. E. und GARVIE, E. L. 1979: Strains of streptococcus-lactis which contains β -Galactosidase EC-3.2.1.23 J. Dairy Res. 46: 121-126.

FEIG, D. I., SOWERS, L. C., LOEB, L. A. 1994: Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(14): 6609-6613.

FICKLER, G. & LEITZMANN, C. 1980: Laktose-Intoleranz und ihre Bedeutung für Entwicklungsländer. Ernährungs-Umschau 12: 394-398.

FINEGOLD, S.M., SUTTER, V. L., SUGIHARA, P. T., ELDER, A. H., LEHMANN, L. V. N. & PHILLIPS, R. L. 1977: Fecal microbial flora in Seventh day adventists populations and control subjects. Am. J. Clin. Nutr. 30: 1781-1792.

- FLATZ, G. und ROTTHAUWE, H. W. 1973: Lactose nutrition and natural selection. *Lancet* 1: 76-77.
- FRANCHET-BEUZIT, J., SPOTHEIM-MAURIZOT, M., SABATTIER, R., BLAZY-BAUDRAS, B., CHARLIER, M. 1993: Radiolytic footprinting. Beta rays, gamma photons, and fast neutrons probe DNA-protein interactions. *Biochemistry* 32: 2104-2110.
- FREUND, J.-N., DULUC, I., RAUL, F. 1989: Discrepancy between the intestinal lactase enzymatic activity and mRNA accumulation in sucklings and adults. *FEBS Letters* 284: 1,2, 39-42.
- FREUND, J.-N., DULUC, I., RAUL, F. 1991: Lactase expression in controlled differently in the jejunum and ileum during development in rats. *Gastroenterology* 100: 388-394.
- FREY, M. 1990: Ausländerpolitik in Europa, in: *Ausländer in der Bundesrepublik Deutschland*, Deutsche Gesellschaft für Bevölkerungswissenschaft, 24. Arbeitstagung, Schriftenreihe des Bundesinstituts für Bevölkerungswissenschaft, Bd. 20: 121-147. Hrsg. C. Höhn, D.B. Rein, Wiesbaden.
- FULLER, R. 1973: Ecological studies on the lactobacillus flora associated with the crop epithelium of the bowl. *J. Appl. Bacteriol.* 36: 131-139.
- FULLER, R. 1991: Probiotics in human medicine. *Gut* 32: 439-442.
- GALLAGHER, C. R., MOLLESON, A. L., CALDWELL, J. H. 1974: Lactose intolerance and fermented dairy products. *J. Am. Diet. Assoc.* 65: 418.
- GARZA, C. & SCRIMSHAW, N. S. (1976): Relationship of lactose intolerance to milk intolerance in young children. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 192-196.
- GARVIE, E. I., COLE, C. B., FULLER, R. & HEWITT, D. 1984: The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and on the metabolism of lactose in the rat. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 237-245.

GEDEK, B. R. 1991: Regulierung der Darmflora über die Nahrung. Zbl. Hyg. 191: 277-301.

GILLILAND, S. E. und KIM, H. S. 1984: Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. J. Dairy Sci. 67: 1-6.

GILLILAND, S. E. und STANLEY, T. E. 1984: Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67: 3045-3051.

GODA, T., BUSTAMANTE, S., THORNBURG, W., KOLDOVSKY, O. 1984: Dietary-induced increase in lactase activity and in immunoreactive lactase in adult rat jejunum. Biochem. J. 221: 261-263.

GODA, T., QUARONI, A., KOLDOVSKY, O. 1988: Characterisation of degradation of sucrase-isomaltase in rat jejunum with monoclonal-antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. Biochem. J. 250: 41-46.

GOODENOUGH, E. R. und KLEYN, D. H. 1976: Influence of viable yogurt microflora on digestion of lactose by the rat. J. Dairy Sci. 59: 601-606.

GOLDIN, B. R. 1990: Intestinal Microflora: Metabolism of Drugs and Carcinogens. Ann. Med. 22: 43-48.

GOLDIN, B. R., GORBACH, S. L., SAXELIN, M., BARAKAT, S., GUALTIERI, L. & SALMINEN, S. 1992: Survival of *Lactobacillus* Species (Strain GG) in Human Gastrointestinal Tract. Digest. Diseases Sci. 1: 121-128.

GREENBERG, N. A. und MAHONEY, R. R. 1982: Production and characterization of β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. J. Food Sci. 47: 1824.

GURR, M. I. 1991: Health benefits of cultured and culture-containing milks. BNF Nutr. Bull. 16: 73-82.

GUSTAFSSON, B.E. 1959: germfree animals, symposium at the IV. international congress for microbiology. In: recent progress in microbiology (Ed.: Tunevall, G.). Almquist & Wiksell, Stockholm, 259-368.

- HAENEL, H. und GRÜTTE, F.-K. 1984: Stoffwechselprozesse der Darmflora. Die Nahrung 28: 647-657.
- HARTLEY, D. L. und DENARIAZ, G. 1993: The Role of lactic acid bacteria in yogurt fermentation. Int. J. Immunotherapy IX (1): 3-17.
- HARTMANN, P.A. 1961: Digestive enzyme development in the young pig. J. Animal Sci. 20: 114-123.
- HENRIKSSON, A., SEZWZYK, R., CONWAY, P. L. 1991: Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. Appl. Environ. Microbiol. 57: 499-502.
- HESTRIN, S., FEINGOLD, P. S. und SCHWAMM, M. 1955: β -Galactosidase (lactase) from *Escherichia coli*. In *Methods in Enzymology*, vol. 1, pp. 241-248 [S. P. Colowick and N. O. Kaplan, editors]. New York: Academic Press.
- HIROTA, T. 1987: Microbiological studies on kefir grains. Rep. Res. Lab., Snow Brand, Tokyo. 84: 67-107.
- HOOD, S. K., ZOTTOLA, E. A. 1988: Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. J. Food Sci. 53: 1514-1516.
- HOSE, H. & SOZZI, T. Probiotics, Fact or Fiction aus SCI Biotech. Group Meeting: 540-544.
- HOURIGAN, J. A. 1984: Nutritional Implication of Lactose. Aust. J. Dairy Technol., 114-119.
- HYDEN, S. 1955: A turbimetric method for the determination of higher polyethylene glycolsin biological material. Kungl. Lanthe. Högsk Ann. 22: 139-145.
- IKURA, Y., HORIKOSHI, K. 1959: β -Galactosidase. Agric. Biol. Chem. 43: 1359.

- ITO, M. und KIMURA, M. 1993: Influence of lactose on faecal microflora in lactose maldigestors. *Microb. Ecol. In Health and Disease* 6: 73-76.
- ITO, T., BAKER, S. C., STICKLEY, C. D., PEAK, J. G., PEAK, M. J. 1993: Dependence of the yield of strand breaks induced by gamma-rays in DNA on the physical conditions of exposure: water content and temperature. *Int. J. Radiat. Biol.* 63 (3): 289-296.
- ITOH, T., OHHASHI, M., TOBA, T., ADACHI, S. 1980: Purification and properties of β -galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft* 35: 593-597.
- JOHNSON, A. O., SEMENYA, J. G.; BUCHOWSKY, M. S., ENWONWU, C. O., SCRIMSHAW, N. S. 1993: Adaptation of lactose maldigesters to continued milk intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 879-881.
- JUHR, N.-C., FRANKE, J. & RATSCH, H. 1987: Verwertung von ^{14}C -markierter Zellulose bei konventionellen, keimfreien und definiert assoziierten Ratten. *Z. Versuchstierkd.* 29: 237-242.
- JUHR, N.-C. & FRANKE, J. 1990: Stoffwechsel von ^{14}C -markiertem Harnstoff bei konventionellen und bakterienfreien Meerschweinchen. *Z. Versuchstierkd.* 33: 123-127.
- JUHR, N.-C., HARDIECK, J. und FRANKE, J. 1991: Eine einfache Methode zur $^{14}\text{CO}_2$ -Messung bei Stoffwechselversuchen. *J. Exp. Anim. Sci.* 34: 195-197.
- KAILA, M., ISOLAURI, E., SOPPI, E., VIRTANEN, E., LAINE, S. & ARVILOMMI, H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediat. Res.* 23: 141-144.
- KASPER, H. 1987: Ernährungsmedizin und Diätetik. 6.Aufl. Urban & Schwarz, München-Wien-Baltimore.
- KELLY, D., KING, T. P., McFADYEN, M., TRAVIS, A.J. 1991: Effect of lactation on the decline of brush border lactase activity in neonatal pigs. *Gut* 32: 386-392.
- KIDDER, D.E., MANNERS, M. J. 1976: Carbohydrases in the small intestine mucosa of the pig.

Proceedings of the Nutr. Socie. 35: 26 A.

KIDDER, D.E., MANNERS, M. J. 1978: Carbohydrases in the small intestine mucosa of sow-reared and 3-weeks weaned piglets. Proceedings of the Nutrition Society 37: 51 A.

KIDDER, D.E., MANNERS, M.J. 1980: The level and distribution of carbohydrases in the small intestine mucosa of pigs from three weeks of age to maturity. Brit. J. Nutr. 43: 141-153.

KILARA, A. und SHAHANI, K. M. 1976: Lactase activity in cultured and acidified dairy products. J. Dairy Sci. 59: 2031-2035.

KIM, A. Y., THAYER, D. W. 1995: Radiation-induced cell lethality of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028: cooperative effect of hydroxyl radical and oxygen. Radiat.Res. 144: 36-42.

KIM, H. S. und GILLILAND, S. E. 1983: *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. J. Dairy Sci. 66: 959.

KLEEMANN, E. G. und KLAENHAMMER, T. R. 1982: Adherence of *Lactobacillus* Species to Human Fetal Intestinal Cells. J. Dairy Sci. 65: 2063-2069.

KLUPSCH, H. J. 1992: Saure Milcherzeugnisse, Milchmischgetränke und Desserts. Verlag TH. MANN, 45892 Gelsenkirchen-Buer, S. 60ff.

KOCIAN, J. 1988: Lactose intolerance. Int. J. Biochem. 20: 1, 1-5.

KÖHLER, T., HUISMAN, J., DEN HARTOG, L. A., MOSENTHIN, R. 1990: Comparison of Different Digesta Collection Methods to Determine the Apparent Digestibilities of the Nutrients at the Terminal Ileum in Pigs. J. Sci. Food Agric. 53: 465-475.

KOLARS, J. C., LEVITT, M. D., AOUJI, M. & SAVAIANO, D. A. 1984: Yogurt an auto-digesting source of lactose. New England Journal of Medicine 310: 1-3.

KOLDOVSKY, O., BUSTAMANTE, O., DODA, T., YAMADA, K. 1983: Effect of variation of dietary intake of starch and sucrose and the activity of sucrase and lactase in jejunum of adult rats. In: Nutritional Adaptation of the Gastrointestinal Tract of the Newborn: 43-52. Hrsg. Kretchmer, N., and Minkowsky. Nestle, Vevey/Raven Press, New York.

KOLDOVSKY, O. und SUNSHINE, P. 1970: Effect of cortisone on developmental pattern of the neutral and acid beta-galactosidase of the small intestine of the rat. *Biochem. J.* 117: 467-471.

KOTZ, C. M., FURNE, J. K., SAVAIANO, D. A. & LEVITT, M. D. 1991: Factors affecting the ability of a high β -galactosidase yogurt to enhance lactose absorption. *J. Dairy Sci.* 77: 3538-3544.

KRAWIELITZKI, K., SCHADEREIT, R., BORGMANN, E. & EVERS, B. 1987: Prüfung von Cr_2O_3 und TiO_2 als Marker für die Bestimmung von Passagezeit und Proteinverdaulichkeit bei Ratten. *Arch. Anim. Nutr. Berlin* 37/12: 1085-1099.

LALPLACE, P. J. 1972: Marker. *Ann. Zootechn.* 21: 83.

LEBENTHAL, E. 1979: Lactose malabsorption and milk consumption in infants and children. *Am. J. Clin. Nutr.* 133: 21-23.

LEICHTER, J., GODA, T., BHANDARI, S. D., BUSTAMANTE, S., W., KOLDOVSKY, O. 1984: Relation between dietary-induced increase of intestinal lactase activity and lactose digestion and absorption in adult rats. *Am. J. Physiol.* 247: G729-G735.

LEREBOURS, E., N'DJITOYAP NDAM, C. LAVOINE, A., HELLOT, M. F., ANTOINE, J. M. & COLIN, R. 1989: Yogurt and fermented-then-pasteurized milk: effects of short-term and long-term ingestion on lactose absorption and mucosal lactase-activity in lactase-deficient subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 823-827.

LEREBOURS, E. und SOMERSET, S. 1993: Yogurt and lactase deficiency. *Int. J. Immunotherapy* IX (1): 19-22.

LIN, J. H.-C., & SAVAGE, D. C. 1984: Host specificity of the colonization of the murine gastric epithelium by lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 24: 67-72.

- LIN, W.-J., SAVAIANO, D. D., HARLANDER, S. K. 1989: A method for determining β -Galactosidase activity of yogurt cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 72: 351-359.
- LIN, M. Y., SAVAIANO, D., HARLANDER, S. 1991: Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. *J. Dairy Sci.* 74: 87-95.
- LIU, T., REISENAUER, A. M., CASTILLO, R. O. 1992: Ontogeny of intestinal lactase: posttranslational regulation by thyroxine. *Am. J. Physiol.* 263: G538-G543.
- LLOYD, M., MEVISSSEN, G., FISCHER, M., OLSEN, W., GOODSPEED, D., GENINI, M.BOLL, W., SEMENZA, G., MANTEI, N. 1992: Regulation of intestinal lactase in adult hypoplasia. *J. Clin. Invest.* 89: 524-529.
- MAHE, S., MARTEAU, P., HUNEAU, J.-F., THUILLIER, F., TOME, D. 1994: Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. *Brit. J.Nutr.* 71: 169-180.
- MANNERS, M. J., STEVENS, J. A. 1972: Changes from birth to maturity in the pattern of distribution of lactase and sucrase activity in the mucosa of the small intestine of pigs. *Brit. J. Nutr.* 28: 113-127.
- MARSHALL, V. M. 1992: Probiotics, Fact or Fiction: Gut-Derived Organisms for Milk Fermentations aus: *SCI Biotech.Group Meeting*: 548-553.
- MARTEAU, P., FLOURIE, B., POCHART, P., CHASTANG, C., DESJEUX, J.-F. & RAMBAUD, J.-C. 1990: Effect of the microbial lactase (*EC* 3. 2. 1. 23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *British Journal of Nutrition* 64: 71-79.
- MARTINI, M. C., BOLLWEG, G. L., KOLARS, J. C., LEVITT, M.D., SAVAIANO, D. A. 1985: Lactose digestion from yogurt: effects of gastric acid secretion and gastric pH. *Fed. Proc.* 44: 1170.
- MARTINI, M. C., BOLLWEG, G. L., LEVITT, M.D., SAVAIANO, D. A. 1987a: Lactosedigestion by yogurt β -galactosidase: influence of pH and microbial cell integrity. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 432-436.

- MARTINI, M. C., SMITH, D. E., SAVAIANO, D.A. 1987b: Lactose digestion from flavoured and frozen yogurts, ice milk, and ice cream by lactase-deficient persons. *Am.J. Clin. Nutr.* 46: 636-640.
- MARTINI, M. C., KUKIELKA, D., SAVAIANO, D. A. 1991a: Lactose digestion from yogurt: influence of a meal and additional lactose. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 1253-1258.
- MARTINI, M. C., LEREBOURS, E. C., LIN, W. J., HARLANDER, S. K., BERRADA, N. M., ANTOINE, J. M., SAVAIANO, D. A. 1991b: Strains and species of lactic acidbacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 1041-1046.
- McDONOUGH, F. E., HITCHINS, A. D., WONG, N. P., WELLS, P., BODWELL, C. E. 1987: Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by lactose intolerant persons. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 570-574.
- McFETERS, G. A., SANDINE, W. E. ELLIKER, P.R. 1967: Purification and Properties of *Streptococcus lactis* β -Galactosidase *J. Bacteriol.* 93: 914-919.
- McKAY, L. L., SANDINE, W. E. ELLIKER, P.R. 1971: Lactose Utilization by Lactic Acid Bacteria: A Review. *Dairy Sci. Abstr.* 33: 493-499.
- McQUEEN, C., YOUNUSHONIS, W., WOLF, M. & BOEDEKER, E. 1986. Immune response to a live model oral vaccine against enteropathogenic *E. coli*: *E. coli* HB 101 strain M5) expressing the AF/R1 pilus. *Gastroenterology* 90: 1547-1552.
- METSCHNIKOFF, E. 1908: Prolongation of life. G. P. Putmans Sons, New York.
- MIAKE, S., NOMOTO, K., YOKOKURA, T., YOSHIKAI, Y., MUTAI, M. & NOMOTO, K. 1985. Protective effect of *Lactobacillus casei* on *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Infect. and Immun.* 48: 480-485.
- MILLER, J. H., NELSON, J. M., SWENBERG, C. E., SPEICHER, J. M., BENHAM, C. J. 1991: Negative supercoiling increases the sensitivity of plasmid DNA to single-strand break induction by X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 59 (4): 941-919.

- MINTON, K. W. 1994: DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mol. Microbiol.* 13: 9-15.
- MIDTVEDT, T. 1990: Experimental and Clinical Gnotobiotics: Past, Present and Future. *Microecology and Therapy* Vol. 20: 1-4.
- MIYAKAWA, M., LUCKEY, T.D. 1968: Advances in germfree research and gnotobiology. proceedings of the international symposium on life germfree research, Nagoya & Inuyama, Japan, 1967. CRC Press, Cleveland, Ohio.
- MOINEAU, S. & GOULET. 1991 J. Effect of fermented milks on humoral immune response in mice. *Int. Dairy J.* 1 (1991): 231-239.
- MORGAN, D. R., DUPONT, H., WOOD, L. V. & KOHL, S. 1984. Cytotoxicity of leucocytes from normal and shigella-susceptible (opium-treated) guinea pigs against virulent *Shigella sonnei*. *Infect. Immun.* 46: 22-24.
- NAIM, H. Y. 1992: Processing of human pro-lactase-phlorizin hydrolase at reduced temperature: Cleavage is preceded by complex glycosylation. *Biochem. J.* 285: 13-16.
- NENCIONI, L., VILLA, L., BORASCHI, D., BERTI, B. & TAGLIABUE, A. 1983. Natural and antibody-dependent cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by peripheral and intestinal lymphoid cells in mice. *J. Immun.* 130: 903-907.
- NEWCOMER, A. D. und MCGILL, D. B. 1966: Distribution of disaccharidase activity in the small bowel of normal and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology* 51: 481-488.
- NEWCOMER, A. D., PARK, H. S., O'BRIAN, P. C., MCGILL, D. B. 1983: Response of patients with irritable bowel syndrome and lactase deficiency using unfermented acidophilus milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 257-263.
- NOMOTO, K., MIAKE, S., HASHIMOTO, S., YOKOKURA, T., MUTAI, M., YOSHIKAI, Y & NOMOTO, K. 1985. Augmentation of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection by

Lactobacillus casei. J. Clin. Lab. Immun. 17: 91-97.

NUDELL, D. M., SANTIAGO, N. A., ZHU, J.-S., COHEN, M. L., MAJUK, Z., GRAY, G. M. 1993: Intestinal lactase: maturational excess expression of mRNA over enzyme protein. Am. J. Physiol. 265: 6;1, G1108-g1115.

OCCHINO, L. A., MORRIS, H. A., SAVAIANO, D. A. 1986: A comparison of β -galactosidase specific activities in strains of *Streptococcus thermophilus*. J. Dairy Sci. 69: 2583.

O'KEEFE, S. J. D., O'KEEFE, E. A., BURKE, E., ROBERTS, P., LAVENDER, R., KEMP, T. 1991: Milk induced malabsorption in malnourished african patients. Am. J. Clin. Nutr. 54: 130-135.

ONWULATA, C. I., RAO, D. R. & VANKINENI, P. 1989: Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. Am. J. Clin. Nutr. 49: 1233-1237.

O'SULLVAN, M. G., THORNTON, G., O'SULLVAN, G. C., COLLINS, J. K. 1992: Probiotic bacteria: myth or reality? Trends in Food Sci. & Tech. 3: 309-314.

PAYNE, D. L., WELSH, J. D., MANION, C. V., TSEGAYE, A., HERD, L. D. 1981: Effectiveness of milk products in dietary management of lactose malabsorption. Am. J. Clin. Nutr. 34: 2711-2715.

PEDERSEN, K. & TANNOCK, G. W. 1989. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by Lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. Februar: 279-283.

PERDIGON, G., NADER DE MACIAS, M. E., ALVAREZ, S., OLIVER, G. & PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A. 1986: Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. Infect. Immun. 53: 404-410.

PERDIGON, G., NADER DE MACIAS, M. E., ALVAREZ, S., OLIVER, G. & PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A. 1987: Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 70: 919-926.

- PERDIGON, G., NADER DE MACIAS, M. E., ALVAREZ, S., OLIVER, G. & PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A. 1988: Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immun.* 63:17-23.
- PERDIGON, G., ALVAREZ, S., NADER DE MACIAS, M. E., ROUX, M. E. & PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A. 1990. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens. *J. Food Protec.* 53: 404-410.
- PERGOLZZI, R., LIFSHITZ, F., TEICHBERG, S., WAPNIR, R. A. 1977: Interaction between dietary carbohydrates and intestinal disaccharidases in experimental diarrhea. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 482-489.
- PETERSEN, K., TANNOCK, G. W. 1988: Colonization of the porcine gastrointestinaltract by lactobacilli. *Appl. Environm. Microbiol.* Vol. 55, No. 2: 279-283.
- POCHARD, P., DEWITT, O., DESJEUX, J.-F., BOURLIOUX, P. 1989: Viable starter culture, β -galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 828-831.
- POTIER, M., THAUVETTE, L., MICHAUD, L., GIROUX, S., BEAUREGARD, G. 1991: Inactivation mechanism of tetrameric beta-galactosidase by gamma-rays involves both fragmentation and temperature-dependent denaturation of protomers. *Biochem.* 30: 8151-8157.
- POTTEN, C. S., SCHOFIELD, R., LAJTHA, G. 1990: in *Molekularbiologie der Zelle*, zweite Aufl., S. 888. Hrsg. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. VCH Verlagsgesellschaft mmbH, D-6940 Weinheim (Bundesrepublik Deutschland).
- PREMI, L., SANDINE, W. E. ELLIKER, P.R. 1972: Lactose-hydrolyzing enzymes of *Lactobacillus*-species. *Appl. Microbiol.* 24: 51-57.
- PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH 255. Aufl. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- RAMANA, R. M.V., DUTTA, S. M. 1981: Purification and properties of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.* 46: 1419.

- READ, L. C., UPTON, F. M., FRANCIS, G. L., WALLACE, J. C., DAHLENBERG, G. W., BALLARD, F. J. 1984: Changes in the growth-promoting activity of human milk during lactation. *Pediatr. Res.* 18: 133-139.
- REASONER, J., MACULAN, T. P., RAND, A. G., THAYER, W. R. 1981: Clinical studies with low-lactose milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 54-60.
- REDDY, B. S., PLEASANTS, J. R., WOSTMANN, B. S. 1968: Effect of dietary carbohydrates on intestinal disaccharidases in germfree and conventional rats. *J. Nutr.* 95: 413-419.
- RENNER, E. 1974: Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen. Mann, Hildesheim. In FICKLER, G. und LEITZMANN; C. 1980: Laktose-Intoleranz und ihre Bedeutung für Entwicklungsländer. *Ernährungs-Umschau* 12: 394-398.
- RENNER, E. 1989: Micronutrients in milk and milk-based food products. Hrsg. v. E. Renner. Elsevier Applied Science, London and New York.
- RETEL, J., HOEBEE, B., BRAUN, J. E., LUTGERINK, J. T., VAN DEN AKKER, E., WANAMARTA, A. H., JOENJE, H., LAFLEUR, M. V. 1993: Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 299 (3-4): 165-182.
- ROBINS-BROWN, R. M., LEVINE, M. M. 1981: The fate of ingested Lactobacilli in the proximal small intestine. *Amer. J. Clin. Nutr.* 34: 514-519.
- ROSADO, J. L., ALLEN, L. H., SOLOMONS, N. W. 1987: Milk consumption, symptoms response, and lactose digestion in milk intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1457-1460.
- ROSADO, J. L., SOLOMONS, N. W., ALLEN, L. H. 1992: Lactose digestion from unmodified low fat and lactose-hydrolyzed in adult lactose-maldigesters. *Euro. J. Clin. Nutr.* 46: 61-68.
- SAHI, T. 1994: Genetica and epidemiology of adult-type hypolactasia. *Scand. J. Gastroenterol.* 29/202: 7-20.

SAMBROOK, I. E. 1979: Digestion and absorption of carbohydrate and lipid in the stomach and the small intestine of the pig. *Brit. J. Nutr.* 42: 78-93.

SANDINE, W. 1979: Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Prot.* 42: 259.

SAVAGE, D. C. 1977: Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 107-133.

SAVAGE, D. C. 1992: Growth Phase, Cellular Hydrophobicity, and Adhesion In Vitro of Lactobacilli Colonizing the Keratinizing Gastric Epithelium in the Mouse. *Appl. Environment. Microbiol.* Vol. 58, No. 6: 1992-1995.

SAVAIANO, D. A., ABOUELANOUAR, A., SMITH, D. E. & LEVITT, M. D. 1984: Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 1219-1223.

SAVAIANO, D. A. und LEVITT, M. D. 1987: Milk intolerance and microbe-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* 70: 379-406.

SAVAIANO, D. A. 1989: Lactose utilization from yogurt. *Les Laits Fermentes. Actualite de la recherche.* John Libbey Eurotext Ltd., 165-173.

SCHAAFSMA, G., DERICKS, P., DECKER, P. R., DE WAARD, H. 1988: Nutritional aspects of yogurt: 1. Microbial lactase activity and digestion of lactose. *Neth. Milk and Dairy J.* 42: 121-134.

SCHNEIDER, R. E., CORONA, E., ROSALES, F., SCHNEIDER, F. E., RODRIGUEZ, O., PINEDA, O. 1990: Effect of temperature on the lactose hydrolytic capacity of a lactase derived from *Kluyveromyces lactis*. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 197-201.

SCHULZE, J. und ZUNFT, H.-J. 1991: Lactose-ein potentieller Ballaststoff. Zur Regulierung ihrer mikroökologischen Wirksamkeit im Intestinaltrakt. 3. Mitt. Ballaststoffwirkung der Lactose als Folge mikrobieller Aktivität. *Die Nahrung* 35: 9, 903-920.

SCRIMSHAW, N. S. & MURRAY, E. B. 1988: The acceptability of milk and milk products in populations with high prevalence of lactose intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 1079-1159.

SHAH, N. und JELEN, P. 1990: Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. *J. Food Sci.* 55: 506-509.

SHEARER, I. J. & DUNKIN, A. C. 1968 a: Lactose digestion in pigs. *N. Z. J. agric. Res.* 11: 456.

SHEARER, I. J. & DUNKIN, A. C. 1968 b: The gut after lactose digestion in pigs. *N. Z. J. agric. Res.* 11: 923.

SHERMAN, L. A. & SAVAGE, D. C. 1986: Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl. Enviroment. Microbiol.* 52: 302-304.

SHULMAN, R. J. 1990: Oral Insulin Increases Small Intestinal Mass and Disaccharidase Activity in the Newborn Miniature Pig. *Pediatr. Res.* 28/2: 171-175.

SHULMAN, R. J., TIVEY, D. R., SUNITHA, I., DUDLEY, M. A., HENNING, S. J. 1992: Effect of Oral Insulin on Lactase Activity, mRNA, and Posttranscriptional Processing in the Newborn Pig. *J. Pedia. Gastr. Nutr.* 14: 166-172.

SIIGUR, U., TAMM, A., TAMMUR, R. 1991: The fecal SCFAs and lactose intolerance in lactose malabsorbers. *Eur. J. Gastro. Hepatol.* 3: 321-324.

SIMONE, G. L., GORBACH, S. L. 1986: The human intestinal microflora. *Digestion Dis. Sience* 31, 9: 147-162.

SOLOMONS, N. W., GUERRERO, A.-M., TORUN, B. 1985: Dietary manipulation of postprandial colonic lactose fermentation: Effect of solid foods in a meal. *Am. J. Clin. Nutr.* 41: 199-208.

SOMKUTI, G. A. und STEINBERG, D. H. 1979: β -D-Galactoside galactohydrolase of *Streptococcus thermophilus*: induction, purification, and properties. *J. Appl. Biochem.* 1: 357.

SONTAKKE; A. T., DAVE, J. M., SANNABHADTI, S. S. 1990: Lactase activity and lactose degrading ability in some human strains of lactobacillus. Posters and Brief Communications of the XXIII International Dairy Congress, Montreal October 8-12. 196.

SPECK, M. L. 1976: Interactions among lactobacilli and man. J. Dairy Sci. 59: 338.

SPECK, M. L. 1978: Acidophilus food products. Microbiol. 19: 95-101.

SPREER; E. 1988: Technologie der Milchverarbeitung: Rohstoff Milch, Be- und Verarbeitung, Maschinen, Anlagen und Geräte, Milcherzeugnisse. 6. verb. Aufl. Leipzig: Fachbuchverlag, S. 387.

STATISTISCHES BUNDESAMT, 1990: Statistisches Jahrbuch 1990 für die Bundesrepublik Deutschland. Wiesbaden S. 59.

STEVENS, J. A., KIDDER, D. E. 1972: The distribution of trehalase, sucrase, α -Amylase, glucoamylase and lactase (β -galactosidase) along the small intestine of five pigs. Brit. J. Nutr. 28: 129-137.

SUEGARA, N., MOROTOMI, M., WATANABE, T., KAWAI, Y. & MUTAI, M. 1975: Behavior of microflora in the rat stomach: adhesion of lactobacilli to the keratinized epithelial cells in the rat stomach in vitro. Infect. Immun. 12: 173-179.

SUHR, M., DE VRESE, M., BARTH, C. A. 1995: Differenzierende Untersuchung der β -Galactosidaseaktivität von Wirts- und Mikroflora nach Joghurtverzehr. Milchwissenschaft 50/11: 629-633.

SWALLOW, D. M. und HARVEY, C. B. 1993: Genetics of adult-type hypolactasia. In: AURICCHIO, S. und SEMENZA, G. (eds): Common Food Intolerance 2: Milk in Human Nutrition and Adult-Type Hypolactasia. Dyn. Nutr. Res. Basel, Karger, vol. 3: 85-92.

SWORDS, W. E., WU, C. C., CHAMPLIN, F. R., BUDDINGTON, R. K. 1993: Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora.

- TAGLIABUE, A., NENCIONI, L., VILLA, L., KEREN, D. F., LOWELL, G. H. & BORASCHI, D. 1983. Antibody-dependant cell-mediated antibacterial activity of intestinal lymphocytes with secretory IgA. *Nature* 306: 184-186.
- TANNOCK, G. W. 1981: Microbial interference in the gastrointestinal tract. *ASEAN J. Clin. Sci.* 2: 2-34.
- TANNOCK, G. W., SZYLIT, O., DUVAL, Y. & RAIBAUD, P. 1982: Colonization of the tissue surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotic animals by lactobacillus strains. *Can. J. Microbiol.* Vol. 28: 1196-1198.
- TEUBER, M., GEIS, A., KRUSCH, U., LEMBKE, J., MOEBUS, O. in *Handbuch der Biotechnologie S. 295*, Hrsg.: PRÄVE, P., FAUST, U., SITTIG, W., SUKATSCH, D. A. R. Oldenburg Verlag München Wien 1987.
- THOMAS, T. D. und TURNER, K. W. 1977: Preparation of skim milk to allow harvesting of starter cells from milk cultures. *N. Z. J. Dairy Sci.* 12: 15.
- TIVEY, D. R., HILTON, K. J., DAUNCEY, M. J. 1994: Compensatory increase in lactase expression by enterocytes of neonatal pigs on a low energy intake. *Exp. Physiol.* 76: 285-288.
- TORP, N., ROSSI, M., TROELSEN, J. T., OLSEN, J., DANIELSEN, E. M. 1993: Lactase-phlorizin hydrolase and aminopeptidase N are differentially regulated in the small intestine of the pig. *Biochem. J.* 295: 177-182.
- TSUBOI, K. K., KWONG, L. K., D'HARLINGUE, A. E., STEVENSON, D. K., KERNER, J. A., SUNSHINE, P. 1985: The nature of maturational decline of intestinal lactase activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 840: 69.
- UDEN, P., COLUCCI, P. E., VAN SOEST, P. J. 1980: Investigation of Chromium, Cerium and Cobalt as Markers in Digesta. Rate of Passage Studies. *J. Sci. Food Agric.* 31: 625-632.
- UDEN, P., ROUNSAVILLE, T. R., WIGGANS, G. R. & VAN SOEST, P. J. 1982: The measurement of

liquid and solid digesta retention in ruminants, equines and rabbits given timothy (*Phleum pratense*) hay. Br. J. Nutr. 48: 329-339.

WACKER, H., KELLER, P., KALCHETTO, R., LENGLER, G., SEMENZA, G. 1992: Location of the two catalytic sites in intestinal lactase-phlorizin hydrolase. J. Biol. Chem. 267: 18744-18752.

WADSTRÖM, T., ANDERSSON, K., SYDOW, M., AXELSSON, L., LINDGREN, S & GULLMAR, B. 1987: Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. J. Appl. Bacteriol. 62: 513-520.

WALKER, D.M. 1959: The development of the digestive system of the young animal. II. Carbohydrase enzyme development in the young pig. J. Agric. Sci. 52: 357-363.

WALLENFELS, K., MALHORTA, P. 1961: Galactosidases. Adv. Carbohyd. Chem. 16: 239-298.

WIERZBICKI, L. E. und KOSIKOWSKI, F. V. 1973: Lactase potential of various microorganism grown in whey. J. Dairy Sci. 56: 26.

WITTE, J., LLOYD, M., LORENZSON, V., KORSMO, H., OLSEN, W. 1990: The biosynthetic basis of adult lactase deficiency. J. Clin. Invest. 96: 1338-1342.

WOSTMANN, B. S., POLLARD, M., TEAH, B. A., WAGNER, M. 1985: Germfree Research: Microflora Control and its Application to the Biomedical Science. Proceedings of the VIIIth International Symposium on Germfree Research, Notre Dame, Indiana, 1984. Alan Liss, Inc., New York.

YEH, K. Y., YEH, M., MONTGOMERY, R. K., GRAND, R. J., HOLT, P. R. 1991a: Cortisone and thyroxine modulate intestinal lactase and sucrase mRNA levels and activities in the suckling rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180: 174-180.

YEH, K. Y., YEH, M., PAN, P. C., HOLT, P. R. 1991b: Posttranslational cleavage of rat intestinal lactase at the luminal side of the brushborder membrane. Gastroenterology 101: 312-318.

YESHIMA, T., FUJISAWA, T., MITSUOKA, T. 1992: The diversity in phenotypic characteristics of

Bifidobacterium longum. Milchwissenschaft 47: 212.

ZUNFT, H.-J., SCHULZE, J. 1991: Lactose-ein potentieller Ballaststoff. Zur Regulierung ihrer mikroökologischen Wirksamkeit im Intestinaltrakt 2. Mitt. Nährstoffwirkung der Laktose. Die Nahrung 35: 867-886.

8. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
ad lib.	ad libitum
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Cr-EDTA	Chrom-Äthylendiamintetraessigsäure
ΔE	Extinktionsdifferenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm, Erdbeschleunigung
γ	gamma
Glu-6-P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h	Stunde
HK	Hexokinase
IU	International Units
k	Kilo
KbE	Kolonie bildende Einheiten
l	Liter
LB	Laktobazillen
m	milli
M	molar
μ	mikro
min	Minute
mRNA	"messenger" (Boten)-Ribonukleinsäure
MRS	DE MAN, ROGOSA, SHARPE (1960)
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NAD ⁺ + H ⁺	reduziertes NAD ⁺
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADP ⁺ + H ⁺	reduziertes NADP ⁺
o-NPG	ortho-Nitrophenyl-Galaktopyranosid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PEG	Polyethylenglykol

SK	Sterilkefir
ssp.	Subspezies
$S_{\bar{X}}$	Standardabweichungen vom Mittelwerte
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
U	Umdrehungen
\bar{X}	Mittelwert

9.AnhangTab. 3: Wachstumskurve von *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 erstellt anhand von KbE (koloniebildende Einheiten)/ml bzw. in der logarithmischen Darstellung

Inkubationszeit in h	KbE/ml	KbE/ml (in log)
0	20.000	4,2
1	46.000	4,3
2	220.000	5,2
3	980.000	6
4	2.600.000	6,2
5	6.200.000	6,4
6	9.000.000	6,8
7	9.800.000	7
8	28.000.000	7,2
9	72.000.000	7,5
10	82.000.000	7,7
11	89.000.000	7,8
12	98.000.000	8
13	260.000.000	8,2
14	420.000.000	8,3
15	400.000.000	8,3
16	480.000.000	8,3
18	460.000.000	8,3
20	480.000.000	8,3
22	490.000.000	8,3

Tab. 4: Freie β -Galactosidase-Aktivität in unterschiedlichen Proben mit *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch (bestimmt mit o-NPG als Substrat bei pH 2; Angaben in IU/ml Probe)

Zeit in min	best./Kef.	best./Puf.	unbest./Kef.	unbest./Puf.
0	388,8	386,2	380,2	387,0

5	465,6	622,4	297,2	351,8
30	350,2	358,4	316,6	260,2
60	207,8	241,8	295,8	246,6
120	137,6	13,2	305,6	340,6

Tab. 5: Freie β -Galactosidase-Aktivität in unterschiedlichen Proben mit *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch (bestimmt mit o-NPG als Substrat bei pH 4; Angaben in IU/ml Probe)

Zeit in min	best./Kef.	best./Puf.	unbest./Kef.	unbest./Puf.
0	385,8	381,0	379,6	392,6
5	365,0	327,6	294,4	428,2
30	337,6	331,8	363,8	451,4
60	356,4	317,8	401,4	399,4
120	302,0	315,8	448,4	369,0

Tab. 6: Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität in unterschiedlichen Proben mit *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch (bestimmt mit o-NPG als Substrat bei pH 2; Angaben in IU/ml Probe)

Zeit in min	best./Kef.	best./Puf.	unbest./Kef.	unbest./Puf.
0	751,2	741,0	761,4	747,9
5	783,9	549,3	606,5	875,1
30	291,9	296,0	747,5	818,4
60	311,7	26,7	926,1	803,7
120	66,5	124,2	982,7	718,7

Tab. 7: Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität in unterschiedlichen Proben mit *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus* 709-1 nach Inkubation mit Pepsin/HCl-Gemisch (bestimmt mit o-NPG als Substrat bei pH 4; Angaben in IU/ml Probe)

Zeit in min	best./Kef.	best./Puf.	unbest./Kef.	unbest./Puf.
0	747,5	758,9	745,2	746,0
5	869,3	642,6	1025,6	473,6

30	719,3	514,4	647,1	919,8
60	676,2	658,4	1000,4	882,2
120	518,6	543,2	1039,2	1043,0

Tab. 8: β -Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei 6 Göttinger Minischweinen (bestimmt mit Laktose als Substrat bei pH 5,5; Angaben in IU/g Mukosafeuchtmasse)

	bei 5%	bei 10%	bei 30%	bei 50%	bei 70%	bei 90%
Schwein 1	1,21	9,55	2,91	6,25	3,46	1,88
Schwein 2	10,30	10,03	13,51	13,38	3,16	1,81
Schwein 3	10,82	9,23	13,28	8,38	7,32	6,17
Schwein 4	9,57	8,58	14,24	5,97	11,01	7,49
Schwein 5	8,55	4,18	6,92	3,98	3,73	1,84
Schwein 6	8,11	3,63	1,44	6,38	4,78	11,32

Tab. 9: β -Galactosidase-Aktivität entlang des Dünndarms bei 6 Ratten (bestimmt mit Laktose als Substrat bei pH 5,5; Angaben in IU/g Mukosafeuchtmasse)

	bei 10%	bei 30%	bei 70%
Ratte 1	0	15,76	14,01
Ratte 2	2,58	17,63	8,55
Ratte 3	16,95	16,66	0,65
Ratte 4	7,72	15,61	7,13
Ratte 5	14,68	11,61	10,63
Ratte 6	9,75	13,03	6,91

Tab. 10: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets (Bestrahlungsposition 3; ohne Ultraschallbehandlung; Bestimmt mit o-NPG als Substrat)

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	
Messung	am 21.07.	am 27.07.	am 03.08.	am 22.08.	
Intensität	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	Position
(kGy)					

0	4332,5	2052,5	1095,0	372,5	0*
5	7737,5	5095,0	6522,5	4242,5	3
10	9102,5	6447,5	10767,5	4127,5	3
15	11665,0	11112,5	12036,0	8837,5	3
20	11027,5	10927,5	15242,5	8640,0	3
25	13862,5	15370,0	25200,0	17400,0	3

*= ohne Bestrahlung

Tab. 11: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets (Bestrahlungsposition 7; ohne Ultraschallbehandlung; Bestimmt mit o-NPG als Substrat)

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	
Messung	am 21.07.	am 27.07.	am 03.08.	am 22.08.	
Intensität	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	Position
(kGy)					
0	4332,5	2052,5	1095,0	372,5	0*
5	7342,5	5850,0	9180,0	7262,5	7
10	8767,5	8342,5	14172,5	12355,0	7
15	16812,5	21177,5	30047,5	15952,5	7
20	24262,5	32885,0	35367,5	17667,5	7
25	31240,0	36620,0	35685,0	18517,5	7

*= ohne Bestrahlung

Tab. 12: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets (Bestrahlungsposition 3; mit Ultraschallbehandlung; Bestimmt mit o-NPG als Substrat)

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch4	
Messung	am 21.07.	am 27.07.	am 03.08.	am 22.08.	
Intensität	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	Position
(kGy)					
0	61280,0	28030,0	6175,0	-665,0	0*
5	74510,0	39385,0	21450,0	3295,0	3
10	61560,0	50130,0	20790,0	3155,0	3
15	59430,0	46905,0	40890,0	7075,0	3
20	62055,0	49010,0	38775,0	8265,0	3

25	56470,0	49230,0	43735,0	15835,0	3
----	---------	---------	---------	---------	---

* = ohne Bestrahlung

Tab. 13: Einfluß der Bestrahlungsbedingungen auf die β -Galactosidase-Aktivität in Laktobazillenpellets (Bestrahlungsposition 7; mit Ultraschallbehandlung; Bestimmt mit o-NPG als Substrat)

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	
Messung	am 21.07.	am 27.07.	am 03.08.	am 22.08.	
Intensität (kGy)	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	IU/l Probe	Position
0	61280,0	28030,0	6175,0	-665,0	0*
5	66945,0	47770,0	27355,0	8360,0	7
10	58490,0	47720,0	23855,0	11345,0	7
15	64750,0	60980,0	43270,0	10225,0	7
20	62690,0	57170,0	46760,0	19090,0	7
25	61060,0	58140,0	43755,0	17660,0	7

* = ohne Bestrahlung

Tab. 14 a: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene Laktosemenge (Daten als $\log_{10}(x+1)$ angegeben) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

	g Laktose/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,8	0,38
SK + bestrahlte LB (tot), Hülle intakt	0,4	0,28
SK + LB lebend	0,24	0,27

Tab. 14 b: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

	g Laktose/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Lactobazillen (LB)	7,43	1,09
SK +LB bestrahlt (tot): Hülle intakt	2,08	1,71
SK + LB lebend	1,29	0,96

Tab. 14 c: Im Kot durchschnittlich ausgeschiedene Laktosemenge bei 6 einzelnen gnotobiotischen inischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw.inaktivierten Laktobazillen; Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ (Angaben in g Laktose/Tag)

	SK ohne LB	Standard- abw.	SK + bestrahlte LB (tot): intakte Hülle	Standard- abw.	SK + LB lebend	Standard- abw.
Schwein 1	8,9	4	5,7	1,5	2,1	3,3
Schwein 2	6,9	3	1,7	0,8	2,7	5,3
Schwein 3	6,9	7,4	2,3	1,2	1,8	2,1
Schwein 4	5,8	4,5	1,0	1	0,3	0,3
Schwein 5	8,6	4,2	0,9	1	0,4	0,5
Schwein 6	7,4	2,6	0,8	1	0,5	0,3

Tab. 15 a: Durchschnittliche wahre, marker-korregierte Verdaulichkeit der Laktose in % (bestimmt mit Cr-EDTA als Marker; Daten als $\log_{10}(x+1)$ angegeben) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	Verdaulichkeit %	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	1,78	0,1
SK + bestrahlte LB (tot), Hülle intakt	1,98	0,03
SK + LB lebend	1,98	0,07

Tab. 15 b: Durchschnittliche wahre, marker-korregierte Verdaulichkeit der Laktose in % (bestimmt mit Cr-EDTA als Marker) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	Verdaulichkeit %	Standardabw
Sterilkefir (SK) ohne Lactobazillen (LB)	61,3	25,3
SK +LB bestrahlt (tot): Hülle intakt	95,1	28,5
SK + LB lebend	95,4	34,9

Tab. 15 c: Durchschnittliche wahre, marker-korregierte Verdaulichkeit der Laktose in % (bestimmt mit Cr-EDTA als Marker) bei 6 einzelnen gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

	SK ohne LB	Standardabw.	SK + bestrahlte LB(tot): intakte Hülle	Standardabw.	SK +LB lebend	Standardabw.
Schwein 1	62,0	7,0	84,4	6,7	84,3	21,3
Schwein 2	65,9	4,6	96,8	0,8	93,4	7,9
Schwein 3	59,5	17,5	95,2	1,7	97,2	2,4
Schwein 4	64,8	5,4	98,2	2,0	99,3	0,2
Schwein 5	63,7	6,0	98,0	0,5	99,1	1,1
Schwein 6	52,2	16,6	97,8	1,3	99,2	0,4

Tab. 16 a: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene extrazelluläre β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung; Daten als $\log_{10}(x+1)$ angegeben) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen

(bestimmt mit o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,18	0,23
SK + bestrahlte LB (tot), Hülle intakt	0,88	0,44
SK + LB lebend	1,17	0,61

Tab. 16 b: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene extrazelluläre β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,16	0,32
SK + bestrahlte LB(tot), intakte Hülle	4,10	3,22
SK + LB lebend	17,98	12,76

Tab. 16 c: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene extrazelluläre β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) bei 6 einzelnen gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen

(bestimmt mit o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6 (Angaben in IU β -Gal/Tag)

	SK ohne LB	Standardabw.	SK + LB bestrahlt (tot): Hülle intakt	Standardabw.	SK + LB lebend	Standardabw.
Schwein 1	0,00	0,00	1,84	3,30	43,54	46,90

Schwein 2	0,00	0,00	10,17	7,00	14,84	15,20
Schwein 3	0,08	0,30	3,31	7,20	13,99	18,20
Schwein 4	0,00	0,00	0,32	1,00	1,10	2,30
Schwein 5	0,88	3,00	2,88	6,20	19,72	21,60
Schwein 6	0,00	0,00	6,08	8,00	14,71	20,00

Tab. 17 a: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung; Daten als $\log_{10}(x+1)$ angegeben) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen

(bestimmt mit o-NPG als Substrat); Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,02	0,12
SK + bestrahlte LB (tot), Hülle intakt	0,4	0,48
SK + LB lebend	0,78	0,72

Tab. 17 b: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,90	0,68
SK + LB bestrahlt (tot), Hülle intakt	10,93	5,67
SK +LB lebend	31,63	21,93

Tab. 17 c: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene Gesamt- β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung) bei 6 einzelnen gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat)

Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n=6 (Angaben in IU β -Gal/Tag)

	SK ohne LB	Standardabw.	SK + LB bestrahlt (tot): Hülle intakt	Standardabw.	SK + LB lebend	Standardabw.
Schwein 1	0,75	1,00	7,39	4,20	76,96	27,80
Schwein 2	0,96	1,00	22,17	11,00	33,97	23,40
Schwein 3	0,50	1,40	9,19	5,50	22,00	27,60
Schwein 4	0,27	0,50	4,47	3,30	6,04	5,00

Schwein 5	2,33	4,20	9,05	8,70	25,93	26,40
Schwein 6	0,56	0,50	13,31	1,00	24,89	28,00

Tab. 18 a: Durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedene Laktosemenge (Daten als $\log_{10}(x+1)$ angegeben) bei gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	g Laktose/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,51	0,17
SK + bestrahlte LB (tot), Hülle intakt	0,33	0,16
SK + LB lebend	0,23	0,22

Tab. 18 b: Durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	g Lactose/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	2,45	0,39
SK + bestrahlte LB (tot), intakte Hülle	1,27	0,21
SK + LB lebend	0,78	0,13

Tab. 18 c: Durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei 6 einzelnen gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ (Angaben in g Laktose/Tag)

	SK ohne LB	Standardabw.	SK + bestrahlte LB(tot): intakte Hülle	Standardabw.	SK + LB lebend	Standardabw.
Ratte 1	2,05	1,00	0,89	0,70	0,95	0,73
Ratte 2	2,14	0,70	1,20	0,90	0,61	0,60
Ratte 3	2,01	0,70	1,67	0,70	0,77	0,80
Ratte 4	2,81	2,50	1,36	0,60	0,94	0,70
Ratte 5	2,94	2,80	1,20	0,30	0,61	0,50
Ratte 6	2,76	2,30	1,27	0,90	0,79	0,50

Tab 19 a: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (extrazellulär; ohne Ultraschallbehandlung; Daten als $\log_{10}(x+1)$ angegeben) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,01	0,06
SK + bestrahlte LB (tot), Hülle intakt	0,42	0,30
SK + LB lebend	1,88	0,31

Tab 19 b: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (extrazellulär; ohne Ultraschallbehandlung) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,45	0,84
SK + LB bestrahlt (tot): Hülle intakt	2,30	0,63
SK + LB lebend	90,39	10,45

Tab 19 c: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (extrazellulär; ohne Ultraschallbehandlung) 6 einzelner gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ (Angaben in IU β -Gal/Tag)

	SK ohne LB	Standard-abw.	SK + LB bestrahlt (tot): Hülle intakt	Standard-abw.	SK + LB lebend	Standard-abw.
Ratte 1	0,00	0,00	2,33	2,00	75,95	52,10
Ratte 2	0,00	0,00	2,76	3,10	79,57	49,20
Ratte 3	0,00	0,00	3,05	2,60	88,93	38,20
Ratte 4	0,40	0,10	2,50	2,20	93,88	47,60
Ratte 5	0,00	0,00	2,15	1,60	106,79	47,20

Ratte 6	2,30	0,60	1,05	1,40	97,23	33,80
---------	------	------	------	------	-------	-------

Tab 20 a: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (intrazellulär; mit Ultraschallbehandlung; Daten als $\log_{10}(x+1)$ angegeben) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,005	0,02
SK + bestrahlte LB (tot), Hülle intakt	0,42	0,30
SK + LB lebend	2,14	0,40

Tab 20 b: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (intrazellulär; mit Ultraschallbehandlung) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

	IU β -Gal/Tag	Standardabw.
Sterilkefir (SK) ohne Laktobazillen (LB)	0,01	0,01
SK + bestrahlte LB (tot), intakte Hülle	2,37	0,63
SK + LB lebend	180,53	27,19

Tab 20 c: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (intrazellulär; mit Ultraschallbehandlung) 6 einzelner gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ (Angaben in IU β -Gal/Tag)

	SK ohne LB	Standard-abw.	SK + bestrahlte LB (tot), intakte Hülle	Standard-abw.	SK + LB lebend	Standard-abw.
Ratte 1	0,01	0,03	2,35	2,20	162,60	154,10
Ratte 2	0,00	0,00	2,81	3,30	147,00	108,50
Ratte 3	0,02	0,10	3,10	2,60	163,80	101,90
Ratte 4	0,02	0,10	2,65	2,00	185,60	99,90
Ratte 5	0,01	0,02	2,16	1,60	193,50	98,10
Ratte 6	0,01	0,03	1,13	1,50	230,70	82,20

Tab. 21: Einzelwerte der mit dem Kot ausgeschiedenen Laktosemenge von gnotobiotischen Göttinger Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw.

inaktivierten Laktobazillen (Angaben in g Laktose/Tag)

	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 3	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 6
Diät 1	0,00			0,16	0,00	1,80
Diät 1	2,75	0,00	1,20	1,12	1,54	5,39
Diät 1	5,73	6,73	1,59		5,86	7,74
Diät 1	9,52	9,02	0,00	4,46	10,89	7,59
Diät 1	11,15	8,15	7,27	4,29	11,53	11,21
Diät 1	9,39	9,98	0,00	6,05	0,00	9,34
Diät 1	10,34	6,19	12,91	0,00	9,07	8,81
Diät 1	10,88	2,73	3,90	7,44	10,03	
Diät 1	10,16	8,66	9,57	0,80	8,77	4,90
Diät 1	7,13	8,34	10,90	10,72	10,91	9,36
Diät 1	9,92	6,10		7,14	8,48	6,86
Diät 1	13,85	7,60	11,14	11,51	11,91	8,50
Diät 1	12,20	5,11	0,00	12,53		
Diät 1	12,04	11,05	24,64	8,52	14,77	0,00
Diät 2	2,84	0,92	3,35	1,68	1,01	0,35
Diät 2	4,03	0,97	0,43	0,00	0,53	0,37
Diät 2	6,77	1,60	0,54	0,00	0,55	0,68
Diät 2	6,52	2,87	4,34	0,33	1,27	2,42
Diät 2	8,01	1,78	2,03	1,99	0,36	2,40
Diät 2	5,43	1,05	1,86	2,05	1,26	0,60
Diät 2	3,92	2,20		2,27	0,78	0,00
Diät 2	6,58	2,28		2,23	0,20	0,50
Diät 2	6,20	2,14	1,81	0,00	0,30	0,59
Diät 2	5,59	2,07	2,49	1,44	3,76	0,00
Diät 2	4,31	1,78	4,37	0,00	0,90	0,00
Diät 2	9,45	2,23	1,63	0,00	1,54	0,43
Diät 2	4,80	0,60	2,80	0,00	0,06	
Diät 2	5,61	1,15	2,49	0,14	0,08	
Diät 3	3,23	0,74	2,27	0,24	0,27	0,10

Diät 3	1,80	0,23		0,15	0,47	0,37
Diät 3	1,19	0,26	4,07		0,00	0,65
Diät 3	1,66	1,06	0,00	0,65	0,81	
Diät 3	11,61	0,79	6,09	0,04	1,41	0,00
Diät 3	0,00	14,20	3,77	0,18	0,00	0,54
Diät 3	0,75	13,46	1,93	0,42	0,27	
Diät 3	0,35	0,18	0,74	0,86	0,56	0,62
Diät 3	0,87	0,67	1,04	0,17	0,12	0,57
Diät 3	0,45	0,59	0,94	0,08	0,04	0,17
Diät 3	0,57	0,00	0,37	0,01	0,00	0,38
Diät 3	0,39	0,52	0,43	0,30	0,08	1,16

Tab. 22: Einzelwerte der Verdaulichkeit der Laktose in % (bestimmt mit Cr-EDTA als Marker) von gnotobiotischen Göttinger Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen

	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 3	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 6
Diät 1	77,16			81,03	77,38	68,09
Diät 1	71,07	80,00	69,64	58,05	77,59	66,32
Diät 1	63,63	65,85	76,88		67,93	72,01
Diät 1	58,83	62,24	73,75	67,25	61,86	64,85
Diät 1	58,83	62,24	73,75	67,25	61,86	64,85
Diät 1	58,83	62,24	73,75	67,25	61,86	64,85
Diät 1	66,26	65,93	63,61	66,03	61,69	28,03
Diät 1	65,98	65,65	63,28	63,35	61,32	
Diät 1	65,98	65,65	63,28	63,35	61,32	26,98
Diät 1	65,98	65,65	63,28	63,35	61,32	26,98
Diät 1	53,75	67,20		61,40	59,43	55,08
Diät 1	53,75	67,20	33,07	61,40	59,43	55,08
Diät 1	53,75	67,20	33,07	61,40		
Diät 1	53,75	67,20	33,07	61,40	59,43	55,08
Diät 2	91,82	97,37	93,34	95,78	97,47	98,89

Diät 2	91,29	97,93	99,26	101,86	98,76	99,09
Diät 2	87,12	96,76	98,03	101,36	97,84	96,91
Diät 2	86,61	96,25	94,68	97,05	97,99	96,06
Diät 2	86,61	96,25	94,68	97,05	97,99	96,06
Diät 2	86,61	96,25	94,68	97,05	97,99	96,06
Diät 2	89,00	96,00		96,52	97,53	98,87
Diät 2	89,00	96,00		96,52	97,53	98,87
Diät 2	88,52	95,82	95,85	96,37	97,42	98,82
Diät 2	88,52	95,82	95,85	96,37	97,42	98,82
Diät 2	74,15	97,54	93,63	99,71	98,59	98,82
Diät 2	74,15	97,54	93,63	99,71	98,59	98,82
Diät 2	74,15	97,54	93,63	99,71	98,59	
Diät 2	74,15	97,54	93,63	99,71	98,59	
Diät 3	28,32	95,39	96,85	99,31	99,41	99,80
Diät 3	96,12	99,28		99,31	98,62	99,28
Diät 3	97,71	99,45	94,13		102,33	98,61
Diät 3	93,57	98,03	100,05	98,69	98,50	
Diät 3	67,28	79,68	94,14	99,44	98,16	98,80
Diät 3	67,28	79,68	94,14	99,44	98,16	98,80
Diät 3	67,28	79,68	94,14	99,44	98,16	
Diät 3	98,71	97,95	99,07	99,25	99,16	99,50
Diät 3	98,71	97,95	99,07	99,25	99,16	99,50
Diät 3	98,71	97,95	99,07	99,25	99,16	99,50
Diät 3	98,71	97,95	99,07	99,25	99,16	99,50
Diät 3	98,71	97,95	99,07	99,25	99,16	99,50

Tab. 23: Einzelwerte der mit dem Kot ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) von gnotobiotischen Göttinger Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat; Angaben in IU β -Gal/Tag)

	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 3	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 6
Diät 1	0,00			0,20	0,07	0,92

Diät 1	0,15	0,00	0,00	0,33	0,45	0,57
Diät 1	0,00	0,99	0,00		0,21	0,54
Diät 1	2,81	0,96	0,00	0,23	0,41	0,49
Diät 1	0,08	1,48	0,00	0,01	0,80	0,74
Diät 1	0,92	3,17	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	2,79	0,95	0,33	0,00	1,03	0,00
Diät 1	0,25	1,13	0,26	0,00	0,34	
Diät 1	0,00	0,89	0,00	0,10	0,81	0,44
Diät 1	0,00	0,83	0,00	0,45	0,49	0,52
Diät 1	1,69	0,48		1,11	13,61	1,98
Diät 1	1,26	0,78	4,69	0,00	9,17	0,00
Diät 1	0,61	0,76	0,00	0,00		
Diät 1	0,00	0,10	0,73	0,00	0,61	0,00
Diät 2	3,73	0,15	1,39	0,59	0,00	2,57
Diät 2	5,03	11,56	6,91	0,16	0,00	6,93
Diät 2	13,05	24,13	10,16	2,17	2,82	4,14
Diät 2	8,54	28,07	12,91	1,50	20,24	23,52
Diät 2	15,85	46,49	18,71	7,34	32,13	31,27
Diät 2	7,24	30,82	14,07	3,99	10,63	16,01
Diät 2	7,32	22,55		5,26	11,39	0,00
Diät 2	10,66	30,45		10,41	14,26	19,82
Diät 2	0,00	21,38	11,28	3,18	5,91	6,26
Diät 2	3,90	25,33	15,39	8,30	3,24	0,00
Diät 2	2,12	20,92	5,35	6,87	10,08	17,95
Diät 2	7,88	23,36	8,65	0,00	7,72	4,65
Diät 2	10,23	13,04	3,66	0,00	5,98	
Diät 2	7,84	12,08	1,81	3,80	2,37	
Diät 3	1,42	0,14	0,65	1,41	2,23	1,01
Diät 3	15,95	13,37		5,02	5,92	11,28
Diät 3	32,69	28,74	1,60		20,99	59,76
Diät 3	54,92	29,15	17,15	5,18	81,91	

Diät 3	95,62	3,20	2,15	11,02	6,66	0,00
Diät 3	0,00	42,01	3,44	3,88	0,00	6,45
Diät 3	21,03	64,32	5,57	0,00	14,33	
Diät 3	127,23	59,43	20,38	4,68	17,75	7,04
Diät 3	176,41	50,13	44,58	2,30	28,39	17,76
Diät 3	64,71	11,87	52,38	7,18	35,47	12,81
Diät 3	136,71	66,40	89,35	17,71	67,17	58,27
Diät 3	119,82	38,92	26,76	8,07	4,38	74,47

Tab. 24: Einzelwerte der mit dem Kot ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung) von gnotobiotischen Göttinger Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat; Angaben in IU β -Gal/Tag)

	Schwein 1	Schwein 2	Schwein 3	Schwein 4	Schwein 5	Schwein 6
Diät 1	0,00			0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,93	0,00	10,56	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00		
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 2	0,00	4,13	0,54	0,00	0,00	0,00
Diät 2	7,23	9,73	2,69	0,00	0,00	0,00
Diät 2	3,65	18,22	4,94	0,00	9,29	15,53

Diät 2	10,65	22,48	25,15	1,16	22,81	23,58
Diät 2	0,00	18,44	1,33	0,00	1,67	4,18
Diät 2	0,85	5,74		0,00	1,73	0,00
Diät 2	1,16	17,34		0,28	3,40	10,02
Diät 2	0,00	6,38	0,38	0,00	0,00	3,18
Diät 2	0,00	14,10	0,00	2,43	0,00	0,00
Diät 2	0,00	11,41	0,00	0,00	1,40	4,35
Diät 2	0,00	8,69	4,68	0,00	0,00	0,00
Diät 2	1,43	4,87	0,00	0,00	0,00	
Diät 2	0,85	0,87	0,00	0,00	0,00	
Diät 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 3	9,60	7,43		0,00	0,00	4,70
Diät 3	8,35	15,83	0,00		15,55	40,40
Diät 3	43,57	22,20	11,62	0,00	66,47	
Diät 3	0,00	0,00	0,00	0,00	2,41	0,00
Diät 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 3	8,11	0,00	0,01	0,00	11,72	
Diät 3	86,76	37,81	13,73	0,00	15,83	5,12
Diät 3	142,73	30,90	22,20	0,00	21,46	0,00
Diät 3	41,28	4,52	29,99	1,95	26,31	9,66
Diät 3	97,09	38,80	54,59	7,84	51,72	34,04
Diät 3	41,42	20,55	35,73	2,31	5,44	53,18

Tab. 25: Einzelwerte der mit dem Kot ausgeschiedenen Laktosemenge von gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (Angaben in g Laktose/Tag)

	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
Diät 1	0,16	0,54	0,63	0,58	0,27	0,38
Diät 1	0,66	0,77	1,03	0,92	0,90	1,47
Diät 1	1,48	2,05	2,37	2,24	1,16	1,39
Diät 1	1,93	2,99	2,55	4,42	4,34	3,68

Diät 1	2,98	3,27	1,76	4,80	4,42	5,11
Diät 1	2,14	2,67	1,65	2,56	3,88	2,88
Diät 1	3,58	2,04	3,47	3,85	4,86	3,89
Diät 1	2,93	2,66	2,70	2,45	5,02	5,78
Diät 1	2,43	2,64	3,08	3,56	1,74	2,34
Diät 1	1,99	2,80	1,91	3,02	2,06	2,07
Diät 1	2,08	1,61	0,67	5,88	4,93	1,91
Diät 1	3,14	2,56	1,90	0,82	3,27	3,61
Diät 1	2,41	2,08	2,00	2,69	2,74	2,59
Diät 1	0,77	1,26	2,38	1,54	1,56	1,51
Diät 2	2,26	2,57	2,79	1,91	2,41	2,51
Diät 2	1,85	2,21	2,51	1,81	1,30	1,34
Diät 2	2,62	3,10	3,55	3,43	2,11	3,45
Diät 2	0,91	1,08	1,46	1,40	0,71	1,71
Diät 2	0,81	1,08	1,59	1,53	0,79	0,94
Diät 2	0,22	1,48	1,40	0,84	0,94	1,35
Diät 2	1,29	2,05	1,50	1,58	1,04	1,18
Diät 2	0,64	0,65	1,61	1,81	1,47	1,18
Diät 2	0,81	0,57	2,20	0,77	1,43	1,55
Diät 2	0,63	0,32	1,31	0,81	1,15	1,54
Diät 2	0,27	0,48	1,03	0,94	1,06	0,77
Diät 2	0,03	0,54	0,79	0,67	1,01	0,32
Diät 2	0,00	0,31	0,12	0,74	0,40	0,00
Diät 2	0,18	0,34	1,53	0,85	1,02	0,00
Diät 3	0,00	2,18	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 3	1,60	0,00	0,00	0,15	0,00	0,41
Diät 3	0,32	0,04	0,76	0,25	0,33	1,04
Diät 3	0,33	0,00	0,00	1,07	1,37	0,49
Diät 3	0,53	0,20	0,64	0,00	0,07	2,42
Diät 3	1,52	0,21	1,77	1,57	0,03	1,30

Diät 3	3,58	0,30	0,00	1,53	1,68	0,86
Diät 3	2,17	1,51	1,70	2,03	0,44	0,00
Diät 3	12,82	1,48	1,15	1,94	1,49	1,18
Diät 3	1,33	0,75	2,44	1,80	1,28	1,01

Tab. 26: Einzelwerte der mit dem Kot ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) von gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat; Angaben in IU β -Gal/Tag)

	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,30
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 2	2,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 2	0,39	0,00	0,00	0,09	0,17	1,39
Diät 2	2,32	0,30	0,00	1,16	4,09	0,00
Diät 2	0,98	1,22	6,25	0,78	3,26	0,64
Diät 2	2,33	0,37	3,46	2,08	2,36	0,85
Diät 2	2,86	1,56	7,03	1,13	2,29	1,50
Diät 2	5,89	1,01	1,43	0,46	1,51	1,84
Diät 2	6,19	2,42	1,24	4,66	1,34	1,24

Diät 2	1,27	6,71	0,21	3,04	0,47	0,35
Diät 2	4,96	9,81	4,78	4,06	1,21	1,14
Diät 2	3,10	4,15	1,24	2,91	0,88	0,24
Diät 2	0,18	1,52	6,04	4,72	3,31	5,50
Diät 2	0,00	1,61	5,99	1,94	4,21	0,00
Diät 2	0,02	7,95	4,96	7,92	5,00	0,00
Diät 3	20,75	1,34	10,99	32,12	21,16	35,06
Diät 3	67,40	31,34	66,14	63,15	40,26	68,96
Diät 3	55,38	52,06	53,34	50,73	61,09	64,28
Diät 3	219,21	50,45	168,07	80,36	122,13	68,29
Diät 3	33,62	122,71	96,51	132,19	134,36	131,37
Diät 3	100,30	149,65	94,69	138,23	95,97	117,32
Diät 3	46,57	129,13	129,57	189,63	143,93	103,20
Diät 3	76,91	143,25	92,78	119,79	192,12	151,21
Diät 3	39,70	106,72	90,81	77,99	128,07	132,96
Diät 3	66,68	48,31	79,45	30,35	107,91	88,69
Diät 3	108,97	40,30	95,88	118,13	127,71	108,20

Tab. 27: Einzelwerte der mit dem Kot ausgeschiedenen β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung) von gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat; Angaben in IU β -Gal/Tag)

	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	Ratte 5	Ratte 6
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,32	0,33	0,07	0,13
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Diät 2	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00
Diät 2	0,36	0,00	0,00	0,15	0,46	1,35
Diät 2	3,32	0,42	0,00	1,16	4,53	0,04
Diät 2	1,46	1,09	7,20	1,12	3,56	1,26
Diät 2	2,81	0,74	4,03	1,89	2,34	1,29
Diät 2	2,45	1,41	6,41	1,07	1,61	1,12
Diät 2	6,60	1,31	1,12	0,59	1,75	1,81
Diät 2	5,88	2,56	1,20	4,87	1,20	1,19
Diät 2	1,51	6,88	0,45	3,31	0,36	0,00
Diät 2	5,47	11,82	5,26	3,83	1,17	1,44
Diät 2	2,81	3,47	1,35	2,82	0,98	0,15
Diät 2	0,19	1,51	6,08	5,28	2,92	6,16
Diät 2	0,00	1,47	4,67	4,62	4,82	0,00
Diät 2	0,00	6,64	5,40	6,31	4,58	0,00
Diät 3	101,10	14,98	56,74	176,12	60,19	88,22
Diät 3	167,31	131,73	197,55	209,10	142,26	157,76
Diät 3	96,90	125,92	113,27	104,13	126,33	141,85
Diät 3	616,75	140,57	338,58	255,24	371,58	271,03
Diät 3	97,10	283,33	334,91	354,35	248,83	299,34
Diät 3	259,42	349,47	213,58	333,34	258,78	329,48
Diät 3	80,74	257,28	238,50	228,80	281,95	257,52
Diät 3	126,62	192,28	100,29	182,97	306,04	346,42
Diät 3	34,00	82,01	81,87	70,79	90,82	280,83
Diät 3	74,86	0,00	49,35	28,32	109,75	140,75
Diät 3	133,95	38,99	77,61	98,30	131,89	224,17

Tab. 28: Zusammensetzung (g/kg) und Nährstoffkonzentration der semi-synthetischen Diät für die Minischweine

Kasein, säuregefällt	154,7
Maisstärke	686,3
Zellulose	20,0
Sojaöl	40,0
Vitamine + Spurenelemente	10,0
Mengenelemente	89,0
Nährstoffkonzentration (je kg TS):	
Umstzbare Energie, kcal	3816
Rohprotein, g	150,3
Lysin, g	11,57
Methionin + Zystin, g	5,60

TS = Trockensubstanz

Tab. 29: Zusammensetzung des Rattenfutters (Angaben pro kg Fertigfutter)

Vitaminmischung:	
Vitamin A	37000 IU
Vitamin K3	500 mg
Vitamin E	1150 mg
Vitamin D	140000 IU
Vitamin B1	140 mg
Vitamin B2	50 mg

Vitamin B6	40 mg
Vitamin B12	250 mg
Nicotinsäureamid	130 mg
Ca-Pantothenat	300 mg
Cholinchlorid	1000 mg
Biotin	10 mg
Folsäure (in NaOH)	10 mg
p-Aminobenzoesäure	25 mg
Inosit	1000 mg
Vitamin C	2000 mg
Zusammensetzung:	
Rohprotein	35 %
Rohfett	4,3 %
Rohfaser	4,4 %
Rohasche	8,0 %

Abb. A 1: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander

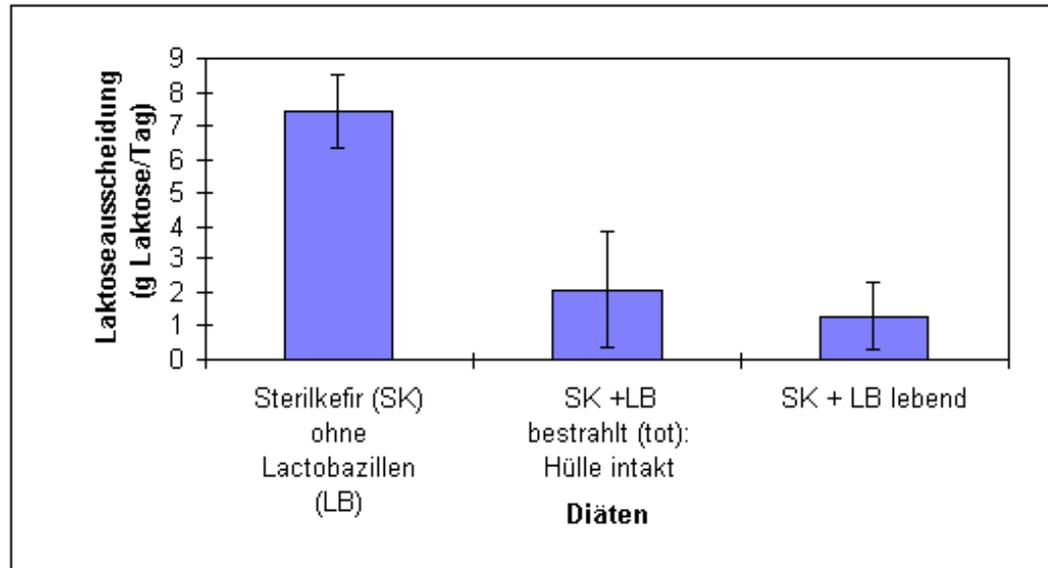
(s. auch Tab. 14 b und Abb. A 8 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

Abb. A 2: Durchschnittliche wahre, marker-korrigierte Verdaulichkeit der Laktose in % (bestimmt mit Cr-EDTA als Marker) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen; Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander (s.auch Tab. 15 b und Abb. A 9 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

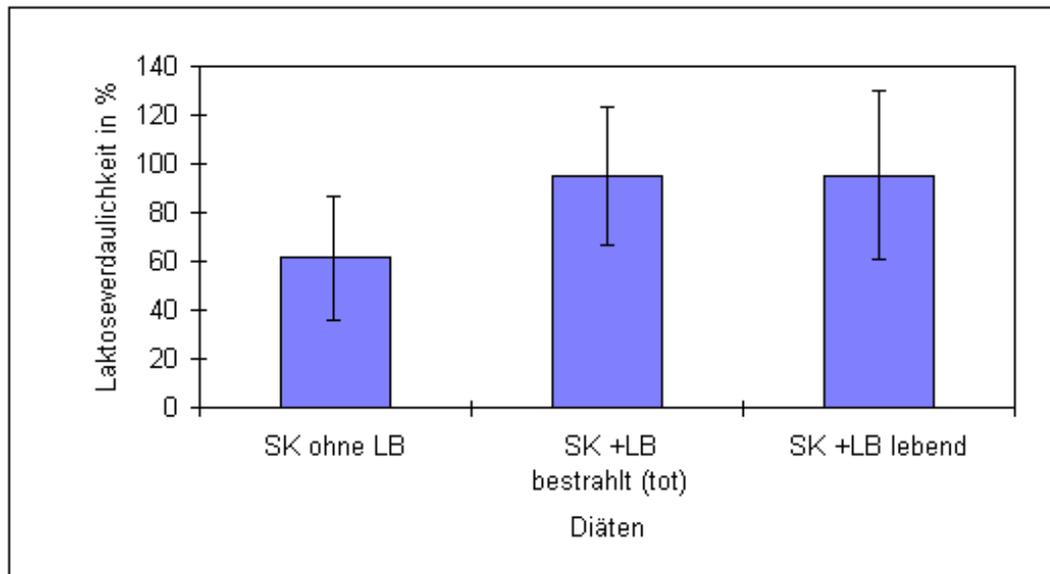


Abb. A 3: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene freie (extrazelluläre) β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat)
 Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander
 (s. auch Tab. 16 b und Abb. A 10 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

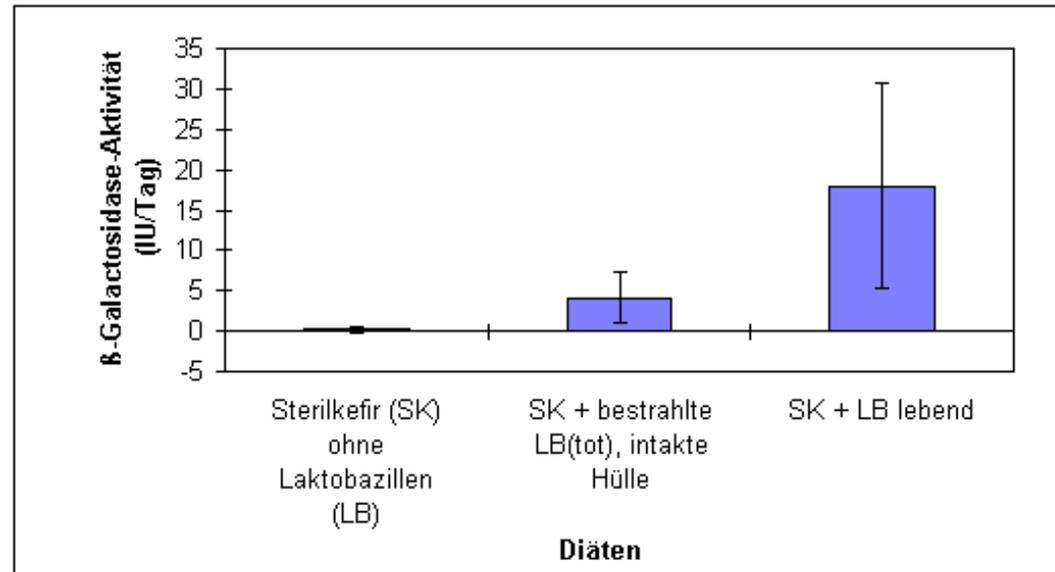


Abb. A 4: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene Gesamt- β -Galactosidase- Aktivität (mit Ultraschallbehandlung) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat);
 Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander
 (s. auch Tab. 17 b und Abb. A 11 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

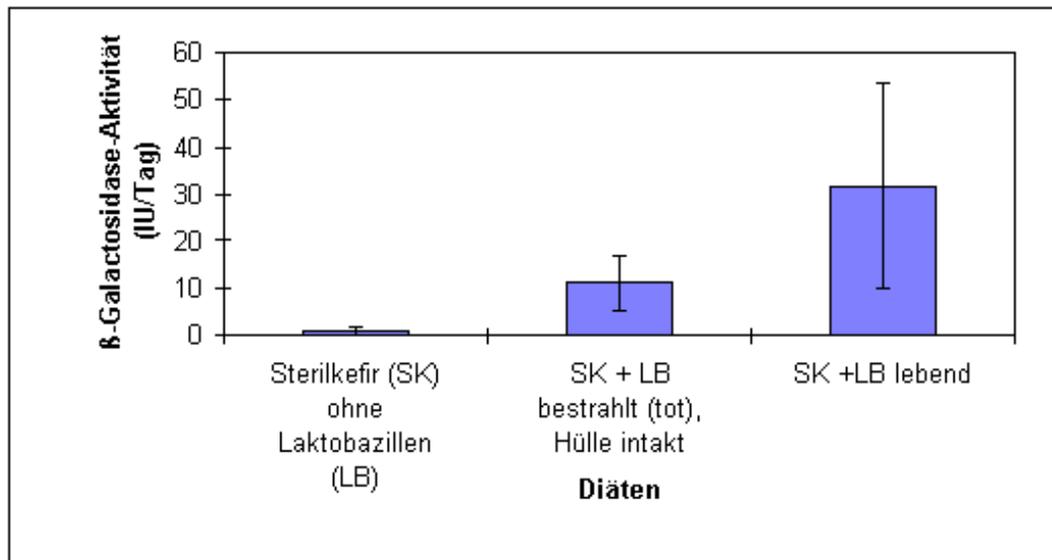


Abb. A 5: Durchschnittlich mit dem Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei gnoto- biotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inak- tivierten Laktobazillen; Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander

(s. Tab. 18 b und Abb. A 12 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

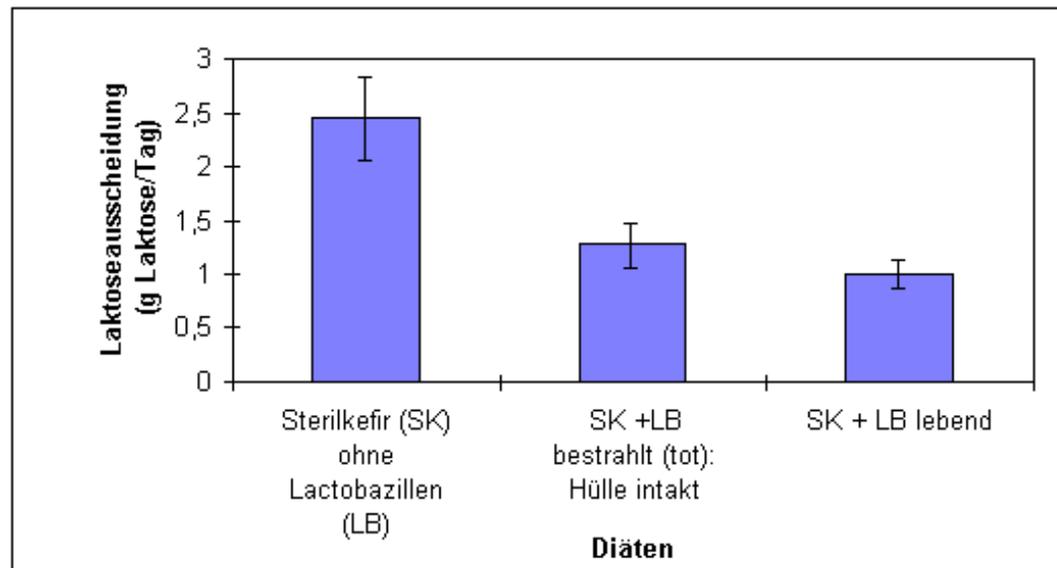


Abb. A 6: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (extrazellulär; ohne Ultraschallbehandlung) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat);

Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander

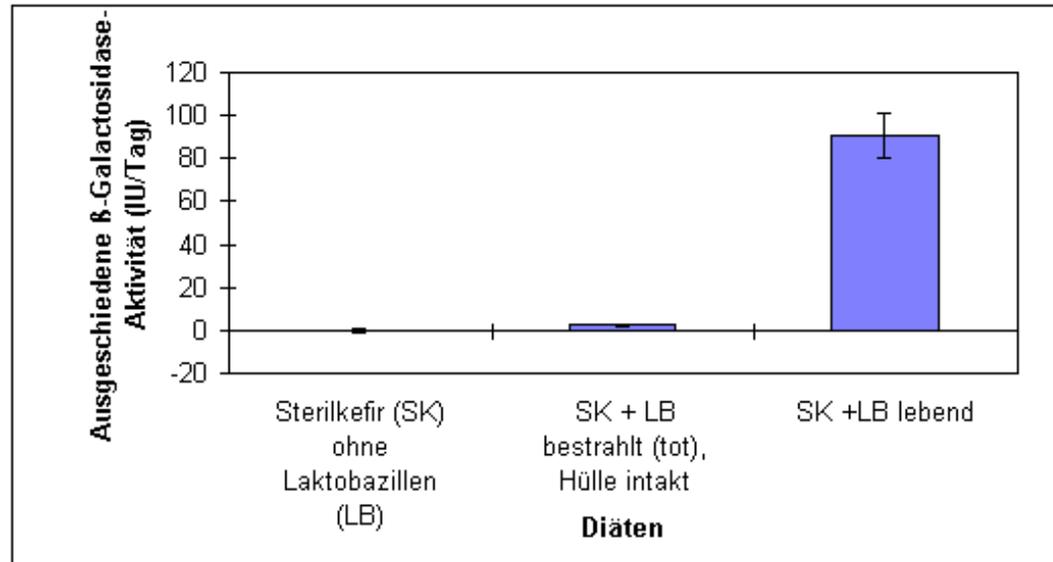
(s. auch Tab. 19 b; Abb. A 13 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

Abb. A 7: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (gesamt; mit Ultraschallbehandlung; Darstellung als $\log_{10}(1+x)$) gnotobiotischer Ratten nach Kefiraufnahme ohne/mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (o-NPG als Substrat); Dauer jeder Diätgabe: 2 Wochen; die Diätgabe erfolgte bei den Tieren nacheinander

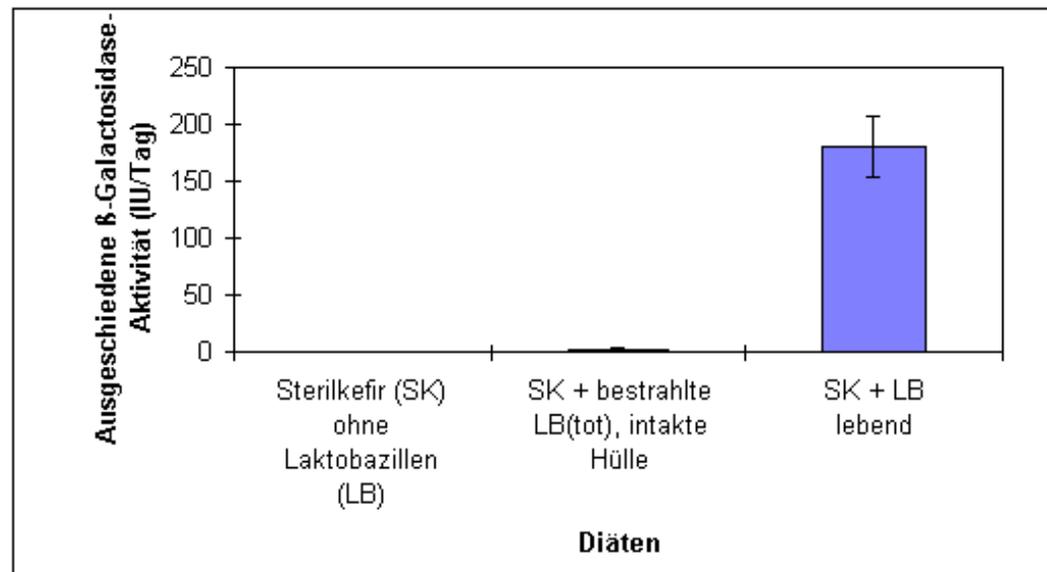
(s. auch Tab. 20 b und Abb. A 14 im Anhang) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$; n = 6

Abb. A 8 : Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (s. auch Tab. 14 c) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

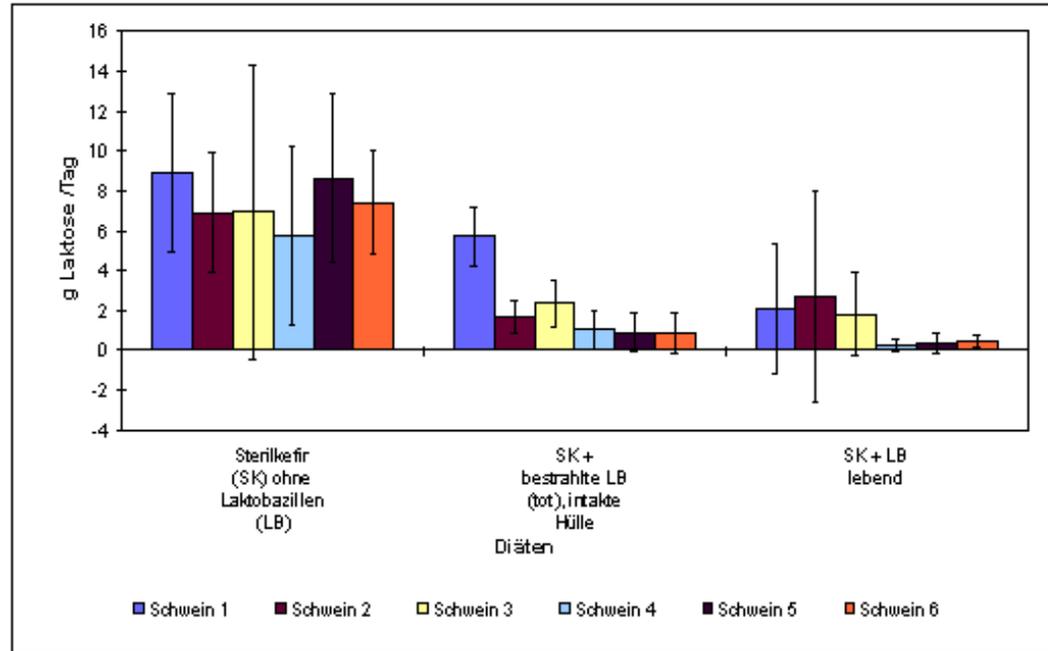


Abb. A 9: Durchschnittliche wahre, marker-korrigierte Verdaulichkeit der Laktose in % (bestimmt mit Cr-EDTA als Marker) bei gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (s. auch Tab. 15 c) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

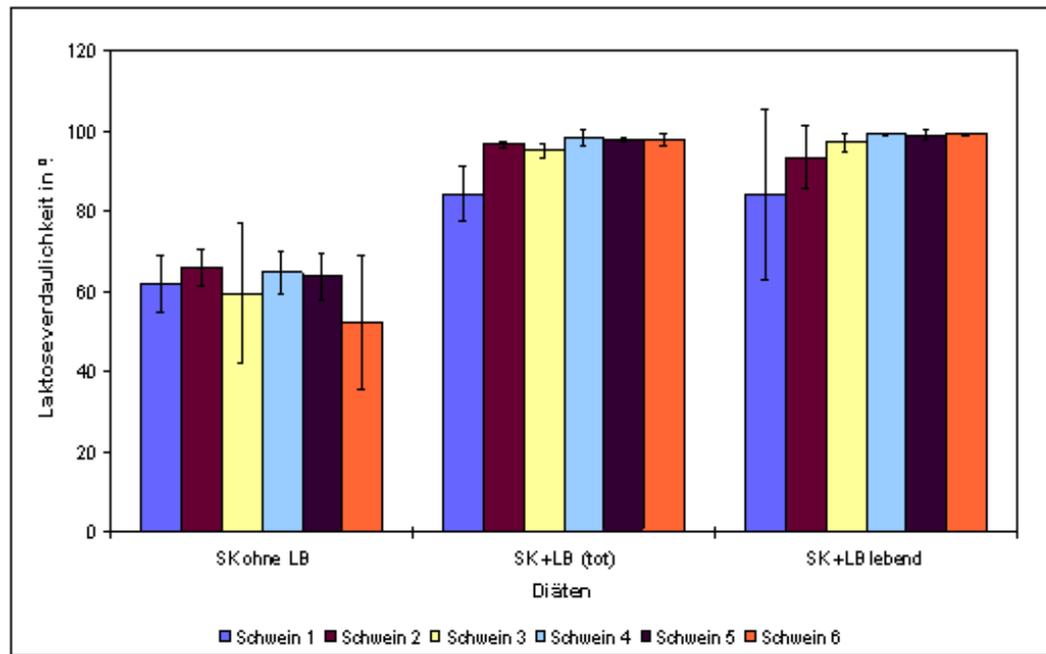


Abb. A 10: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) bei 6 einzelnen gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat)

(s. auch Tab. 16 c) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

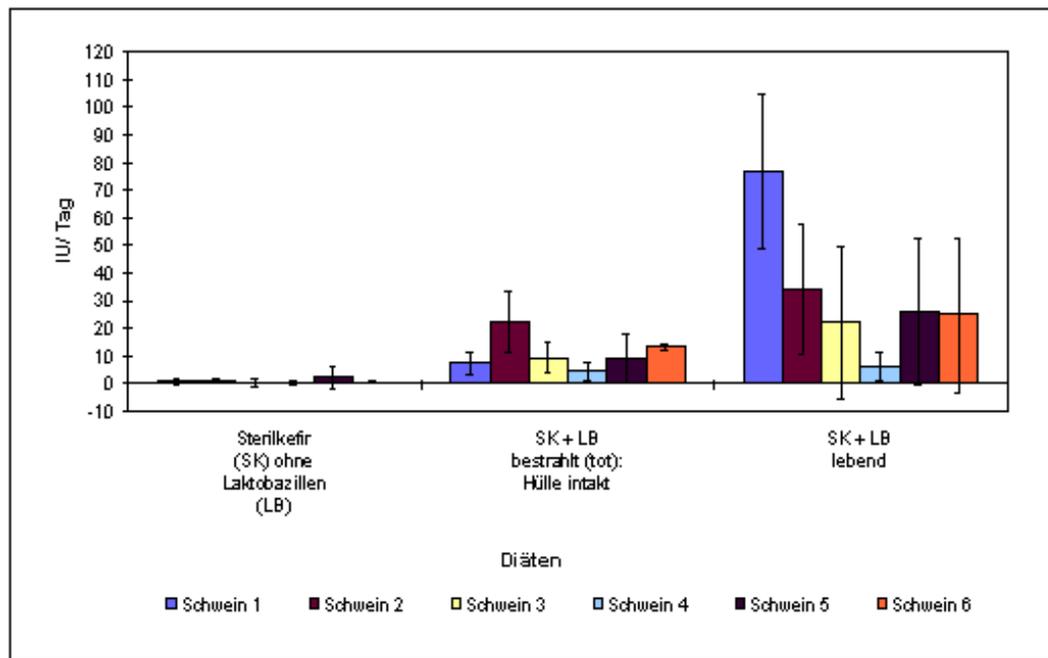


Abb. A 11: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung) bei 6 einzelnen gnotobiotischen Minischweinen nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat)

(s. auch Tab. 17 c) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

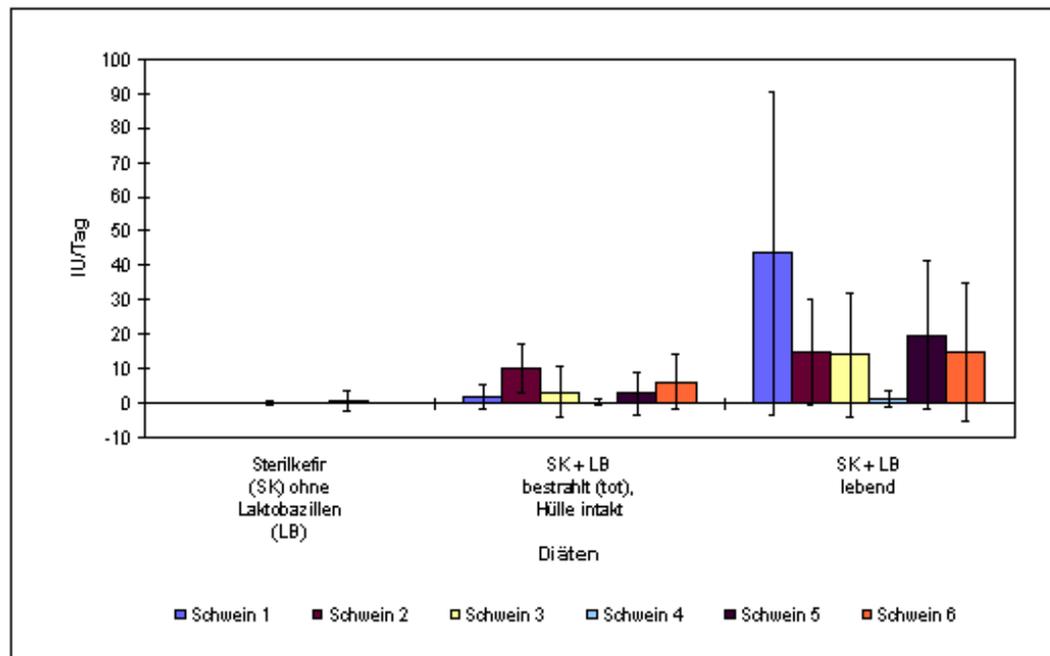


Abb. A 12: Durchschnittliche im Kot ausgeschiedene Laktosemenge bei gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen
(s. auch Tab. 18 c) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

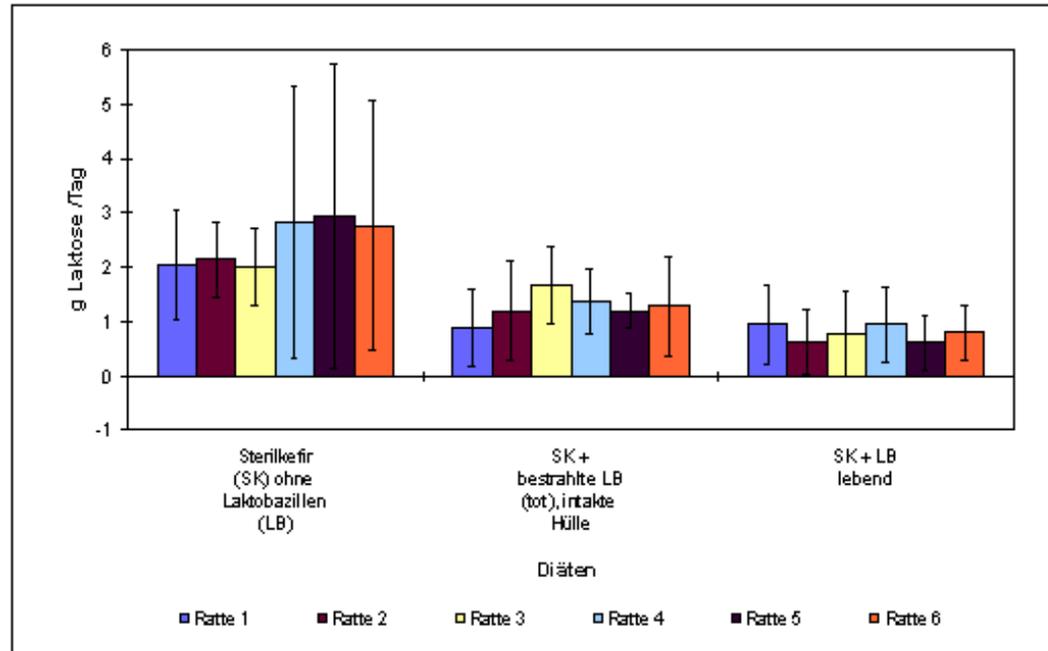


Abb. A 13: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (ohne Ultraschallbehandlung) bei 6 einzelnen gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat)

(s. auch Tab. 19 c) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$

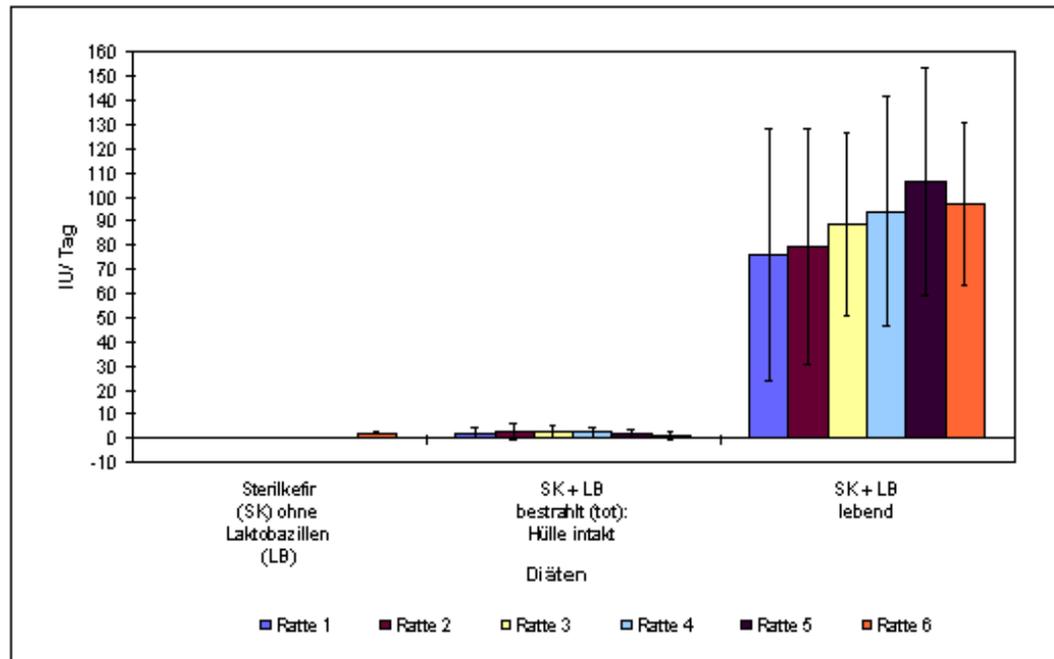
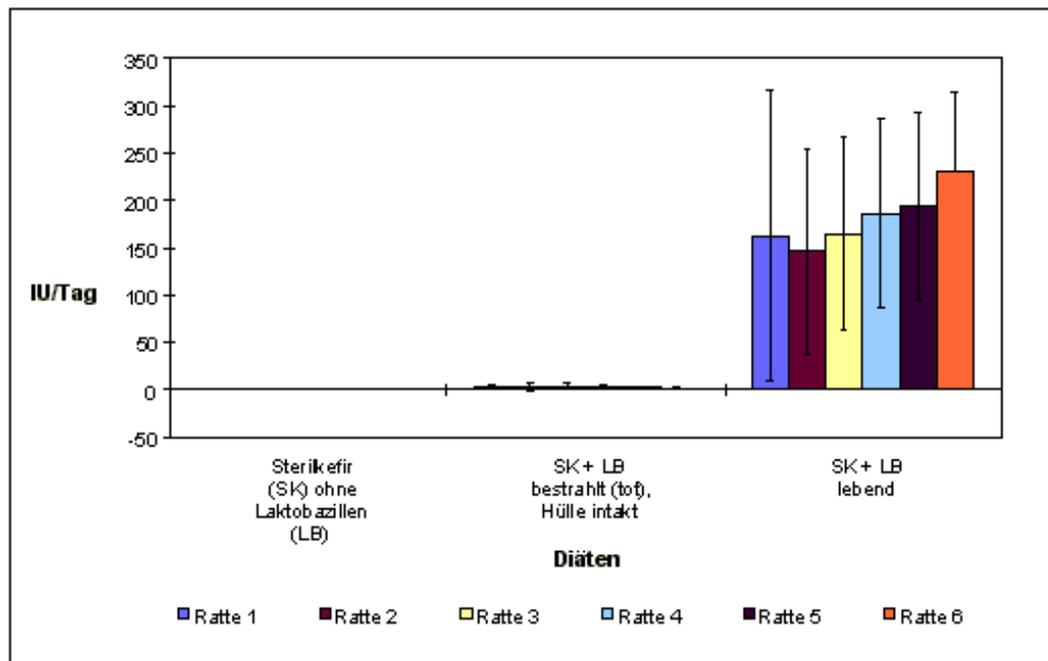


Abb. A 14: Durchschnittliche mit dem Kot ausgeschiedene β -Galactosidase-Aktivität (mit Ultraschallbehandlung) bei 6 einzelnen gnotobiotischen Ratten nach Kefiraufnahme ohne und mit lebenden bzw. inaktivierten Laktobazillen (bestimmt mit o-NPG als Substrat)

(s. auch Tab. 20 c) Werte = $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$



Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christian Barth für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung bei allen Arbeiten und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. med. vet. H.- C. Jühr vom Fachbereich Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin danke ich für seine kritische Durchsicht der Arbeit und für die grundlegende Unterstützung zum Abschluß der Arbeit.

Frau Dr. Angelika Lorenz danke ich für die zahlreichen wertvollen Diskussionen sowie für die Hilfe bei der Planung und Organisation der Untersuchungen.

Frau Dr. Arndt vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit, sowie für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Abteilung GAMI im Deutschen Institut für Ernährungsforschung, die mich bei der Durchführung meiner Untersuchungen tatkräftig unterstützten, ganz besonders möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen in der KFT der Abteilung GAMI, sowie Herrn Olaf Schmidt danken, ohne welche die Versuchsdurchführung technisch nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. Hungerbühler und Frau Darnstedt aus dem Hahn-Meitner-Institut/Berlin-Wannsee danke ich für die immer bereitwillige Entgegennahme der Proben zur Bestrahlung und für die vielen Ratschläge bezüglich der Bestrahlung mit γ -Strahlen.

Herrn Dr. Hennig aus dem Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere FB Ernährungsphysiologie "Oskar Kellner" möchte ich für die Überlassung der semi-synthetischen Diät für die Göttinger Minischweine danken.

Dr. Karl-Heinz Südekum und seinen Mitarbeitern im Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel gilt mein ganz besonderer Dank für die vielen Informationen, Gespräche und Ratschläge bezüglich des Markereinsatzes und die Geduld beim Bearbeiten meiner Proben.

Mein Dank gilt auch Dr. Waldmann und seinen Mitarbeitern von der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Bereitstellung der ersten gnotobiotischen Schweine.

Den Mitarbeitern der Firma Metall und Plastik gilt mein Dank für die Herstellung der Isolatoren nach unseren Vorschlägen, zuzüglich der kritischen Verbesserungsvorschläge.

Danken möchte ich auch der Versuchstierzucht Ellegaard für die gute Kooperation bei der Bereitstellung und Lieferung der gnotobiotischen Schweine, mit denen wir hervorragend arbeiten konnten.

Mein Dank gilt der Firma Müller/Aretsried für den teilweise zur Verfügung gestellten Kefir.

Ein spezieller Dank gilt den Boten, die mir bei der Fortsetzung der Arbeit behilflich waren, indem sie eine Verbindung zwischen Deutschland und Benin herstellten, ganz besonders dabei Ulli, die sich unglaublich für mich eingesetzt hat, genauso wie Volker, der mit technischer Unterstützung half.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die diese Arbeit und das vorhergehende Studium überhaupt ermöglicht hat. Zuletzt gilt mein spezieller Dank meinem Mann Max, der sich mit Geduld stets Zeit für unsere Tochter Caroline nahm und mir so erst die schriftliche Bearbeitung ermöglichte.

Lebenslauf:

-

Name: Andrea Winchenbach, geb. Titze
Geburtsdatum: 10.12.1964
Geburtsort: Salzhemmendorf
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung: 1971 - 1975 Grundschole am Kanstein Salzhemmendorf
1975 - 1984 Schiller-Gymnasium Hameln
Abschluß: Abitur

Studium: Wintersemester 1985/86 Studium der Lebensmitteltechnologie an der
-Sommersemester 1986 Technischen Universität Berlin
Wintersemester 1987/88 Studium der Veterinärmedizin an der Freien
-Sommersemester 1992 Universität Berlin
Examen: 23. 09. 1992

Berufliche 01.09.1993 - 31.12.1995 Doktorandin im Deutschen Institut für
Tätigkeit: Ernährungsforschung