

**Untersuchungen zur Bildung von Vitamin B₁₂ durch
Acetobacter pasteurianus und zur Co-Fermentation von Tofu
und Pflanzenmaterial durch *Propionibacterium freudenreichii*
und *Lactobacillus reuteri* für die Anreicherung mit Vitamin B₁₂**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg
Hamburg School of Food Science

vorgelegt von

Clemens Bernhardt

Hamburg 2019

1. Gutachter der Dissertation: Herr Prof. Dr. Bernward Bisping
2. Gutachter der Dissertation: Herr Prof. Dr. Markus Fischer
Datum der Druckfreigabe: 17.12.2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2013 bis August 2019 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Bernward Bispin an der Hamburg School of Food Science, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg, angefertigt.

Publikationsliste

***Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 produces cobalamin**

Clemens Bernhardt, Xuan Zhu, Bernward Bisping

New Biotechnology 31 (Supplement) S176-S176 (PR-02) (2014)

Alternativer Quellentitel: Abstracts of the 16th European Congress on Biotechnology

Co-fermentation of tofu and plant material by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271 and *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 for enrichment with vitamin B₁₂

Clemens Bernhardt, Timo Haase, Bernward Bisping

Poster ProcessNet-Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen (September 2016)

Co-fermentation of tofu and plant material by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271 and *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 for enrichment with vitamin B₁₂

Clemens Bernhardt

Vortrag 17. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie der VAAM (April 2017)

Can plant material be used to replace cobalt during co-fermentation of tofu by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and *Lactobacillus reuteri*?

Clemens Bernhardt

Vortrag Summerschool Current topics in Food Biotechnology (August 2017)

Cobalamin is produced by *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509

Clemens Bernhardt, Xuan Zhu, David Schütz, Markus Fischer, Bernward Bisping

Artikel in Applied Microbiology and Biotechnology (März 2019)

Inhaltsverzeichnis

Seite

Publikationsliste	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	10
Abstract	12
1 Einleitung und Literaturübersicht	14
1.1 Vitamin B ₁₂	14
1.2 Vitamin B ₉	18
1.3 Cobalt.....	18
1.4 Bakterien	20
1.4.1 <i>Acetobacter pasteurianus</i> DSM 3059	20
1.4.2 <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	21
1.4.3 <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i> DSM 20271	22
1.5 Tofu	23
1.6 Co-Fermentation und Vitamin-B ₁₂ -Produktion.....	25
1.7 Ziel der Arbeit	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Mikroorganismen.....	27
2.2 Medien zur Anzucht der Bakterien	28
2.3 Lösungen und Tofu für Fed-Batch-Fermentationen	31
2.4 Pflanzenmaterial.....	32
2.4.1 Bestimmung des Trockenmasseanteils.....	35
2.4.2 Gefriertrocknung.....	35
2.5 Zellzahlbestimmung.....	36
2.5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl	36
2.5.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	36
2.6 Prototrophietest	37
2.7 Amplifikation des Uroporphyrinogen-III-Synthase-Gens	37
2.8 Datenbankanalyse mit BlastKOALA	38
2.9 Batch-Fermentationen zur Corrinoid-Identifikation.....	38
2.9.1 Vorkultur und Inokulum.....	38
2.9.2 Hauptkultur der Batch-Fermentationen zur Corrinoid-Identifikation	39
2.10 Fed-Batch-Fermentationen von Tofu	39
2.10.1 Vorkultur und Inokulum.....	39
2.10.2 Hauptkultur im Schüttelkolben.....	40
2.10.3 Hauptkultur im Schüttelkolben mit Pflanzenmaterial	40
2.10.4 Hauptkultur im Schüttelkolben mit Pflanzenextrakten	40
2.10.5 Optimierung der Hauptkultur im Schüttelkolben mit Extrakten aus Kichererbsen	41

2.10.6	Scale-up der Fed-Batch-Fermentation	42
2.11	Bestimmung des Cobaltgehalts	45
2.11.1	Nasschemischer Verdau (Aufarbeitung)	45
2.11.2	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS-Analyse)	46
2.12	Bestimmung des Vitamin-B ₁₂ -Gehalts	46
2.12.1	Mikrobiologischer Vitamin-B ₁₂ -Test	46
2.12.1.1	Aufarbeitung der Proben für den mikrobiologischen Vitamin-B ₁₂ -Test	47
2.12.1.2	Aufarbeitung von Zellmaterial für den mikrobiologischen Vitamin-B ₁₂ -Test	47
2.12.1.3	Turbidimetrische Analyse	48
2.12.2	Extraktion von Corrinoiden für chromatographische Analysen	49
2.12.2.1	Extraktion und Aufreinigung mittels C ₁₈ -Festphase	49
2.12.2.2	Extraktion und Aufreinigung mittels Immunaффinitäts- chromatographie	50
2.12.2.3	Corrinoidextraktion aus Zellmaterial	50
2.12.2.4	Bestimmung von Wiederfindungsraten und Vergleich der Immunoaffinitätssäulen	50
2.12.3	Hochleistungsflüssigchromatographie Dioden-Array-Detektion (HPLC-DAD)	51
2.12.4	Ultrahochleistungsflüssigchromatographie Massenselektive-Detektion (UHPLC-MS)	53
2.13	Bestimmung des Gesamtfolatgehalts	53
2.13.1	Extraktion von Folaten	53
2.13.2	Turbidimetrische Analyse	54
2.14	Zucker und organische Säuren	55
2.14.1	Extraktion von organischen Säuren und von Glycerin	55
2.14.2	Extraktion von Zuckern und Ethanol	55
2.14.3	Hochleistungsflüssigchromatographie mit Brechungsindex-Detektion (HPLC-RI)	56
2.15	Auswertung und Statistik	57
2.15.1	Test auf Normalverteilung der Stichprobe nach David	57
2.15.2	Ausreißertest nach Dean Dixon	57
2.15.3	Test auf Varianzenhomogenität (F-Test)	58
2.15.4	Vergleich der Erwartungswerte (Zweistichproben- <i>t</i> -Test)	58
2.15.5	Vergleich der Erwartungswerte bei gepaarten Stichproben	58
2.15.6	Modellierung der Prozessergebnisse	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Untersuchungen zur Vitamin-B ₁₂ -Analyse mittels Immunaффinitätschromatographie	59
3.2	Bioinformatische Untersuchungen am <i>Acetobacter</i> Genom	60

3.3	Corrinoide-Analyse mit quantitativem mikrobiologischem Test.....	62
3.4	Identifikation der isolierten Corrinoide	62
3.5	Cobaltmessungen	71
3.6	Fed-Batch-Fermentationen von Tofu mit pflanzlichen Rohstoffen.....	74
3.7	Extraktionsversuche.....	76
3.8	Fed-Batch-Fermentationen von Tofu mit pflanzlichen Extrakten	77
3.9	Optimierung der Extraktion von Kichererbsen.....	81
3.10	Scale-up-Versuche	90
4	Diskussion	95
4.1	Bestätigung des Potentials zur Cobalamin-Synthese in <i>Acetobacter pasteurianus</i>	95
4.2	Corrinoide-Detektion und quantitativer mikrobiologischer Test	96
4.3	Trennung der Corrinoide und Messung der Absorptionsspektrenmittels HPLC-DAD ...	97
4.4	Identifikation von Vitamin B ₁₂ und Pseudovitamin B ₁₂ mittels Massenspektrometrie ..	97
4.5	Methodenetablierung.....	98
4.6	Cobalt.....	98
4.7	Fed-Batch.....	101
4.7.1	Tofu mit Zusatz von pflanzlichen Rohstoffen	101
4.7.2	Tofu mit Zusatz von pflanzlichen Extrakten	104
4.7.3	Optimierung der Extraktion von Kichererbsen für den Einsatz zur Fermentation mit Tofu	107
4.7.4	Fed-Batch Scale-up-Versuche	109
5	Literatur	113
6	Anhang	127
6.1	Formeln.....	127
6.1.1	Berechnung der Wiederfindungsrate	127
6.1.2	Ausreißertest nach Dean Dixon	127
6.1.3	Test auf Normalverteilung nach David	127
6.1.4	Vergleich zweier Varianzen (<i>F</i> -Test):	128
6.1.5	Vergleich der Mittelwerte (<i>t</i> -Tests)	128
6.2	Ergänzende Daten zur Modelberechnung:.....	129
6.3	Ergänzende Daten zur Suche orthologer Proteine	130
6.4	Auflistung der verwendeten Chemikalien und Gefahrenstoffe nach GHS (Gefahrensymbole, H- und P-Sätze)	131
6.5	Proben.....	133
6.6	Geräte.....	136
7	Danksagung	139
8	Eidesstattliche Versicherung	140

Abkürzungsverzeichnis

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar
bidest.	hochreines Wasser
bp	Basenpaare
Bre	Brechung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
d	Tag
CME	Cellulosemischester
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
ESI	Electronsprayionisation
F _{krit.}	kritische Grenze der Fischer-Verteilung
FM	Frischmasse
g	Gramm
h	Stunde
IAC	Immunaффinitätschromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry)
IFO	Institut für Fermentation, Osaka
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
KBE	koloniebildende Einheit
kg	Kilogramm
konz.	konzentriert
L	Liter
LGE	Säule mit Reservoir
LMG	Labor für Mikrobiologie der Universität Ghent
M	Molarität
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MHM	Mannitol-Hefeextrakt-Medium
min	Minute
mL	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMA	Methylmalonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. messenger ribonucleic acid)
MRS	de Man Rogosa Sharpe Medium
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µL	Mikroliter
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OQ	obere kritische Grenze
org.	organisch
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PES	Polyethersulfon
PG	Prüfgröße
PP	Polypropylen
ProM	Propionibakterien-Medium
PSB ₁₂	Pseudovitamin B ₁₂
Q ²	kreuzvalidiertes Bestimmtheitsmaß
Que	Quelldauer
R ²	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
s	Sekunde
Skt	Skalenteile
ssp.	Subspezies
SPE	Festphasenextraktionsäule (engl. solid phase extraction column)
spp.	Spezies pluralis
Temp	Temperatur
t _{krit.}	kritische Grenze der t-Verteilung
UpM	Umdrehungen pro Minute
UQ	untere kritische Grenze
V	Volumen
VB ₁₂	Vitamin B ₁₂
W	Gewicht
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
[?]	unbekannte Molekülformel

Zusammenfassung

Für eine vegane Lebensweise ist die Verfügbarkeit von Vitamin-B₁₂-Quellen eingeschränkt. Dies führt bei Veganern dazu, dass sie sehr viel weniger als die geschätzte angemessene tägliche Zufuhr für Erwachsene von 4 µg Vitamin B₁₂ pro Tag zu sich nehmen. Um diesem Problem entgegenzuwirken, war es das Ziel dieser Arbeit, eine neue pflanzliche Quelle für Vitamin B₁₂ zu erschließen und Tofu mit Pflanzenmaterial als festes Substrat submers zu co-fermentieren, um es so mit Vitamin B₁₂ anzureichern.

Da nur wenige cobalaminproduzierende Bakterienarten bekannt sind, welche sich für Lebensmittelfermentationen eignen, wurde der Stamm *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 analysiert. Es wurde durch die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen festgestellt, dass er die Fähigkeit besitzt, Cobalamin zu synthetisieren.

Ein Prototrophietest und eine zusätzliche genetische Untersuchung des Gens der Uroporphyrinogen-III-Synthase deuteten auf die Fähigkeit hin, Cobalamin synthetisieren zu können. Durch einen modifizierten mikrobiologischen Test auf Basis von *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20355 wurden 4,57 ng/mL Cyanocorrinoide und 0,75 ng/mL nicht-corrinoide Wachstumsfaktoren nachgewiesen. Das durch Immunitätschromatographie in Cyanidform extrahierte und isolierte Produkt hatte das gleiche UV-Spektrum wie der Cyanocobalamin Standard und Co α -[α -(7-adenyl)]-(Co β -cyano)-cobamid, auch bekannt als Pseudovitamin B₁₂. Dies wird von *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 hergestellt. Das chromatographisch getrennte Produkt von *A. pasteurianus* wurde einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Dort erwies sich sein Fragmentierungsmuster als zu dem von Cyanocobalamin äquivalent, das auch von *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271 produziert wird und sich deutlich von Pseudovitamin B₁₂ unterscheidet. Das Vorhandensein von *A. pasteurianus* in verschiedenen Lebensmittelprodukten, kann darin zur Cobalaminbildung führen.

Aufgrund der begrenzten Mengen an Vitamin B₁₂, die von *A. pasteurianus* gebildet wurden, wurde die Co-Fermentation von Tofu und Pflanzenmaterial mit *L. reuteri* und *P. freudenreichii* untersucht. Für die Prozessentwicklung wurden 68 essbare Pflanzen mit hohem Cobaltgehalt bzw. Artverwandte mittels ICP-MS auf ihren Cobaltgehalt hin analysiert. 49 Proben zeigten höhere Cobaltgehalte als der Tofu selbst. 41 davon wurden zusammen

mit Tofu in einem Glukose-Fed-Batch-Verfahren mit Zusätzen von Betain und Riboflavin co-fermentiert. Die elf Pflanzenmaterialien, die nach der Fermentation die höchsten Mengen an Vitamin B₁₂ lieferten, wurden mit heißem Wasser extrahiert und für die Fermentation verwendet. Für die schließlich ausgewählten *Cicer arietinum* L. Samen wurde ein Optimierungsexperiment der Extraktion durchgeführt, indem die Quellzeit, das Brechen von Kichererbsen und die Kochtemperatur variiert wurden. Ein Regressionsmodell konnte an die Ergebnisse der Vitamin-B₁₂-Gehalte angepasst werden, die zwischen 110 ng/mL und 171 ng/mL in der Fermentationsbrühe streuten. Das berechnete Modell besaß ein Kreuzvalidiertes Bestimmtheitsmaß von $Q^2 = 0,54$. Für die Ausbeute der Extraktion konnte ein Regressionsmodell mit einem Kreuzvalidierten Bestimmtheitsmaß von $Q^2 = 0,94$ berechnet werden.

Die Bioverfügbarkeit von Cobalt ist pflanzenspezifisch und kann nicht auf seine Konzentration reduziert werden. Die höchste Konzentration an Vitamin B₁₂, die während der Tofufermentation mit einem Kichererbsenextrakt erreicht wurde, betrug 0,171 µg/mL in der Fermentationsbrühe. Das entspricht dem Verzehr von 23 mL Fermentationsbrühe, um den Schätzwert für die angemessene tägliche Zufuhr bei Erwachsenen von 4 µg Cobalamin zu erreichen. Darüber hinaus ist es möglich, eine Vorhersage der Extraktausbeute während des Extraktionsprozesses für Kichererbsen zu treffen, so dass wirtschaftliche und ökologische Aspekte berücksichtigt werden können.

Abstract

The availability of vegan sources for vitamin B₁₂ is very limited. For vegans, this leads to daily intakes way below the presumed necessary amount for adults of 4 µg vitamin B₁₂ per day. To counter this problem the aim of this work was to unlock a new plant-based source of vitamin B₁₂ by co-fermenting tofu with plant material as a submerged solid substrate to enrich it with vitamin B₁₂.

As only a few cobalamin-producing bacterial species are known which are suitable for food fermentations, the strain *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 was investigated. It was found to have the capability to synthesize cobalamin. A survival test and a preliminary genetic study of the gene of uroporphyrinogen-III synthase indicated the ability to synthesize cobalamin. By a modified microbiological assay based on *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20355, 4.57 ng/mL of cyanocorrinoids and 0.75 ng/mL of noncorrinoïd growth factors were detected. The product extracted and isolated by immunoaffinity chromatography in its cyanide form had the similar UV spectrum as standard cyanocobalamin and Co α -[α -(7-adenyl)]-(Co β -cyano)-cobamide, also known as pseudovitamin B₁₂, produced by *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. The chromatographically separated product of *A. pasteurianus* was subjected to mass spectrometrical analysis. There, its fragmentation pattern turned out to be equivalent to that of cyanocobalamin produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271 and clearly differs from pseudovitamin B₁₂. Due to the presence of this species in several food products, there might be cobalamin in food fermented with these bacteria.

Owing to the limited amount of vitamin B₁₂ produced by *A. pasteurianus*, *L. reuteri* and *P. freudenreichii* were used for the co-fermentation of tofu and plant material. For the process development 68 edible plants with high reported cobalt content or related plants were screened by ICP-MS for their ability to deliver a cobalt source. 49 samples revealed higher cobalt concentrations than tofu itself. 41 of those were co-fermented with tofu in a glucose fed-batch process with the supplementation of betain and riboflavin. The 11 plant materials that resulted in the highest vitamin B₁₂ concentration after fermentation were extracted with hot water and used for fermentation. For the finally selected *Cicer arietinum* L. seeds an optimization experiment of the extraction was performed by varying the soaking time, the breaking of chickpeas, and the cooking temperature. A regression model could be fitted to

the optimization data for the results of vitamin B₁₂ that scattered between 110 ng/mL and 171 ng/mL in the fermentation broth with a cross-validated $Q^2 = 0.54$. For the yield of extraction a regression model could be fitted with a cross-validated $Q^2 = 0.94$.

The bioavailability of cobalt is plant dependent and cannot be reduced to its concentration. The highest concentration of vitamin B₁₂ achieved throughout the tofu fermentation with chickpea extract was 0.171 µg/mL in the fermentation broth. This corresponds to the intake of 23 mL fermentation broth to meet the presumed necessary amount for adults of 4 µg. Furthermore the prediction of extract yield during the extraction process is possible for chickpeas so economic and environmental considerations can be taken into account.

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Vitamin B₁₂

Die Geschichte von Vitamin B₁₂ beginnt mit der erfolgreichen Behandlung von megaloblastärer Anämie durch Verabreichung von Rinderleber im Jahr 1926 durch Minot und Murphy (Minot und Murphy 1926, 2001). 1948 wurde dann gleichzeitig von Smith und Rickes et al. aus der Leber ein anti-perniziöse-Anämie-Faktor extrahiert, der Cobalt als Zentralatom enthielt (Rickes et al. 1948, Smith 1948). Hodgkin et al. (1956) klärten schlussendlich die Struktur des Vitamins vollständig auf: Diese besteht aus einem Corrinring mit zentralem Cobaltion und einer Nucleotidschleife, die an α -Position koordinativ gebunden ist. Eine weitere Komponente ist die koordinativ in β -Position gebundene austauschbare Cyanogruppe (Abbildung 1a). Weitere typische β -Gruppen sind 5'-deoxy-adenosyl- und Methylgruppen, die für die im Menschen physiologisch aktiven Cofaktoren Adenosylcobalamin (Coenzym B₁₂) und Methylcobalamin charakteristisch sind (Fedosov 2012). Neben der β -Gruppe ist auch die Nucleotidgruppe, koordiniert an α -Position, variabel. Liegt diese Nucleotidgruppe mit der Base Dimethylbenzimidazol vor, so handelt es sich um Vitamin B₁₂ (Abbildung 1a, Cyanocobalamin). Im Fall von Adenin als Base wird das Molekül als Pseudovitamin B₁₂ bezeichnet (Abbildung 1b) (Kräutler und Ostermann 2003).

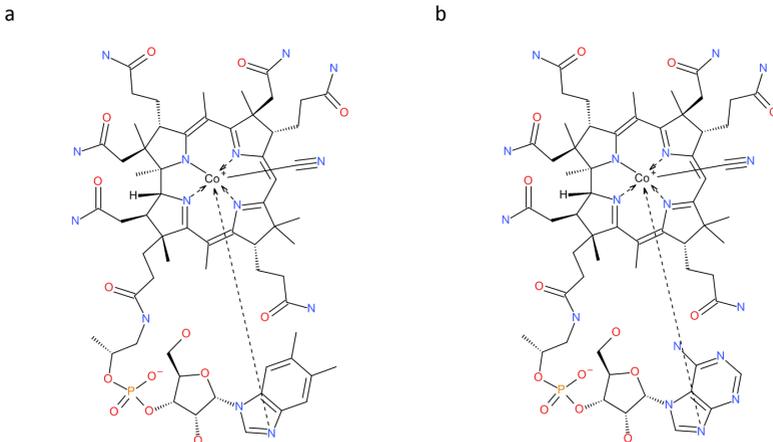


Abbildung 1: Repräsentative Strukturformeln der CN-Co(III)-Formen von vollständigen Corrinoiden (Cobamide, mit unterschiedlichen funktionellen Nucleotidgruppen), wie sie aus Kulturen von Bakterien isoliert werden können (Kräutler und Ostermann 2003). a) Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) und b) Pseudovitamin B₁₂

Die vielen möglichen Derivate, deren Empfindlichkeit gegenüber Licht sowie ihre geringen Konzentrationen in den Lebensmittelmatrices stellen hohe Anforderungen an die Analytik. Für die Quantifizierung von Vitamin B₁₂ wird häufig ein sehr sensibler mikrobiologischer Test (Hoffmann et al. 1949, Strohecker und Henning 1963, Chin 1985) verwendet, der allerdings auch auf diverse nicht-corrinoide Wachstumsfaktoren des auxotrophen Testorganismus anspricht (Friedrich 1975, Schneider und Stroński 1987). Außerdem werden ELISA-Methoden (Reichert und Rubach 1990, Selva Kumar und Thakur 2011) und mehrere flüssig-chromatographische Methoden eingesetzt. Sofern die Chromatographieanlagen mit Tandem-Massenspektrometern gekoppelt sind, können diese durch selektive Fragmentierung auch eine Identifikation der Derivate gewährleisten (Luo et al. 2006, Santos et al. 2007, Yi et al. 2012, Chamlagain et al. 2015, Deptula et al. 2015).

Die Größe und Empfindlichkeit des Moleküls macht seine Aufnahme in den Körper aufwendig, denn eine vorzeitige Zerstörung muss verhindert werden. Der Prozess der Aufnahme von Cobalaminen (Abbildung 2) beginnt bereits mit der Bindung verschiedener Derivate an Haptocorrinen des Speichels und des Magensafts (Nexø et al. 1988). An diese bleiben sie bis zu ihrer Ankunft im Zwölffingerdarm gebunden, wo sie sich pH-abhängig wieder lösen und mit dem intrinsischen Faktor einen Komplex bilden. Anschließend werden die Komplexe im Ileum vom Rezeptor Cubilin erkannt, über Endozytose aufgenommen und in den Lysosomen der Enterocyten gespalten. Das freiwerdende Cobalamin wird in die Blutbahn überführt. Dort sind wieder Haptocorrine vorhanden und Apo-Transcobalamine, die nach Bindung von Cobalamin (Holo-Transcobalamin) von Holo-Transcobalamin-Rezeptoren anderer Zellen erkannt und endozytotisch aufgenommen werden. Die Spaltung von Holo-Transcobalamin erfolgt ebenfalls in Lysosomen, wobei gleichzeitig Cyanocobalamin in die Derivate Methyl- und Adenosylcobalamin als Cofaktoren für die enzymatischen Reaktionen umgewandelt wird (Gruber et al. 2011, Fedosov 2012).

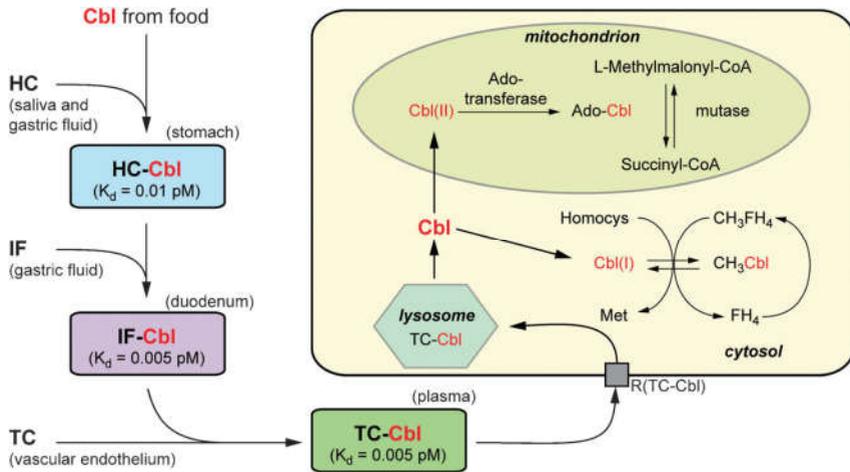


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aufnahme und des Transports von Cobalamin (Cbl) in Säugetieren aus Gruber et al. (2011). Mit der Nahrung aufgenommene Cobalamin wird von Haptocorrin gebunden, bis zum Zwölffingerdarm transportiert und pH-abhängig freigesetzt. Dort erfolgt die Bindung an den intrinsischen Faktor (IF), der die Cobalamine rezeptorvermittelt endozytotisch durch das Endothel ins Blutplasma transportiert. Dort erfolgt die Bindung der Cobalamine an Transcobalamin (TC). Dieses wird ebenfalls rezeptorvermittelt ($R(\text{TC-Cbl})$) in die Zellen aufgenommen, um dort wiederum in den Lysosomen gespalten zu werden. Die dabei entstehenden Derivate Methylcobalamin und Adenosylcobalamin fungieren in Cytosol und den Mitochondrien als Cofaktor. (Homocys = Homocystein, Met = Methionin, FH_4 = Tetrahydrofolat, CH_3FH_4 = Methyltetrahydrofolat).

Im Vergleich zu Vitamin B_{12} konnten Stupperich und Nexø (1991) bei Pseudovitamin B_{12} niedrigere Bindungsaffinitäten zu Transcobalamin und erst recht zum humanen intrinsischen Faktor feststellen, wodurch diese beiden Transportmoleküle als Flaschenhals und Filter bei der Aufnahme und der Verteilung im menschlichen Körper anzusehen sind. Bei der Bindung an Haptocorrinen wurde kein Unterschied festgestellt. Daher ist davon auszugehen, dass Pseudovitamin B_{12} dessen Bindungsstellen als kompetitiver Antagonist besetzen kann und diese für Vitamin B_{12} folglich nicht mehr zur Verfügung stehen.

Cobalamin (Vitamin B_{12}) wird für eine Vielzahl biochemischer Funktionen benötigt: DNA-Synthese und -Regulation, Fettsäureabbau sowie Aminosäure-Metabolismus. Vitamin B_{12} kann bei der Therapie von perniziöser Anämie verwendet werden, einer fatalen Krankheit der roten Blutkörperchen (Schneider und Stroiński 1987). Vitamin- B_{12} -Mangel ist weltweit ein häufiges Phänomen, welches das Risiko für Demyelinisierung der Axone von Nerven-

zellen und perniziöse Anämie erhöht (Stabler und Allen 2004). Durch geringere tägliche Vitamin-B₁₂-Zufuhr über die Nahrung sind im Besonderen Vegetarier und Veganer betroffen. Die Ergebnisse der deutschen Vegan-Studie zeigten, dass nur 2 – 5 % der Teilnehmer die damals empfohlene Tagesdosis von 3,0 µg am Tag erreichten (Waldmann et al. 2003). In der Folge wurde auch gezeigt, dass die Dauer veganer Ernährung negativ mit der Blut-Cobalamin-Konzentration korreliert, während eine positive Korrelation mit der Homocystein-Konzentration gefunden wurde (Waldmann et al. 2007). Davey et al. (2002) fanden in einer Studie mit 65.429 Teilnehmern heraus, dass Veganer durchschnittlich 0,4 µg Vitamin-B₁₂ pro Tag zu sich nahmen, verglichen mit dem Mittelwert aller Gruppen von 5,2 µg/d. Abhängig von den eingesetzten diagnostischen Kriterien ist bei 3 – 40 % der älteren Bevölkerung eine unzureichende Versorgung mit Vitamin B₁₂ zu verzeichnen (Baik und Russell 1999). Um einem Vitamin-B₁₂-Mangel vorzubeugen, greifen Veganer daher häufig zu Nahrungsergänzungsmitteln. Im Verlauf der deutschen Vegan-Studie mit 154 Freiwilligen nahmen 71 Personen Nahrungsergänzungsmittel zu sich, wobei keinerlei Abhängigkeit von Alter oder Geschlecht festgestellt werden konnte (Waldmann et al. 2003). Auch eine Kohorten-Studie unter Frauen im Vereinigten Königreich mit 13.822 Teilnehmern fand einen Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von Nahrungsergänzungsmitteln und Vegetarismus oder Veganismus (Kirk et al. 1999).

Sind die Cobalaminreserven erst einmal aufgebraucht – wie etwa nach einer makrobiotischen Ernährung in jungen Jahren –, so ist die Wiedererlangung einer gesunden Cobalamin-Konzentration im Blut durch Standardernährung ohne zusätzliche Zufuhr zwar erreichbar, jedoch ist auch nach 3 – 9 Jahren noch häufig ein funktionaler Mangel mit erhöhten Konzentrationen von Methylmalonsäure (MMA) und Homocystein (tHcy) feststellbar (van Dusseldorp et al. 1999). Die deutsche Gesellschaft für Ernährung hat jüngst ihren Schätzwert für die angemessene tägliche Zufuhr bei Erwachsenen von 3 µg auf 4 µg/d erhöht. Sie gibt diesen aber nicht mehr als empfohlene Tagesdosis an, da der genaue Bedarf anhand der vorhandenen Datenbasis nicht exakt eingeschätzt werden kann (DACH 2018). Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) schlägt aktuell Höchstmengen von 25 µg/d für die Aufnahme von Vitamin B₁₂ vor, wobei auch bei zusätzlicher Aufnahme von bis zu 100 µg/d bislang keine unerwünschten Wirkungen bekannt sind (Weißenborn et al. 2018). Bis zu dieser Menge wird von einer Unbedenklichkeit bei Personen ab 15 Jahren ausgegangen.

1.2 Vitamin B₉

Mit dem Begriff Vitamin B₉, gelegentlich auch als Vitamin B₁₁ bezeichnet, werden Folsäure (Pteroylglutaminsäure) und Folate zusammengefasst. Es handelt sich in dieser Gruppe um strukturell verwandte Verbindungen, welche eine ähnliche biologische Aktivität wie Folsäure besitzen. Folate können mehrere Glutamylreste besitzen und werden nach deren Anzahl benannt (PteGlu_n) (Burgess et al. 2009). Die wichtigste Rolle spielen Folate bei der DNA-Synthese als Cosubstrat der Methioninsynthase (Abbildung 2). Das gebildete Methionin wird zum großen Teil in S-Adenosylmethionin umgewandelt, einem universellen Donor von Methylgruppen für DNA, RNA, Hormone, Neurotransmitter und Membranlipide.

Folate werden von Mikroorganismen und Pflanzen produziert (Burgess et al. 2009). Unter den produzierenden Stämmen befinden sich *Lactobacillus* spp. und *Propionibacterium* spp. und deren Produktivität ist je nach Stamm und Kulturbedingungen spezifisch (Lin und Young 2000, Sybesma et al. 2003, Hugenschmidt et al. 2010). Säugetiere nehmen Folate hauptsächlich aus Hülsenfrüchten, grünem Blattgemüse, Getreide und Früchten sowie tierischen Produkten auf (USDA 2019). Aufgrund des gemeinsamen Stoffwechselweges kann eine sehr hohe Folataufnahme einen Vitamin B₁₂ Mangel kaschieren (Johnson 2007). Eine Folatunterversorgung kann, wie auch eine Vitamin-B₁₂-Unterversorgung, zur perniziösen Anämie und zu Neuralrohrdefekten führen. Daher sieht die WHO einen Vitamin-B₁₂- und Vitamin-B₉-Mangel als Gesundheitsproblem für Millionen von Menschen an (de Benoist 2008).

1.3 Cobalt

Cobalt ist in Spuren in vielen Lebensmitteln vorhanden und die tägliche Zufuhr über die Nahrung wird auf etwa 0,005 – 0,029 mgCo/d eingeschätzt (EFSA 2012). In größeren Mengen wird Cobalt häufig in Schokolade gefunden (Noël et al. 2012); desweiteren in tierischen Produkten, wobei ein Teil davon als Zentralatom des Vitamin-B₁₂-Moleküls vorhanden ist.

Die Aufnahme von Cobalt in die Pflanzen erfolgt aus dem Boden. Hierbei liefern Gesteine als Ausgangsmaterialien die Grundlage für den Cobaltgehalt der jeweiligen Böden. Ihre Gesamtcobaltgehalte spannen sich von 0,05 – 300 mg/kg mit im Mittel 10 – 15 mg/kg, wobei die Verteilung des vorhandenen Cobalts im Bodenprofil in Zonen mit organischem Material und Tonen ihren Schwerpunkt besitzt (Aubert und Pinta 1977). Cobalt kommt hauptsächlich ionisch in Cobalterzmineralien oder in Ferromagnesiummineralien vor, wobei in letzteren

das Hauptkation Mg^{2+} isomorph durch Co^{2+} substituiert sein kann. Diese Mineralien liegen meist in basischen Gesteinen vor. In sauren Gesteinen wie Granit sind Ferromagnesiummineralien nur selten zu finden, daher weisen solche Gesteine nur sehr geringe Cobaltgehalte auf (Smith und Paterson 1999). Neben der Präsenz von Cobalt im Boden als grundsätzlicher Voraussetzung bestimmen folgende Faktoren die in einem Pflanzenteil vorhandene Menge an Cobalt: seine Konzentration in der Bodenporenlösung, die Beweglichkeit aus dem umliegenden Boden zur Wurzel hin, die Aufnahme der Ionen von der Wurzeloberfläche ins Innere sowie der Transfer in die übrigen Pflanzenteile (Alloway 1999). Außerdem wurden für die Ionen Eisen und Mangan im Speziellen auch antagonistische Effekte bei der Aufnahme von Cobalt berichtet (Kabata-Pendias und Pendias 2001). Relevant könnte auch sein, dass verschiedene Adsorbenzien im Boden unterschiedliche Aufnahmespezifitäten (Selektivitätsfolgen) für einzelne Metalle aufweisen (Alloway 1999).

Andrews (1966) konnte zeigen, dass sich zwar die Cobaltgehalte unterschiedlicher Spezies auf cobaltreichen Böden unterscheiden, sich gleichzeitig aber auf cobaltarmen Böden die Unterschiede zwischen den Spezies verringern. Klocke et al. (1984) berechneten als Boden-Pflanzen-Transferquotient für Cobalt einen groben Richtwert von 0,01 – 0,1. Die einzige bekannte Funktion von Cobalt in Pflanzen beschränkt sich auf dessen Rolle in Bakterien, die in Wurzelknöllchen von stickstofffixierenden Pflanzen existieren. Diese Mikroorganismen nutzen Cobalt als Zentralatom von Vitamin B_{12} in ihren stickstofffixierenden Enzymen (Taiz und Zeiger 2010). Daher sind Pflanzen, die keinen Stickstoff fixieren oder bereits ausreichend damit versorgt sind, nicht auf Cobalt angewiesen. Zudem sind Co^{2+} -Ionen dazu in der Lage, die Ethylensynthese in Pflanzen zu inhibieren. Aus diesem Grund sind sie in höheren Konzentrationen schädlich für Pflanzen (Taiz und Zeiger 2010). Wiederkäuer nehmen Cobalt über Pflanzen auf. Zum Beispiel bei Kühen kann ihr Bedarf anhand der Methylmalonsäure-Plasmakonzentration abgeschätzt werden (Stangl et al. 2000). Aus einer Unterversorgung, hervorgerufen durch Cobaltmangel im Boden, resultiert, einhergehend mit einer schlechteren Fermentation des Speisebreis im Rumen, ein Vitamin- B_{12} -Mangel bei Kühen (Ortigue-Marty et al. 2005). Cobaltzugabe, bei kontinuierlicher In-vitro-Fermentation von mikrobiellen Konsortien aus dem Rumen von Kühen, erhöht deren Vitamin- B_{12} -Gehalt (Tiffany et al. 2006). Ein Bestandteil dieser Konsortien sind Propionibakterien (Vyas et al. 2014), die auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden.

1.4 Bakterien

Trotz des Nährstoffbedarfs an Cobalamin aufseiten aller Tiere und Protisten (Martens et al. 2002), können nur Bakterien und Archaeen Cobalamin produzieren. Obwohl von Pflanzen nicht benötigt, kann Vitamin B₁₂ in die Pflanze diffundieren, wenn es in hoher Konzentration in der Bodenlösung vorhanden ist. Dies wurde anhand von Gartenkresse *Lepidium sativum* L. demonstriert (Lawrence et al. 2018). Perlman berichtete, dass bei Bakterien die Genera *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Protaminobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Streptococcus* und *Xanthomonas* in der Lage sind, Vitamin B₁₂ zu produzieren (Perlman 1959). Einige Spezies stellten sich als besonders nützlich für die Vitamin-B₁₂-Produktion heraus. So sind zum Beispiel *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* und *Pseudomonas denitrificans* aufgrund ihrer natürlichen hohen Vitamin-B₁₂-Produktivität in Verbindung mit schnellem Wachstum für die Nahrungsmittelindustrie von besonderem Interesse.

Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ erfolgt entweder über einen sauerstoffabhängigen oder über einen sauerstoffunabhängigen Stoffwechselweg. Die Gene des sauerstoffabhängigen Wegs tragen das Prefix *cob* und die des unabhängigen Wegs das Prefix *cbi*. Die Regulation der Corrinoid-Biosynthese erfolgt bei den meisten Bakterien über einen Riboswitch (Nahvi et al. 2004). Diese cis-Regulation erfolgt auf der mRNA des *cbi*-Operons (Moore et al. 2014). In *Bacillus megaterium* wird die mRNA dieses Operons bereits ab einer Konzentration von 5 nM Cobalamin durch den Riboswitch stillgelegt (Moore et al. 2014). Die genauen Schwellenwerte für diese Art der Regulation sind je nach Derivat und Organismus unterschiedlich (Johnson et al. 2012). Eine weitere Form der Regulation des Operons stellten Moore et al. (2014) durch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Cobalt fest und begründeten dies mit der Anwesenheit einer Chelatase auf dem Operon, welche den toxischen Effekten von Cobalt entgegenwirken könne.

1.4.1 *Acetobacter pasteurianus* DSM 3059

In der Familie der *Acetobacteriaceae* ist nur das Genus *Gluconobacter* als Vitamin-B₁₂-Produzent bekannt. Über die Vitamin-B₁₂-Produktion des Stammes *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 berichteten Kato et al. (1968). Nach dem Stand der Information gibt es keinen an-

deren Bericht über Cobalaminsynthese in Essigsäurebakterien. Allgemein sind Essigsäurebakterien obligate Aerobier, die von Gemüse, sauren Früchten, Essig, Bier, Wein und anderen fermentierten Lebensmitteln isoliert werden können. *Acetobacter* spp. Stämme werden häufig zur Produktion von Essig genutzt (Sievers et al. 1992). Eine einzigartige Eigenschaft dieser gramnegativen Gattung *Acetobacter* ist die Oxidation von Ethanol zu Essigsäure und weiter zu Kohlendioxid und Wasser (Kanchanarach et al. 2010). Eine Charakteristik des Genus *Acetobacter* ist die Oxidation von Milch- und Essigsäure, die im Unterschied dazu beim Genus *Gluconobacter* nicht vorhanden ist (Sievers und Swings 2005). Jedoch ist die Anwesenheit von Essigsäurebakterien nicht immer gern gesehen: ihre Fähigkeit, Essigsäure aus Ethanol zu produzieren, ist das Hauptproblem bei kontaminiertem Wein (Silva et al. 2006). Einige Stämme von Essigsäurebakterien wurden auch mit Bierverderb in Verbindung gebracht. Im Gegensatz dazu ist die Präsenz einiger Spezies in Anwendungen wie Kakaobohnenfermentationen nicht nur erwünscht, sondern ihre Säureproduktion für das Absterben des Kakaosamens (Quesnel 1965) sowie für die Aromaentwicklung durch die Beschleunigung der Proteaseaktivität notwendig (Voigt et al. 1994). Bei spontanen Kakaofermentationen ist das Genus *Acetobacter* das häufigste unter den Essigsäurebakterien (Passos und Passos 1985, Ardhana und Fleet 2003, Camu et al. 2007, Lagunes Galvez et al. 2007, Nielsen et al. 2007, Papalexandratou et al. 2011, Papalexandratou et al. 2013, De Vuyst und Weckx 2016). Daher wird dieses Genus auch bei der Entwicklung von Starterkulturen für Kakaofermentationen bevorzugt verwendet (Lefeber et al. 2012, Crafacek et al. 2013, Moens et al. 2014, De Vuyst und Weckx 2016). In einigen Studien wurde auch das Vorkommen von *Acetobacter* spp. in mikrobiellen Gemeinschaften von Sauerteig berichtet (Scheirlinck et al. 2008, Vogelmann et al. 2009, Minervini et al. 2012, Ripari et al. 2016).

1.4.2 *Lactobacillus reuteri* DSM 20016

Milchsäurebakterien sind eine heterogene Gruppe grampositiver, nicht-sporulierender, mikroaerophiler, kokkoider bis stäbchenförmiger Bakterien mit Laktat als Hauptfermentationsprodukt aus Kohlenhydraten (Kandler 1983). *Lactobacillus reuteri* wurde zunächst von Lerche und Reuter aus dem menschlichen Darm isoliert (Lerche und Reuter 1962) und durch Kandler et al. (1980) von anderen heterofermentativen Stämmen wie *Lactobacillus fermentum* auf DNA-Ebene und durch die Präsenz von Rhamnose im Hydrolysat der Peptidoglykanschicht klar unterschieden. Als heterofermentatives Milchsäurebakterium nutzt *Lactobacillus*

reuteri DSM 20016 im Gegensatz zu anderen *L. reuteri* Stämmen, in Anwesenheit von Glukose, nahezu ausschließlich den Phosphoketolaseweg zur Energiegewinnung. Dabei entstehen Laktat und Ethanol (Burgé et al. 2015). Unter Anwesenheit eines anderen Kohlenhydrates wie etwa Fruktose, die als Elektronenakzeptor genutzt werden kann, wird aus dieser Mannitol gebildet, um ein Reduktionsäquivalent (NADH) zu recyceln (Arskold et al. 2008). Diese Fähigkeit ermöglicht die Acetatbildung, während derer ein weiteres ATP generiert wird und zwei statt nur einem Mol ATP pro Mol Glukose über den Phosphoketolaseweg gewonnen werden können. Über *Lactobacillus reuteri* (Taranto et al. 2003) und *Lactobacillus plantarum* (Madhu et al. 2010) wurde berichtet, dass diese Cobalamin synthetisieren. Im Falle des heterofermentativen Milchsäurebakteriums *Lactobacillus reuteri* wurde das Molekül als Coa-[α -(7adenyl)]-(Co β -cyano)cobamid identifiziert, welches ebenso als Pseudovitamin B₁₂ bekannt ist (Santos et al. 2007). Selbst bei Verfügbarkeit anderer Vorläufersubstanzen für den α -Liganden im Kulturmedium wird ausschließlich Pseudovitamin B₁₂ gebildet (Crofts et al. 2013). Sollte zukünftig ein Stamm zur Verfügung stehen, der eine andere Base (Dimethylbenzimidazol) als α -Ligand in das Molekül einfügt, so kann dieser für eine weitere Entwicklung eingesetzt werden.

1.4.3 *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271

Die grampositiven, stäbchenförmigen *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* produzieren Propionsäure und werden bei der Käseproduktion eingesetzt (Piveteau 1999). *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* wurde klassischerweise biochemisch durch seine Nitratreduktaseaktivität und die Unfähigkeit Laktose zu verwerten von *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* unterschieden. Die Existenz anderer möglicher Phänotypen (ca. 25 %) veranlassten Dalmaso et al. (2011) dazu, 125 Stämme mittels Multilocus Sequence Typing zu klassifizieren. Sie bestätigten damit, dass eine Aufteilung in Subspezies auf Basis der phänotypischen Kriterien nicht sinnvoll sei. Ebenso zeigten de Freitas et al. (2015), dass die Aromaprofile der einzelnen Stämme sich nicht innerhalb der Subspezies gruppieren ließen.

Propionibacterium spp. verwerten eine ganze Reihe von Substraten und besitzen niedrige Anforderungen an ihre Umwelt (Thierry et al. 2011). Sie verwerten Laktat über den Methylmalonyl-CoA-Weg (Wood-Werkman-Zyklus): Aus 3 Mol Laktat entstehen 1 Mol Essigsäure

und Kohlendioxid sowie 2 Mol Propionat (Piveteau 1999, Patrick und McDowell 2012). Laktat wird zu Pyruvat oxidiert. Die anschließende Schlüsselreaktion ist eine Transcarboxylierung, bei der eine Carboxylgruppe von Methylmalonyl-CoA auf Pyruvat unter Bildung von Oxalacetat und Propionyl-CoA ohne ATP-Verbrauch übertragen wird. Oxalacetat wird durch die Enzyme des Citratzyklus in Succinat überführt, womit bei der Reaktion von Fumarat zu Succinat ein ATP gebildet wird. Succinat wird weiter in Succinyl-CoA umgewandelt. Gleichzeitig entsteht beim Transfer des Coenzym A Propionat aus Propionyl-CoA. Succinyl-CoA wird anschließend von einer Coenzym-B₁₂-abhängigen Methylmalonyl-CoA-Mutase zu Methylmalonyl-CoA isomerisiert. Dieser zyklische Prozess ist für das Genus einzigartig. Die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts wird gewährleistet, indem Pyruvat zu Acetat und CO₂ oxidiert wird. Der Anteil des Pyruvats, welches jeweils einer Reduktion bzw. einer Oxidation zugeführt wird, ist substratabhängig, stammspezifisch und wird von den vorliegenden Umweltfaktoren beeinflusst (Thierry et al. 2011).

Bei *P. freudenreichii* erfolgt die Produktion von Coenzym B₁₂ über den anaeroben Stoffwechselweg. Der Einsatz dieser Bakterien zur Fermentation von Pflanzenmaterial wurde bereits näher betrachtet. Zum Beispiel nutzten Babuchowski et al. (1999) sowie Bickers und Bärwald (1994) *Propionibacterium* spp., um verschiedene Gemüsesäfte und Salate mit Vitamin B₁₂ anzureichern. Malzmatrices und verschiedene Brotteige wurden auch schon erfolgreich mit Vitamin B₁₂ durch Fermentation mit *Propionibacterium* spp. angereichert (Deptula et al. 2017, Chamlagain et al. 2018).

1.5 Tofu

Der Rohstoff für die Produktion von Tofu ist der getrocknete Samen der Sojabohne *Glycine max* (L.) MERR. Die annuelle, strauchig bis ca. 80 cm hoch wachsende, borstig behaarte Pflanze wurzelt tief und trägt drei- bis fünfzählige Blätter mit eiförmigen Blättchen. Ihre kleinen, weiß bis lilafarbenen Schmetterlingsblüten entspringen den Blattachseln an kurzen Stielen und besitzen eine Neigung zur Selbstbestäubung. Daraus wachsen kurze, braungelbe behaarte Hülsen mit je 2 – 3 weißen, gelben oder braunen Samen heran (Liu 1997, Lieberei und Reisdorff 2012) (Abbildung 3).



Abbildung 3: Soja aus Lieberei und Reisdorff (2012). a) Reife Hülsenfrüchte b) Samen

Die Samen liefern etwa 37 % Eiweiß sowie 6,3 % verdauliche Kohlenhydrate und enthalten ca. 18 % Öl. Damit haben sie eine große Bedeutung als Öl- und Eiweißquelle. Als Öllieferant wird Soja häufig bei der Margarineherstellung eingesetzt. Daneben sind Miso, Natto, Sufu, Sojajoghurt und Tempe als fermentierte Lebensmittel bekannt. Zur Herstellung von Tofu werden Sojabohnen eingeweicht, gemahlen und gekocht. Anschließend wird der Sud zentrifugiert, es werden die festen Bestandteile abgetrennt und zuletzt wird die Sojamilch weiterverarbeitet. Mittels Nigari, einem Salz, dessen Hauptbestandteile Magnesiumchlorid und Calciumsulfat sind, werden die gelösten Proteine und emulgierten Fette ausgeflockt. Alternativ kann dies mittels Zitronensäure erzielt werden. Die Flocken werden abgeschöpft oder durch Filtration entfernt und anschließend gepresst (Shurtleff und Aoyagi 1985). Übrig bleibt die Tofumolke, die wie die Molke aus der Käseherstellung aufgrund des hohen chemischen Sauerstoffbedarfs aufwendig entsorgt werden muss (Bullerman und Berry 1966).

Bei genauerer Betrachtung der Fällung wurde festgestellt, dass getrocknete Sojabohnen ca. 33 – 37 % Proteine enthalten und etwa 68 – 76 % davon im Tofu wiedergefunden werden (Wang und Cavins 1988, Zarkadas et al. 2007). Nach Analyse des Aminosäureprofils von Sojabohnen kamen Zarkadas et al. (2007) zu dem Schluss, dass, abgesehen von Methionin, alle essentiellen Aminosäuren in ausreichendem Anteil in der Sojabohne vorhanden sind. Dieser Nachteil im Aminosäureprofil kann jedoch mit dem Verzehr von Getreide wieder aus-

geglichen werden, da sich die Aminosäureprofile von Leguminosen und Getreide ergänzen (Young und Pellett 1994).

Aus ökologischer Sicht bietet die Produktion von Tofu gegenüber der von Fleisch einige Vorteile. Der Wasserverbrauch „water footprint“ pro produzierter Kalorie und pro Gramm Protein ist bei Leguminosen um den Faktor 1,8–8,5 bzw. 3–6 geringer (Mekonnen und Hoekstra 2012, Vanham et al. 2018). Ebenso werden – im Unterschied zur Produktion tierischer Produkte – keine Antibiotika benötigt (Gustafson und Bowen 1997, McEwen 2006, Postma et al. 2016) und sowohl die Landnutzung (Naylor et al. 2005, Alexander et al. 2017) als auch die Emission von Treibhausgasen fallen geringer aus (Herrero et al. 2013, Mejia et al. 2018).

1.6 Co-Fermentation und Vitamin-B₁₂-Produktion

Bei der Herstellung von Tofu aus Sojamilch, die zuvor mit *P. freudenreichii* fermentiert wurde, stellte Bickers (1995) fest, dass nur 36 % der gebildeten Corrinoiden im Tofu zurückbleiben und der Rest mit der Molke verworfen wird. Außerdem konnten nur noch 79 % statt 89 % des Proteins aus der Sojamilch ausgefällt werden. Daher wurde beschlossen, den Tofu erst zu fällen und anschließend zu fermentieren. Eine vergleichende Fermentationsreihe von Tofu mit *L. reuteri* und *P. freudenreichii* ergab, dass eine Co-Fermentation der beiden Stämme besser zur Anreicherung von Tofu mit Vitamin B₁₂ geeignet war als die jeweiligen Stämme allein (Zhu 2013). Die Co-Fermentation von Milch- und Propionsäurebakterien ist eine seit Langem untersuchte Methode und vor allem aus der Milchwirtschaft bei der Käseherstellung bekannt. Die Interaktion dieser Mikroorganismen wurde bereits mittels Reinkulturen von *Lactobacillus plantarum* mit *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* in Co-Kultur untersucht (Lee et al. 1976). Bei der Co-Kultur von *Lactobacillus acidophilus* und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* wurden erhöhte Wachstumsraten beider Stämme festgestellt (Liu und Moon 1982). *Lactobacillus casei* und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* wurden zur Fermentation von Molke ebenfalls in Co-Kultur untersucht (Bodie et al. 1987). Tyree et al. (1991) untersuchten *Lactobacillus xylosus* und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* in Co-Kultur, um deren Fähigkeiten zur Verarbeitung von Lignocellulosehydrolysat zu bewerten. Eine Methode zur Co-Fermentation von *Lactobacillus plantarum* SM39 und *P. freudenreichii* DF13 wurde von Hugenschmidt et

al. (2011) entwickelt. Diese fermentierten und optimierten Molkepermeatmedium mit den Supplementen Cobaltchlorid, Dimethylbenzimidazol und Paraaminobenzoesäure. Dabei verfolgten sie das Ziel der gleichzeitigen Anreicherung von Vitamin B₉ und Vitamin B₁₂ und konnten damit Gehalte von 8399 ± 784 ng/mL und 751 ± 353 ng/mL erzeugen. Bei der Anreicherung von Tofu mit Vitamin B₁₂ durch eine Co-Kultur von *L. reuteri* und *P. freudenreichii* konnte Zhu (2013) einen Vitamin-B₁₂-Gehalt von 289 ng/g im Tofu erzielen. Dies erreichte er mit einem Fed-Batch-Prozess, nach einem Screening diverser Zusätze und durch umfassende Optimierung. Neben einem Glucose-Feed von 1 g/d und einer initialen Glucose-Konzentration von 5 g/kg Tofu setzte er auch 0,5 g Betain, 0,08 mg Riboflavin, 0,1 g Fructose und 1 L Wasser sowie 2 mg Cobalt(II)-chlorid einem Kilogramm Tofu zu.

P. freudenreichii ist in der Lage Riboflavin zu bilden (LeBlanc et al. 2006). *L. reuteri* besitzt zumindest die genetischen Voraussetzungen dafür (Capozzi et al. 2012), dennoch erhöhte die Zugabe von Riboflavin, als Vorstufe für die Dimethylbenzimidazolsynthese (Hörig und Renz 1980), die Vitamin-B₁₂-Ausbeute (Zhu 2013). Außerdem konnten Marwaha et al. (1983) zeigen, dass die Zugabe von 0,05 % (w/v) Betain zu molkebasiertem Medium bei drei verschiedenen *Propionibacterium* spp. die Biomassekonzentration und die Vitamin-B₁₂-Produktion erhöht. Dessen förderliche Aktivität basiert auf seiner Funktion als potentieller Methylgruppendonor und einer regulatorischen Funktion (Demain et al. 1968). Die geringe Zugabe von Cobalt zum Fermentationsmedium fördert sowohl die Zelldichte als auch die Vitamin-B₁₂-Produktion (Rao und Washington 1964, Hajfarajollah et al. 2015). Nach aktuellem Lebensmittelrecht ist der Zusatz einer krebserzeugenden und fruchtschädigenden Chemikalie (siehe Kapitel 6.4) wie Cobalt(II)chlorid für die Herstellung von Lebensmitteln nicht zulässig (Verordnung (EG) 1333/2008). Die entsprechenden Sicherheitsbedenken seitens der European Food Safety Authority sind ausführlich und nachvollziehbar in einer Stellungnahme dargelegt (EFSA 2009).

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Tofu fermentativ mit Vitamin B₁₂ anzureichern. Zunächst musste geklärt werden, ob sich Essigsäurebakterien prinzipiell für eine fermentative Anreicherung von Tofu mit Vitamin B₁₂ eignen. Dazu sollte das Zielmolekül, sofern vorhanden, im untersuchten Stamm identifiziert werden. Mit der Absicht, die Auswahl der Cobalamin produzie-

renden Essigsäurebakterien zu erhöhen, wurde der Typstamm *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 untersucht. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob sich *A. pasteurianus* dafür anbietet, Tofu mit Vitamin B₁₂ anzureichern.

Ausgehend von den Vorarbeiten durch Zhu (2013) sollte anschließend die Weiterentwicklung des Prozesses erfolgen. Dieser hatte Tofu submers mit *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271 und *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 fermentiert. In seinen Untersuchungen nutzte Zhu einen Glucose-Feed von 1 g/d und eine initiale Glucose-Konzentration von 5 g/kg Tofu. Zudem setzte er unter anderem 1 L Wasser sowie 2 mg CoCl₂ einem Kilogramm Tofu zu. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Cobaltzusatz durch ein pflanzliches Nahrungsmittel ersetzt werden. Im Speziellen sollte nun der Prozess vom Zusatz der Cobaltionen unabhängig gemacht und seine Skalierbarkeit untersucht werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zunächst 68 Pflanzenmaterialien auf ihren Cobaltgehalt hin untersucht. Danach wurde Tofu mit Pflanzenmaterial anstelle des Cobaltsalzes mit *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* und *Lactobacillus reuteri* co-fermentiert. Außerdem wurden Extrakte der Pflanzenmaterialien zur Fermentation von Tofu herangezogen und der Prozess der Extraktion mit dem Rohstoff Kichererbsen vor der Fermentation optimiert, um ein Extrakt zu erhalten, welches sich besonders gut zur fermentativen Anreicherung von Tofu mit Vitamin B₁₂ eignet. Parallel zu diesen Versuchen sollten verschiedene Prozessvarianten auf ihre Eignung zur Submersfermentation von Tofu getestet werden. Außerdem wurden die unterschiedlichen Derivate Pseudovitamin B₁₂ und Vitamin B₁₂ getrennt quantifiziert, zwischen denen in vorherigen Arbeiten nicht unterschieden worden ist.

2 Material und Methoden

2.1 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit eingesetzten Mikroorganismen wurden verwendet, um Fermentationssubstrate mit Vitaminen anzureichern. Außerdem kamen sie als auxotrophe Indikatorstämme bei der turbidimetrischen Vitaminanalyse (Kapitel 2.12.1 und 2.13) zum Einsatz. Die einzelnen Stämme wurden der Stammsammlung der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg entnommen, in der die

Zellen in Medium mit 20 % (v/v) Glycerin bei -70 °C gelagert waren. Es handelte sich dabei um die folgenden Stämme, die auch bei der deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt sind (DSMZ, Braunschweig, Deutschland):

Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis* DSM 20355

Lactobacillus rhamnosus DSM 20021

Lactobacillus reuteri DSM 20016

Propionibacterium freudenreichii ssp. *freudenreichii* DSM 20271

Acetobacter pasteurianus DSM 3509

2.2 Medien zur Anzucht der Bakterien

Zur Anzucht der Bakterien wurden verschiedene Flüssigmedien verwendet. Die Herstellung eines Agars erfolgte durch Zugabe von 15 g/L Agar-Agar. Vor dem Einsatz wurden sämtliche Medien im Autoklav Tuttnauer 5075 ELV (Tuttnauer, Breda, Niederlande) bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Bei Malzextraktagar erfolgte der Autoklaviervorgang abweichend bei 121 °C für 15 min. Die Medien zur Vitaminbestimmung wurden vor dem Einsatz steriltriert (Perfect Flow PES 0,2 µm, Wicom, Heppenheim, Deutschland). Zum Einsatz kam ausschließlich hochreines Wasser, hergestellt durch Umkehrosiose mit einem ELGA purelab System (Typ 1, ELGA purelab, High Wycombe, UK), im Folgenden bidest. Wasser genannt. Wo es nötig war, wurden anaerobe Bedingungen mit Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Anaerobiertöpfen erzeugt.

de Man Rogosa Sharpe Medium (MRS)

Pepton	10 g
Hefeextrakt	4 g
Rindfleischextrakt	8 g
Glucose	20 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2 g
Natriumacetat	5 g
Ammoniumcitrat	2 g
Magnesiumsulfat	0,2 g
Mangan(II)-sulfat	0,05 g
Tween 80	1 g
Wasser (bidest.)	Ad 1000 mL
pH-Wert	6,0 – 6,4

Mannitol-Hefeextrakt-Medium (MHM) nach Sievers und Swings (2005)

Mannitol	25 g
Hefeextrakt	5 g
Pepton	3 g
Wasser (bidest.)	ad 1000 mL

Malzextrakt-Agar

Agar	15 g
Malzextrakt	30 g
Sojapepton	3 g
Wasser (bidest.)	ad 1000 mL
pH-Wert	5,4 – 5,8

Propionibakterien-Medium (ProM)

Sojapepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumlactat	10 g
Wasser (bidest.)	ad 1000 mL
pH-Wert	7,0 – 7,2

Lactobacilli Broth AOAC

Pepton aus Milch	15 g
Hefeextrakt	5 g
Dextrose	10 g
Tomatensaftbasis	5 g
Dikaliumhydrogenphosphat	2 g
Polysorbat	1 g
Wasser (bidest.)	ad 1000 mL
pH-Wert	6,6 – 7,0

Vitamin-B₁₂-Testbouillon

D(+)-Glucose	4000 mg
Casein	15000 mg
L-Asparagin	200 mg
L-Cysteiniumchlorid	200 mg
L-Cystein	400 mg
L-Tryptophan	200 mg
Adenin	20 mg
Guanosin	40 mg
Uracil	20 mg
Xanthin	20 mg
4-Aminobenzoesäure	2 mg
L(+)-Ascorbinsäure	4000 mg
D(+)-Biotin	0,01 mg
Calcium-D(+)-Pantothersäure	1 mg
Folsäure	0,2 mg
Nicotinsäure	2 mg
Pyridoxalhydrochlorid	4 mg
Pyridoxamindihydrochlorid	0,8 mg
Riboflavin	1 mg
Thiamindichlorid	1 mg
Kaliumchlorid	1000 mg
Eisen(II)-sulfat	20 mg
Kaliumdihydrogenphosphat	1000 mg
Magnesiumsulfat	400 mg
Mangan(II)-sulfat	20 mg
Natriumacetat (wasserfrei)	20000 mg
Natriumchlorid	20 mg
Tween® 80	2 mL
Wasser (bidest.)	Ad 1000 mL
pH-Wert	5,9 – 6,1

Vitamin-B₉-Testbouillon

Glucose	40 g
Natriumacetat	20 g
Caseinhydrolysat	12 g
Dikaliumhydrogenphosphat	1 g
Kaliumdihydrogenphosphat	1 g
Magnesiumsulfat	400 mg
DL-Tryptophan	200 mg
L-Cystein	200 mg
Adeninsulfat	20 mg
Eisensulfat	20 mg
Guanin-Hydrochlorid	20 mg
Mangan(II)-sulfat	20 mg
Natriumchlorid	20 mg
Uracil	20 mg
Pyridoxin-Hydrochlorid	4 mg
Riboflavin	2 mg
Thiamin-Hydrochlorid	2 mg
Niacin	1 mg
Calciumdipantothenat	400 µg
p-Aminobenzoesäure	200 µg
Biotin	0,8 µg
Wasser (bidest.)	ad 1000 mL
pH-Wert	6,6 – 7,0

2.3 Lösungen und Tofu für Fed-Batch-Fermentationen

Betainlösung (100 mg/mL)

Betain	5 g
Wasser (bidest.)	ad 50 mL

Cobalt(II)-chloridlösung (2 mg/mL)

Cobalt(II)-chlorid	0,2 g
Wasser (bidest.)	ad 100 mL

Riboflavinlösung (8 µg/mL)

Riboflavin	0,008 g
Wasser (bidest.)	ad 1000 mL

Glucoselösung (100 mg/mL)

Glucose	100 g
Wasser (bidest.)	ad 1000 mL
Autoklaviert in Tuttnauer 2540 EL	20 min 121 C

Tofu

Tofusorte 1	TOFUTOWN.com GmbH, Wiesbaum, Deutschland
Tofusorte 2	Berief Food GmbH, Beckum, Deutschland

2.4 Pflanzenmaterial

Das Probenmaterial wurde im Handel bevorzugt in getrockneter Form erworben. Die Identifikation der Rohstoffe erfolgte nach der Auszeichnung sowie mithilfe von Literatur und kann der Tabelle 1 entnommen werden. Die genaue Bezugsquelle der Proben kann der Tabelle 18 im Anhang entnommen werden. Bereits getrocknete Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert, während die Lagerung frischer Proben tiefgekühlt bei -28 °C erfolgte (Liebherr Premium GTP 4726, Liebherr-International, Biberach an der Riß, Deutschland).

Tabelle 1: Beschreibung des verwendeten Probenmaterials unter Angabe des Artnamens und des jeweils eingesetzten Pflanzenteils. Die Bestimmung des Artnamens und die Identifikation der Pflanzenteile erfolgten nach der jeweils angegebenen Literatur, die zur Bestimmung verwendet wurde. Verwendet wurden L: Lieberei und Reisdorff (2012), H: Huffman und Seifu (1989), E: Edim Etta et al. (2013), HA: Hamed et al. (2008) und Esuoso et al. (1998), LI: Lim (2012)

Probenbezeichnung	Trivialname der Pflanze	Pflanzenteil (Anmerkung, Verarbeitung)	Artname	Literatur
Adzுகibohne	Adzுகibohne	Samen	<i>Vigna angularis</i> (WILLD.) OHWI et OHASHI	L
Alfalfa	Alfalfa	Samen	<i>Medicago sativa</i> L. ssp. <i>sativa</i>	L
Anis	Anis	Frucht	<i>Pimpinella anisum</i> L.	L
Aubergine	Aubergine	Frucht	<i>Solanum melongena</i> L.	L
Avocado	Avocado	Pulpa (Mesokarp und Endokarp)	<i>Persea americana</i> MILL.	L
Bambussprossen	Bambussprossen	Sprossknospe (geschält)	<i>Bambusa vulgaris</i> SCHRAD, ex J. C. WENDL.	L
Bitterblätter (Lieferant 1)	Bitterblätter	Blatt	<i>Vernonia amygdalina</i> DEL.	H
Bitterblätter (Lieferant 2)	Bitterblätter	Blatt	<i>Vernonia amygdalina</i> DEL.	H
Blaumohnsamen	Blaumohn	Samen	<i>Papaver somniferum</i> L. ssp. <i>somniferum</i>	L
Blumenkohl	Blumenkohl	Blütenstandsprimordium	<i>Brassica oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> (L.) ALEF. var. <i>botrytis</i> L.	L
Blumenkohlblätter	Blumenkohlblätter	Blatt	<i>Brassica oleracea</i> convar. <i>botrytis</i> (L.) ALEF. var. <i>botrytis</i> L.	L
Buchweizen	Buchweizen	Frucht	<i>Fagopyrum esculentum</i> MOENCH	L
Buschmangokerne	Buschmango	Kern (Embryo)	<i>Iringia gabonensis</i> (AUBRY-LECOMTE ex O'ROKKE) BAILL	E
Dattel	Dattel	Perikarp	<i>Phoenix dactylifera</i> L.	L
Dillspitzen	Dill	Blätter	<i>Anethum graveolens</i> L. var. <i>hortorum</i> ALEF.	L
Erdbeeren	Erdbeeren	Frucht	<i>Fragaria</i> sp.	L
Gartenbohne	Gartenbohne	Samen	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	L

Fortsetzung der Tabelle 1

Proben- bezeichnung	Trivialname der Pflanze	Pflanzenteil (Anmerkung, Verarbeitung)	Artname	Literatur
Gartenerbse	Gartenerbse	Samen	<i>Pisum sativum</i> L. ssp. <i>sativum</i>	L
Gemüsefenchel	Gemüse- fenchel	Unterblatt	<i>Foeniculum vulgare</i> var. <i>azoricum</i> (MILL.) THELL.	L
Haselnusskerne	Haselnuss	Samen	<i>Corylus avellana</i> L.	L
Haselnusschalen	Haselnuss	Perikarp	<i>Corylus avellana</i> L.	L
Honigmelone	Honigmelone	Perikarp	<i>Cucumis melo</i> L.	L
Kakaonibs (fermentiert)	Kakao	Samen ohne Testa (fermentiert, getrock- net, gebrochen, geschält und ungeröstet)	<i>Theobroma cacao</i> L.	L
Kakaonibs (unfermentiert)	Kakao	Samen ohne Testa (unfermentiert, getrock- net, gebrochen, geschält und ungeröstet)	<i>Theobroma cacao</i> L.	L
Kakaotesta	Kakao	Testa (fermentiert und geröstet)	<i>Theobroma cacao</i> L.	L
Kichererbse	Kichererbse	Samen	<i>Cicer arietinum</i> L.	L
Knollensellerie	Knollen- sellerie	Sprossröhre (geschält)	<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i> (MILL.) GAUD.	L
Knollensellerie- blätter	Knollen- sellerie	Blatt	<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i> (MILL.) GAUD.	L
Koriander (gemahlen)	Koriander	Frucht (gemahlen)	<i>Coriandrum sativum</i> L.	L
Kressesamen	Kresse	Samen	<i>Lepidium sativum</i> L. subsp. <i>sativum</i>	L
Kreuzkümmel	Kreuzkümmel	Frucht (gemahlen)	<i>Cuminum cyminum</i> L.	L
Kümmel	Kümmel	Frucht (gemahlen)	<i>Carum carvi</i> L.	L
Kürbiskerne	Kürbiskerne	Embryo	<i>Cucurbita pepo</i> L. var. <i>styriaca</i> GREB.	L
Leinmehl	Lein	Samen (gemahlen und entölt)	<i>Linum usitatissimum</i> L.	L
Leinsamen	Lein	Samen	<i>Linum usitatissimum</i> L.	L
Liebstockel (gemahlen)	Liebstockel	Blatt (gemahlen)	<i>Levisticum officinale</i> W. KOCH	L
Linse	Linse	Samen	<i>Lens culinaris</i> MEDIK.	L
Mangold (Stiel)	Mangold	Blattstiel	<i>Beta vulgaris</i> L. ssp. <i>vulgaris</i> var. <i>flavescens</i> DC.	L
Mangoldblätter	Mangold	Blattspreite	<i>Beta vulgaris</i> L. ssp. <i>vulgaris</i> var. <i>flavescens</i> DC.	L
Melonensamen	Melone	Embryo	<i>Citrullus lanatus</i> var. <i>lanatus</i> (THUNB.) MATSUM. et NAKAI	L
Mungbohne	Mungbohne	Samen	<i>Vigna radiata</i> (L.) R. WILCZEK	L
Okara	Sojabohne	Samen (gemahlen, gekocht, filtriert)	<i>Glycine max</i> (L.) MERR.	L

Proben- bezeichnung	Trivialname der Pflanze	Pflanzenteil (Anmerkung, Verarbeitung)	Artname	Literatur
Okra	Okra	Frucht (gemahlen)	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) MOENCH.	L
Paprika	Paprika	Perikarp (gemahlen)	<i>Capsicum annuum</i> L.	L
Paranuss	Paranuss	Kern (Embryo)	<i>Bertholletia excelsa</i> BONPL.	L
Petersilie	Petersilie	Blätter	<i>Petroselinum crispum</i> (MILL.) FUSS var. <i>crispum</i>	L
Pfeffer schwarz (gemahlen)	Pfeffer	Frucht unreif geerntet (schwarz, gemahlen)	<i>Piper nigrum</i> L.	L
Quinoa (rot)	Quinoa (rot)	Samen	<i>Chenopodium quinoa</i> WILDD.	L
Reis	Reis	Endosperm	<i>Oryza sativa</i> L.	L
Reis (fein gemahlen)	Reis	Endosperm	<i>Oryza sativa</i> L.	L
Reis (grob gemahlen)	Reis (grob gemahlen)	Endosperm	<i>Oryza sativa</i> L.	L
Rillenkürbis (Samenschale)	Rillenkürbis	Testa	<i>Telfairia occidentalis</i> HOOK	H A
Rillenkürbis (trocken)	Rillenkürbis	Perikarp und Rezeptaculum (trocken)	<i>Telfairia occidentalis</i> HOOK	H A
Rillenkürbisblätter (Lieferant 1)	Rillenkürbis	Blatt	<i>Telfairia occidentalis</i> HOOK	H A
Rillenkürbisblätter (Lieferant 2)	Rillenkürbis	Blätter	<i>Telfairia occidentalis</i> HOOK	H A
Rillenkürbissamen	Rillenkürbis	Samen ohne Testa	<i>Telfairia occidentalis</i> HOOK	L
Rispenhirse	Rispenhirse	Samen	<i>Panicum miliaceum</i> L.	L
Rohkakao "Crusty layer"	Kakao	Samen (fermentiert, un- geröstet, "Crusty layer" des Lagerhaufens)	<i>Theobroma cacao</i> L.	L
Rohkakao (Probentiefe: 1,5 – 2,5 m)	Kakao	Samen (fermentiert, un- geröstet, Probentiefe: 1,5 – 2,5 m des Lager- haufens)	<i>Theobroma cacao</i> L.	L
Rote Beete	Rote Beete	Knolle (geschält)	<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>vulgaris</i> „Bete Gruppe“	L
Rotkohl	Rotkohl	Blattspreite	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>rubra</i>	L
Sojabohne (geschält)	Sojabohne	Embryo	<i>Glycine max</i> (L.) MERR.	L
Sojabohne (ungeschält)	Sojabohne	Samen (ungeschält)	<i>Glycine max</i> (L.) MERR.	L
Staudensellerie	Stauden- sellerie	Mittelrippe	<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> (MILL.) PERS.	L
Staudensellerie- blätter	Stauden- sellerie	Blatt	<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> (MILL.) PERS.	L
Süßkartoffel	Süßkartoffel	Wurzelknolle (geschält)	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) LAM.	L

Proben- bezeichnung	Trivialname der Pflanze	Pflanzenteil (Anmerkung, Verarbeitung)	Artname	Literatur
Süßlupinenmehl	Süßlupine	Samen (gemahlen)	<i>Lupinus albus</i> L.	L
Tofu	Sojabohne	Bohne (gemahlen, ge- kocht, filtriert, Proteine gefällt, gepresst)	<i>Glycine max</i> (L.) MERR.	L
Weißkohl	Weißkohl	Blattspreite	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i>	L
Zucchini	Zucchini	Frucht (unreif)	<i>Curcubita pepo</i> L. ssp. <i>pepo</i>	L
Zuckererbse	Zuckererbse	Hülse	<i>Pisum sativum</i> ssp. <i>sativum</i> convar. <i>axiphium</i> Alef.	LI

2.4.1 Bestimmung des Trockenmasseanteils

Zur Bestimmung des Trockenmasseanteils wurde ein Probenröhrchen (Röhrchen 50 mL, 114 x 28 mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bekannten Leergewichts mit einer Probe gefüllt und gewogen (Kern PB 4000-2, Gottl. Kern & Sohn, Albstadt, Deutschland). Danach wurde eine Gefriertrocknung durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.2), gefolgt von einem erneuten Auswiegen der Probe. Zur Berechnung des Trockenmasseanteils wurde folgende Formel angewendet:

$$TMA = \frac{m_T - m_R}{m_F - m_R} \cdot 100 \%$$

TMA : Trockenmasseanteil [%]

m_F : Masse der Einwaage inkl. Probenröhrchen [g]

m_T : Masse der getrockneten Einwaage inkl. Probenröhrchen [g]

m_R : Masse des Probenröhrchens [g]

100 %: Faktor auf %

2.4.2 Gefriertrocknung

Zur Gefriertrocknung wurden die Proben in der Gefriertruhe Premium (Liebherr International, Biberach an der Riß, Deutschland) auf -28 °C herabgekühlt. Anschließend erfolgte die Lyophilisation bis zur Gewichtskonstanz in einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Martin Christ, Osterode am Harz, Deutschland), wobei mit einer Vakuumpumpe RZ 2.5 (Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) ein Unterdruck von 0,1 mbar eingestellt

wurde. Das gefriergetrocknete Material wurde in festverschraubten Probenröhrchen (Röhrchen 50 mL) bei Raumtemperatur gelagert.

2.5 Zellzahlbestimmung

2.5.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mithilfe einer Helber-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,02 mm und der Fläche eines Gruppenquadrats von 0,04 mm² (superior Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland), in welche die jeweiligen Zellsuspensionen gegeben wurden. Mittels eines Mikroskops (Axiostar plus, Carl Zeiss Göttingen, Deutschland) wurden vier Gruppenquadrate in einer Diagonalen ausgezählt, wonach die ermittelte Gesamtzellzahl mit der folgenden Formel berechnet wurde:

$$GZ = \bar{Z} \cdot 1,25 \cdot 10^6 \cdot VF$$

GZ: Gesamtzellzahl [Zellen/mL]

\bar{Z} : arithmetisches Mittel der Zellzahlen der ausgezählten Gruppenquadrate Z_i

VF: Verdünnungsfaktor

$1,25 \cdot 10^6$: Umrechnung des Volumens 0,0008 μ L auf 1 mL

2.5.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl in den Fermentationen erfolgte nach Herstellung einer Verdünnungsreihe in 0,9 %iger Kochsalzlösung. Dazu wurde 1 mL Probe in 9 mL Kochsalzlösung suspendiert (entspricht Verdünnungsstufe 10^{-1}). Aus dieser Suspension erfolgten weitere Verdünnungen, von denen jeweils 100 μ L auf dem betreffenden Agar ausgespatelt wurden. Bei der Auszählung wurden nur Agarplatten berücksichtigt, die zwischen 20 und 300 koloniebildende Einheiten (KBE) pro Platte aufwiesen. Wiesen alle Platten und die Platte mit der niedrigsten Verdünnungsstufe weniger als 20 Kolonien auf, so wurde die niedrigste Verdünnungsstufe berücksichtigt. Waren auch auf der Platte der niedrigsten Verdünnungsstufe keine Kolonien vorhanden, so wurde von weniger als $1 \times VF \times 10$ hoch niedrigste Verdünnungsstufe koloniebildende Einheiten ausgegangen. Waren alle ausgespatelten Platten mit mehr als 300 Kolonien bewachsen, so wurde der Messwert mit $>300 \times VF \times 10$ hoch höchste Verdünnungsstufe koloniebildende Einheiten angegeben. *L. reuteri* und *P. freudenreichii*

konnten auf Propionibakterien-Agar unterschieden werden, da erstere weiße und letztere braune Kolonien bilden. Von Fermentationsproben wurden die Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-5} auf Malzextrakt-Agar zur Reinheitskontrolle ausgespatelt, um eventuelle Hefe- oder Schimmelpilzkontaminationen ausschließen zu können. Die Berechnung der Lebendzellzahl erfolgte nach folgender Gleichung:

$$LZZ = \frac{\sum c_i}{(n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1) \cdot d} \cdot VF$$

LZZ :	Lebendzellzahl [KBE/mL]
$\sum c_i$:	Summe aller ausgezählten koloniebildenden Einheiten
VF :	Verdünnungsfaktor 10, da 100 μ L ausgespatelt wurden
n_1 :	Anzahl der Agarplatten der niedrigsten, auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden
n_2 :	Anzahl der Agarplatten der nächsthöheren, auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen wurden
d :	Faktor der niedrigsten, zur Auswertung herangezogenen Verdünnungsstufe

2.6 Prototrophietest

Die Prototrophie eines Bakterien-Stammes wurde in einem speziellen Mangelmedium untersucht. *A. pasteurianus* DSM 3509 wurde in 5 mL Vitamin-B₁₂-Testbouillon angezogen, einem Medium, das über alle notwendigen Nährstoffe mit Ausnahme von Vitamin B₁₂ verfügt. Das Wachstum wurde nach 48 h bei 600 nm mit einem Photometer (U-2000, Hitachi, Tokio, Japan) durch den Vergleich mit einer unbeimpften Kontrolle bestimmt. Konnte in einer Probe Wachstum festgestellt werden, so wurde ein neues Vitamin-B₁₂-Testbouillonröhrchen mit 100 μ L der Probe beimpft. Dieses Vorgehen wurde achtmal wiederholt.

2.7 Amplifikation des Uroporphyrinogen-III-Synthase-Gens

Genomische DNA von *A. pasteurianus* wurde mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers extrahiert und aufgereinigt. Das 910 bp umfassende Fragment, welches das gesamte Gen der Uroporphyrinogen-III-Synthase (Uro III) (729 bp), einen Teil des Gens der Proteintranslocase-Untereinheit SecB (6 bp) sowie der Porphobilinogen-Desaminase (100 bp) umfasst, wurde mithilfe der Primer 5'-GCATAATCGCGTTGCTTG-3' (Uro for) und 5'-AGCGCAGCATTACTGGCTTG-3' (Uro rev) amplifiziert. Das Zielfragment wurde durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese (Agagel Mini,

Biometra, Göttingen, Deutschland) nach Größe aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ein PCR-Ansatz mit bidest. Wasser anstelle von Template im Ansatz diente als Negativkontrolle. Das PCR-Produkt wurde mittels GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) aufgereinigt und bei Eurofins Genomics (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Programm Clone manager Suite 9 (SciEd, Denver, CO, USA) mit den Zielsequenzen für Uro III aus *Acetobacter pasteurianus* ssp. *pasteurianus* IFO 3191 [Institut für Fermentation, Osaka] (GenBank: BACG01000001.1 Region: 226700 - 227428) auf 100 % Identität abgeglichen.

2.8 Datenbankanalyse mit BlastKOALA

Für die Datenbankanalyse wurden die annotierten Proteinsequenzen der Stämme *Acetobacter pasteurianus* ssp. *ascendens* LMG1590 [Labor für Mikrobiologie der Universität Ghent] (GCF_001766235.1) und *Acetobacter pasteurianus* ssp. *pasteurianus* SRCM101468 [Institute for Fermentation Industry, Sung Ho Cho] (GCF_002202135.1) von der NCBI Webseite (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/904) im FASTA-Format bezogen. Diese Dateien wurden direkt durchsucht und einer BlastKOALA (www.kegg.jp/blastkoala) (Kanehisa et al. 2016) unterzogen, welche die Sequenzdaten für orthologische Alignments mit nicht redundanten Proteinsequenzen bekannter Biosynthesewege nutzt.

2.9 Batch-Fermentationen zur Corrinoid-Identifikation

2.9.1 Vorkultur und Inokulum

A. pasteurianus wurde 48 h bei 22 °C in MHM auf einem Rotationsschüttler GFL 3015 (60 UpM und 30 mm Amplitude, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) angezogen. *L. reuteri* wurde anaerob bei 30 °C für 48 h stehend in MRS angezogen. Anschließend wurde von beiden Kulturen je 1 mL bei 4000 g für 5 min zentrifugiert (Eppendorf mini spin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), das Pellet dreimal mit steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und in 1mL 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgenommen. Abschließend wurden je 100 µL gewaschene Zellen in Vitamin-B₁₂-Testbouillon überimpft und erneut für 24 h inkubiert. Die weitere Behandlung sowie die Anzucht von *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii*

erfolgte wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben. Dabei wurde die Zellkonzentration auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/mL im Inokulum eingestellt.

2.9.2 Hauptkultur der Batch-Fermentationen zur Corrinoid-Identifikation

Die Identifikation der Corrinoid erfolgte jeweils mittels 200 mL Vitamin-B₁₂-Testbouillon mit 2 mL Inokulum in einem 500 mL Schikanekolben nach 72 h bei 22 °C und 100 UpM auf einem Laborschüttler (GFL 3015 Amplitude 30 mm, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland). *L. reuteri* wurde als Positivkontrolle zur Pseudovitamin-B₁₂-Produktion in 200 mL Vitamin-B₁₂-Testbouillon anaerob bei 30 °C für 72 h mit 2 mL Inokulum in einem 500 mL Schikanekolben inkubiert. *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* wurde als Positivkontrolle zur Vitamin-B₁₂-Produktion in 200 mL ProM 48 h anaerob bei 30 °C und anschließend 24 h lang aerob stehend inkubiert.

2.10 Fed-Batch-Fermentationen von Tofu

2.10.1 Vorkultur und Inokulum

Die Anzucht von *L. reuteri* erfolgte stehend anaerob in MRS-Medium für 24 – 48 h bei 30 °C. Anschließend wurde die Kultur resuspendiert, 0,1 mL in 9 mL frisches MRS-Medium überführt und für 24 h anaerob bebrütet. *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* wurde stehend anaerob für 48 – 72 h bei 30 °C in ProM angezogen. Anschließend wurde die Kultur resuspendiert, 0,1 mL in 9 mL frisches ProM überführt und für 24 h anaerob bebrütet. Aus den so angezogenen Kulturen wurden zweimal je 2 mL in je ein Mikroreaktionsgefäß (Safe-Lock Tube 2,0 mL) überführt, bei 4010 g für 3 min zentrifugiert (Eppendorf mini spin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Überstand verworfen. Eines der Zellpellets wurde in 1 mL 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgenommen, mit dem anderen Pellet vereint und bei 4010 g zentrifugiert, wobei der Überstand erneut verworfen wurde. Der Waschschrift wurde zwei weitere Male wiederholt und die Zellen am Ende in 1 mL 0,9 %iger Kochsalzlösung aufgenommen. Nach Berechnung der Gesamtzellzahl (siehe 2.5.1) wurde unter Zugabe eines definierten Volumens 0,9 %iger Kochsalzlösung die Zellkonzentration des Inokulums eingestellt. Alle Fed-Batch-Fermentationen wurden mit einer Zellkonzentration im Fermentationsansatz von $5 \cdot 10^5$ Zellen/g Tofu pro Stamm beimpft.

2.10.2 Hauptkultur im Schüttelkolben

100 g Tofu wurde in Würfel (2×2×2 cm) geschnitten und in einen 500 mL Schikanekolben eingewogen. Anschließend wurden je 1 mL Betainlösung (100 mg/mL), 0,5 mL Riboflavinlösung (8 µg/mL) und 0,25 mL Cobaltchloridlösung (0,02 mg/mL) in zugegeben. Mit bidest. Wasser wurde die Mischung auf eine Menge von 94,5 mL aufgefüllt. Die Ansätze wurden für 15 min bei 121 °C im Autoklaven Tuttnauer 5075 ELV (Tuttnauer, Breda, Niederlande) autoklaviert, auf 30 °C abgekühlt, mit 5 mL Glucoselösung (100 g/L) versetzt und mit 0,5 mL Inokulum beimpft. Die Inkubation erfolgte für 5 d stehend anaerob bei 30 °C und anschließend in Standkultur aerob für 2 d bei 30 °C. Dabei wurde zur Beobachtung des pH-Werts alle 24 h 1 mL Probe gezogen und 1 mL Glucoselösung (100 g/L) gefüttert. Am Ende wurde der Ansatz vorsichtig durchmischt und zweimal je 1 mL Fermentationsbrühe zur Bestimmung der Lebendzellzahl (Kapitel 2.5.2) und ebenso 1 mL zur Messung des pH-Werts abgenommen. Der Rest des Fermentationsprodukts wurde bei -28°C in Probenröhrchen eingefroren.

2.10.3 Hauptkultur im Schüttelkolben mit Pflanzenmaterial

Die Fermentation erfolgte, wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben, mit ein paar kleinen Änderungen. So wurde, abgesehen von dem Einsatz in den Positivkontrollen, auf die Zugabe von Cobalt(II)-chloridlösung (0,05 mg/kg_{Tofu}) verzichtet. Stattdessen wurden jeweils 20 g Pflanzenmaterial vor dem Autoklavieren zugegeben. Stark fetthaltiges und frisches Pflanzenmaterial wurden mit einem Messer in Stücke von ≤ 5 mm Kantenlänge geschnitten. Trockene Proben wurden unzerkleinert eingesetzt. Die Auswahl des eingesetzten Pflanzenmaterials erfolgte nach Cobaltgehalt und Verfügbarkeit. Zudem erfolgte die Inkubation für 7 d unter anaeroben Bedingungen, um das Wachstum der Bakterien zu verstärken.

2.10.4 Hauptkultur im Schüttelkolben mit Pflanzenextrakten

Die Fermentation erfolgte wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben, mit geringen Änderungen. So wurde, abgesehen von dem Einsatz in den Positivkontrollen, auf die Zugabe von Cobalt(II)-chloridlösung (0,05 mg/kg_{Tofu}) verzichtet. Außerdem wurde die Fermentationsflüssigkeit mit Extrakten aus Pflanzenmaterial anstelle von bidest. Wasser auf 94,5 mL aufgefüllt. Das Pflanzenextrakt wurde jeweils vor dem Autoklavieren zugegeben. Die Auswahl der zehn eingesetzten Pflanzenmaterialien erfolgte nach dem Vitamin-B₁₂-Gehalt in den Fermentationen von Tofu mit Pflanzenmaterial und deren Extrahierbarkeit. Die Inkubation erfolgte für 5 d anaerob und 2 d aerob in Standkultur.

Zur Herstellung des jeweiligen Pflanzenextrakts wurde stark fetthaltiges und frisches Pflanzenmaterial mit einem Messer in Stücke von ≤ 5 mm Kantenlänge geschnitten. Trockene Proben wurden unzerkleinert und gewaschen mit bidest. Wasser eingesetzt. Bei Paranuss und Kakaotesta wurde auf das Waschen verzichtet, da die Paranüsse frisch gekernt waren und die Kakaotesta aufgrund ihrer Quelleigenschaften (Bahmann 2014) nicht waschbar war. 40 g Pflanzenmaterial wurden mit 200 mL bidest. Wasser in eine 1-L-Laborglasflasche (DURAN® Group, Wertheim, Deutschland) gegeben, worin es für 16 h bei 4 °C zum Quellen verblieben. Bei den Ansätzen mit Buchweizen wurden abweichend 320 mL bidest. Wasser eingesetzt. Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei 121 °C autoklaviert (Tuttnauer 5075 ELV, Tuttnauer, Breda, Niederlande) und mit Maschenweiten von 1,5 mm (Küchensieb), 0,425 mm und 0,250 mm (Laboratory test sieve, Retsch, Haan, Deutschland) fraktioniert gesiebt. Zur Buchweizen-Suspension wurden weitere 320 mL bidest. Wasser hinzugegeben, geschüttelt und vor dem Sieben auf einem Magnetrührer 10 min gerührt.

Zur Bestimmung der Extrakt-Ausbeute wurde das Volumen des gewonnenen Extrakts gemessen. Dazu wurde das Extrakt (bzw. das Filtrat) mittels eines Teigschabers in einen Messzylinder überführt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$A = \frac{V_E}{V_W} \cdot 100 \%$$

A: Extrakt-Ausbeute [%]
 V_W : Volumen des Wassers [mL]
 V_E : Volumen des Extrakts [mL]
 100 %: Faktor auf %

2.10.5 Optimierung der Hauptkultur im Schüttelkolben mit Extrakten aus Kichererbsen

In Anlehnung an Kapitel 2.10.4, wurden in dieser Versuchsreihe Fermentationen von Tofu mit Kichererbsenextrakt durchgeführt. Dazu wurde lediglich der Prozessteil der Extraktion variiert. Für die Fermentationen wurden erneut Extraktionen durchgeführt. Dabei wurden die drei Steuergrößen Quelldauer (Que), Temperatur (Temp) und Brechung (Bre) auf zwei Ebenen untersucht, die in einem multifaktoriellen Versuchsdesign variiert wurden. Aus dem

Versuchsdesign ergaben sich die ($2^3=8$) unterschiedlichen Parameterkombinationen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Versuchsdesign für eine Fermentationsreihe von Tofu mit Kichererbsenextrakt. Die Angabe des Parameters Brechung bezieht sich auf unversehrte und in Viertel gebrochene Kichererbsen.

Versuchsbezeichnung	Temperatur [°C]	Quelldauer [h]	Brechung [Multiplikationsfaktor]
N1	100	0	0,25
N2	121	0	0,25
N3	100	20	0,25
N4	121	20	0,25
N5	100	0	1
N6	121	0	1
N7	100	20	1
N8	121	20	1

Für die Extraktion wurden 40 g Kichererbsen in Viertel gebrochen oder ganz in 1 L Laborglasflaschen eingewogen und mit 200 mL bidest. Wasser versetzt. Zur Quellung wurde ein Teil der Ansätze für 20 h bei 4 °C gelagert, der andere Teil der Ansätze wurde direkt erhitzt. Die Hitzeextraktion erfolgte entweder in einem Autoklav (Tuttnauer 5075 ELV, Tuttnauer, Breda, Niederlande) bei 121°C und 1,1 bar Überdruck oder in einem Wasserbad (Köttermann, Typ 3042, Uetze, Deutschland) bei 100 °C (Produkttemperatur) für 80 min. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Ansätze mit Maschenweiten von 1,5 mm (Küchensieb), 0,425 mm und 0,250 mm (Analysensiebe) (Laboratory Test Sieve, Retsch, Haan, Deutschland) fraktioniert gesiebt und das Volumen im Anschluss daran notiert. Die Bestimmung der Extrakt-Ausbeute erfolgte wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben.

2.10.6 Scale-up der Fed-Batch-Fermentation

Reaktor 1 als Rührkessel

Um die Eignung des Prozesses für ein Scale-up zu testen, wurden Fermentationen im Kleinfertiger Labfors 2 (Infors, Bottmingen, Schweiz) mit Doppelmantelglasgefäß (Füllvolumen 1,2 L) durchgeführt. Die Zugabe des Silikon-Antischaummittels SLE (Wacker-Chemie, München, Deutschland) erfolgte bei Bedarf. Der pH-Wert und die Sauerstoffsättigung der Kulturbrühe wurden online per pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K85/125 und Clark-Elektrode Inpro

6820/12/220 (beide Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) gemessen, wobei die Daten mit der Software IRIS 5 (Infors, Bottmingen, Schweiz) aufgezeichnet wurden. Mit IRIS 5 wurden auch die Daten zu Temperatur, Begasungsrate, Schaumbildung, Glucosefütterung und Rührgeschwindigkeit über den gesamten Fermentationsverlauf aufgezeichnet. Zur Vorbereitung wurden 600 g Tofu in Würfel (2×2×2 cm) geschnitten und in das Kulturgefäß überführt. Anschließend wurden je 3 mL Betainlösung (100 mg/mL), 6 mL Riboflavinlösung (8 µg/mL) und 1,5 mL Cobaltchloridlösung (0,2 mg/mL) zugegeben. Die Mischung wurde mit 559,5 (+60) mL bidest. Wasser überschichtet, wobei 60 mL als Autoklavieverlust einberechnet wurden. Der Ansatz wurde für 60 min bei 121 °C im Tuttnauer 5075 ELV autoklaviert und über Nacht abkühlen gelassen. Nachdem der Ansatz auf 30 °C abgekühlt war, wurde dieser mit 30 mL Glucoselösung (100 g/L) versetzt, mit 1 mL Inokulum (vgl. Kapitel 2.10.1) beimpft und anschließend für 2 min bei 100 UpM mittels Scheibenrührer gerührt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 5 d ohne Begasung bei 30 °C und anschließend für 2 d bei 30 °C bei einer Sauerstoffsättigung von 15 %, die über die Begasung mit steriler Luft max. 4 L/min geregelt wurde. Es wurden alle 24 h 6 mL Glucoselösung (100 g/L) gefüttert und anschließend für 2 min bei 100 UpM gerührt. Danach wurden 30 mL Probe gezogen, wobei 10 mL davon als Vorlauf verworfen wurden. Die Probe wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe Kapitel 2.5.2), zur Analyse der Konzentrationen von Glucose, Fruktose, Galaktose und Ethanol sowie der Konzentration von Milch-, Essig- und Propionsäure verwendet. Die garteneten Fermentationsprodukte wurden bei -28 °C in Probenröhrchen eingefroren.

Fermentation von Tofu mit Gartenbohnen

Die Fermentation wurde wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch mit der Abwandlung, dass 120 g Gartenbohnen zum Fermentationssubstrat hinzugegeben wurden. Außerdem wurde auf die Zugabe von Cobaltchloridlösung verzichtet und der Reaktor nur für einen Tag begast.

Reaktor 1 als Pumpreaktor

Um das Fermentationssubstrat vor Scherung zu bewahren, wurde ein Fermenter-Setup mittels externer Schlaufe getestet. Die Fermentation wurde wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch wurde auf das Rühren verzichtet und stattdessen eine Schlauchpumpe (Watson-Marlow 520 U/R, Watson-Marlow, Wilmington, MA, USA) installiert. Am Boden des Kessels wurde ein Ansaugstutzen platziert, über den konstant Fermentationsflüssigkeit mit

einer Fließgeschwindigkeit von 399 mL/min abgesaugt wurde. Die Fermentationsflüssigkeit wurde zentral mittels zwei Schläuchen an der Oberfläche des Fermentationssubstrats wieder aufgebracht.

Reaktor 2 als interne Schlaufe

Neben einer externen Schlaufe wurde auch die Prozessführung als interner Schlaufenreaktor untersucht. Dazu wurde eine Fermentation im Pilotfermenter Techfors-S (Infors, Bottmingen, Schweiz) mit Edelstahl-Doppelmantelgefäß (Arbeitsvolumen 20 L) durchgeführt. Ein Dampferzeuger 21.200.10 der Firma PTS Marquardt (Pulheim, Deutschland) wurde für die in-situ-Sterilisation für 20 min bei 121 °C verwendet. Als interne Schlaufe diente ein Edelstahlrohr von 14 cm Durchmesser und 39 cm Höhe. In einem Substratauffangkorb mit 24 cm Durchmesser, 42 cm Höhe und 2 mm Lochgröße wurde der Tofu außerhalb des Rohrs platziert. Zum Antrieb der Flüssigkeit um die Schlaufe diente ein Propellerrührer, der auf 25 – 100 UpM geregelt wurde. Ein Schutzgitter am oberen Ende der Schlaufe verhinderte den Eintrag von Tofu in die Schlaufe. Die Zugabe des Silikon-Antischaummittels SLE (Wacker-Chemie, München, Deutschland) erfolgte bei Bedarf. Der pH-Wert und die Sauerstoffsättigung der Kulturbrühe wurden online per pH-Elektrode 405-DPAS-SC-K85/425 und Clark-Elektrode Inpro 6820/12/420 (beide Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) gemessen und die Daten mit der Software IRIS 5 (Infors, Bottmingen, Schweiz) aufgezeichnet. Ebenso wurden auch die Daten zu Temperatur, Begasungsrate, Schaumbildung, Glucosefütterung und Rührgeschwindigkeit über den gesamten Fermentationsverlauf aufgezeichnet. Zur Vorbereitung wurden 5000 g Tofu in unregelmäßigen Stücken von ca. 5 cm Durchmesser in das Kulturgefäß überführt. Das Verhältnis von Fermentationsflüssigkeit zu Tofu musste erhöht werden, damit der Reaktor als Schlaufensystem geführt werden konnte. Daher wurden 18 L bidest. Wasser eingesetzt. Die Menge der Supplemente richtete sich nach der Masse an Tofu. So wurden je 25 mL Betainlösung (100 mg/mL), 50 mL Riboflavinlösung (8 µg/mL) und 25 mL Cobaltchloridlösung (0,2 mg/mL) zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde der Ansatz aktiv auf 30 °C abgekühlt, mit 62,5 mL Glucoselösung (400 g/L) versetzt und die Hauptkultur durch Zugabe von 1 mL Inokulum (vgl. Kapitel 2.10.1) gestartet. Die Inkubation erfolgte für 5 d ohne Begasung bei 30 °C und anschließend für 2 d mit Begasung bei 30 °C. Die Sauerstoffsättigung, die über die Begasung mit steriler Luft von 0 – 3,5 L/min geregelt wurde, betrug 15 %. Es wurden alle 24 h 12,5 mL Glucoselösung (400 g/L) gefüttert. Danach wurden

30 mL Probe gezogen, wobei 10 mL davon als Vorlauf verworfen wurden. Die Probe wurde zur Beobachtung der Lebendzellzahl (Kapitel 2.5.2), zur Analyse der Konzentrationen von Glucose, Fruktose, Galaktose und Ethanol sowie von Milch-, Essig- und Propionsäure eingesetzt (2.14). Die geernteten Fermentationsprodukte wurden bei -28 °C in Probenröhrchen eingefroren.

2.11 Bestimmung des Cobaltgehalts

Für diese Arbeit war der Cobaltgehalt der Pflanzenproben von großem Interesse: es war wichtig, den Cobalteintrag durch das Pflanzenmaterial in die Fermentationsansätze abschätzen zu können, da mit dem Pflanzenmaterial die Zugabe von Cobaltchloridlösung ersetzt werden sollte. Daher wurde der Cobaltgehalt von jeder eingesetzten Probe mindestens doppelt bestimmt. Dazu wurden die Proben zunächst in Säure aufgeschlossen und anschließend mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) untersucht.

2.11.1 Nasschemischer Verdau (Aufarbeitung)

Stark fetthaltige und frische Proben des Pflanzenmaterials wurden mit einem Messer in Stücke ≤ 5 mm Kantenlänge geschnitten. Trockene Proben wurden in einer Ultra-Zentrifugalmühle ZM 100 (Retsch, Haan, Deutschland) mit einem Ringsieb der Lochgröße 3,0 mm vermahlen. Im Anschluss daran wurden die Proben in Probenröhrchen (50 mL) gefüllt und es erfolgte eine Bestimmung des Trockenmasseanteils (siehe Kapitel 2.4.1). Für den nachfolgenden Aufschluss wurde 1 g gefriergetrocknete Probe mit der Analysenwaage Sartorius BP 211 D (Sartorius, Göttingen, Deutschland) in einen 100 mL Rundkolben eingewogen und mit 10 mL konz. Salpetersäure (65 %ig) versetzt. Der Verdau erfolgte so lange unter Rückfluss gekühlt, bis eine klare Lösung vorhanden war. Die aufgeschlossene, abgekühlte Probe wurde quantitativ in einen mit 3 %iger Salpetersäure gespülten 50 mL Messkolben überführt und mit bidest. Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Vor der massen-spektrometrischen Analyse wurde die Probe durch einen aschefreien Filter MN 640 w (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) filtriert und in Probenröhrchen (50 mL) aufbewahrt. Als Blindwert für die Analyse der verdauten Proben wurde die Salpetersäure mit bidest. Wasser auf 13 % (v/v) verdünnt.

2.11.2 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS-Analyse)

Als Analysator diente ein Agilent Technologies 7700 Series ICP-MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit ASX-500 Series ICP-MS Autosampler (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Als Trägergas wurde Argon eingesetzt. Damit wurden Standards von 0,1 – 100 µg/L einer ICP-Mehrelementstandardlösung VI (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermessen. Diese wurden, wie auch ein Blindwert, mit je 6,5 % (v/v) Salpetersäure angesetzt. Nach Abzug der Blindwerte und linearer Regression erfolgte die Berechnung der Cobaltgehalte in den Proben nach folgender Formel:

$$G_{Cobalt} = \frac{(y - t) \cdot VF \cdot V_P \cdot TMA}{m \cdot m_E}$$

G_{Cobalt} :	Cobaltgehalt [mg/kg]
y :	Messwert [Skt]
t :	Achsenabschnitt der Kalibriergeraden [Skt]
VF :	Verdünnungsfaktor
V_P :	Volumen der aufgearbeiteten Probenlösung [L]
TMA :	Trockenmasseanteil [%]
m :	Steigung der Kalibriergeraden [Skt * L/µg]
m_E :	Probeneinwaage [g]

2.12 Bestimmung des Vitamin-B₁₂-Gehalts

2.12.1 Mikrobiologischer Vitamin-B₁₂-Test

Lactobacillus delbrueckii spp. *lactis* DSM 20355 wurde im mikrobiologischen Vitamin-B₁₂-Test verwendet. Dieser *Lactobacillus* Stamm ist auxotroph in Bezug auf Cyanocorrinoide. Wächst dieser Stamm in einem Medium, so muss ein Cyanocorrinoid vorhanden sein. Da der Stamm eine hohe Sensitivität gegenüber Cyanocorrinoiden besitzt, eignet er sich für einen empfindlichen Vitamin-B₁₂-Test. Für die mikrobiologische Analyse von Cyanocorrinoiden wurden diese aus den Zellen extrahiert und die Extrakte derivatisiert. Im Anschluss daran wurde das Extrakt einmal direkt vermessen und ein anderes Mal die Cyanocorrinoide vor der Messung zerstört, um den Einfluss der nichtcorrinoidalen Wachstumsfaktoren herausrechnen zu können.

2.12.1.1 Aufarbeitung der Proben für den mikrobiologischen Vitamin-B₁₂-Test

Die Versuche mit Vitamin B₁₂ wurden unter bestmöglichem Lichtausschluss durchgeführt, um Vitaminverluste zu vermeiden. Zudem wurde das eingesetzte Glasmaterial vor der Verwendung für 2 h bei 250 °C im Hitzeschrank von Vitamin-B₁₂-Rückständen befreit. Zur Aufarbeitung wurden alle Proben zunächst lyophilisiert (siehe Kapitel 2.4.2). Von diesen Lyophilisaten wurden jeweils 2 g als Probe zur Analyse herangezogen. Diese wurden im 100 mL Braunglasmesskolben mit 10 mL Natriumacetatpuffer 0,2 M (pH 4,5) und 0,4 mL 0,5 %iger Kaliumcyanidlösung versetzt und mit 40 mL bidest. Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde 15 min bei 200 UpM (Heidolph MR 3001, Deutschland) gerührt, dann 10 min bei 121 °C autoklaviert (2540 EL, Tuttnauer, Breda, Niederlande) und danach erneut auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden 0,6 mL meta-Phosphorsäure (10 %) zugegeben, für 30 min im Eisbad gerührt und mit entmineralisiertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt. 50 mL der Probe wurden in ein Probenröhrchen (50 mL) überführt und bei 4 °C und 4010 g zentrifugiert (Varifuge R3.OR, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde anschließend durch einen Faltenfilter MN614 ¼ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) filtriert. Vom Filtrat wurden zwei Aliquots von je 10 mL weiterverwendet. Die Aliquots wurden auf pH 6 (A) und pH 12 (B) mit 1 M HCl und 10 M NaOH eingestellt und quantitativ in einen 20 mL Braunglasmesskolben überführt. Aliquot A wurde mit demineralisiertem Wasser auf 20 mL im Messkolben aufgefüllt und mit einem Rotilabo-Spritzenfilter (CME, 0,45 µm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) sterilfiltriert. Aliquot B wurde erst 30 min bei 121 °C autoklaviert, dann auf pH 6 eingestellt, auf 20 mL aufgefüllt und sterilfiltriert. Die so behandelten Vitaminextrakte wurden für die Vitaminanalytik eingesetzt.

2.12.1.2 Aufarbeitung von Zellmaterial für den mikrobiologischen Vitamin-B₁₂-Test

50 mL Kulturbrühe von *L. reuteri* oder *A. pasteurianus* wurden bei 4010 g für 10 min zentrifugiert, das Pellet wurde zweimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und in 10 mL Natriumacetatpuffer pH 4,5 (0,2 M) mit 0,005 % KCN aufgenommen. Die Suspension wurde für 50 min bei 90° C im Wasserbad erhitzt und anschließend bei 4010 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei 5 mL Portionen (A und B) aufgeteilt, die dann weiterbehandelt wurden, wie in 2.12.1.1 beschrieben.

2.12.1.3 Turbidimetrische Analyse

Die Stammhaltung von *L. delbrueckii* ssp. *lactis* erfolgte in MRS-Bouillon anaerob bei 37 °C. Eine Vorkultur von *L. delbrueckii* ssp. *lactis* für den Vitamin-B₁₂-Test wurde mit 100 µL Zellsuspension in 7 mL AOAC Lactobacilli Broth über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Vorkultur wurde vor ihrem Einsatz dreimal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen, woraufhin, wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben, die Zellzahl bestimmt wurde und 10⁸ Zellen zu 50 mL Vitamin-B₁₂-Testbouillon gegeben (Suspension) wurden. Eine Kalibrierreihe mit Lösungen von 0, 40, 80, 120, 160 und 200 pg/mL Vitamin B₁₂ wurde aus einer 20 mg/L Stammlösung hergestellt. Die Extrakte wurden zur Analyse von 1:10 – 1:200 (Überstand A) und pur – 1:10 (Überstand B) verdünnt verwendet. Für den Test wurden die Standards fünffach und die Proben dreifach bestimmt. In jede Kavität einer Mikrotiterplatte (TC-Platte 96 Well, Suspension F, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden 200 µL Suspension und 100 µL Probe pipettiert. Die so vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden bei 550 nm mit einem Mikrotiterplattenphotometer (BioTek Instruments ELx808, Winooski, VT, USA) für einen Blindwert vermessen. Es erfolgte eine Inkubation für 48 h bei 37 °C mit anschließendem Resuspendieren der Zellen. Danach wurden die Proben erneut turbidimetrisch vermessen. Nach Abzug der Blindwerte und linearer Regression erfolgte die Berechnung der Wachstumsfaktorengehalte in den Proben sowie der Gehalt der nichtcorrinoïdalen Wachstumsfaktoren gemäß folgender Formel:

$$G_{\text{Wachstumsfaktoren}} = \frac{(Ex - t) VF \cdot 2 \cdot V}{m \cdot m_E \cdot 1000}$$

$G_{\text{Wachstumsfaktoren}}$: Wachstumsfaktorengehalt der jeweiligen Messung [ng/g]

Ex : Extinktion der jeweiligen Messung [Skt]

t : y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden [Skt]

VF : Verdünnungsfaktor der jeweiligen Messung

2: Verdünnungsfaktor, der aus der Extraktion resultiert (10 mL Probenextrakt wurde ad 20 mL verdünnt)

V : Extraktionsvolumen [mL]

m : Steigung der Kalibriergeraden $\left[\frac{\text{Skt} \cdot \text{mL}}{\text{pg}} \right]$

m_E : Masse der Einwaage [g]

1000: Umrechnung von pg in ng

Zur Berechnung des Gehalts physiologisch aktiver Cyanocorrinoide wurde der Gehalt der nichtcorrinoidalen Wachstumsfaktoren vom Wachstumsfaktoren-Gehalt subtrahiert.

2.12.2 Extraktion von Corrinoiden für chromatographische Analysen

2.12.2.1 Extraktion und Aufreinigung mittels C₁₈-Festphase

Für die Extraktion wurden die Proben in einem Wasserbad bei 30 °C aufgetaut und aus drei Probenröhrchen dreimal 3,33 mL zu 10 mL Fermentationsbrühe in einem Probenröhrchen (50 mL) vereinigt. Dies war nötig, um Sedimentationseffekten, die bei der Ernte am Ende der Fermentation entstehen entgegenzuwirken, da hierbei nicht mehr gerührt werden konnte (siehe Kapitel 2.10.6). Die 10 mL Fermentationsbrühe wurden mit 20 mL Natriumacetatpuffer pH 6.0 (0,2 M + 1 % KCN) gemischt. Kamen feste Proben zum Einsatz, so wurden 50 g Probe im Stomacher für 60 s auf Stufe 2 zerkleinert (Lab-Blender 400, Seward Laboratory, London, Großbritannien) und anschließend 10 g davon zur Extraktion eingesetzt. Die Suspension wurde für 40 min im Wasserbad bei 90 °C inkubiert, mit 5 M und 1 M Natriumhydroxyd-lösung auf pH 7 eingestellt, 15 min bei 4010 g zentrifugiert (Varifuge 3.OR) und durch einen Papierfilter (Mn 615 1/4 Ø 185, Macherey-Nagel, Düren, Germany) filtriert. 10 – 25 mL des Filtrats wurden auf eine konditionierte C₁₈-Festphasensäule (Sorbenmenge 1000 mg, Chromabond C18 ec, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gegeben und mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen/s, geregelt durch leichten Unterdruck, durch die Säule gesaugt. Die Konditionierung der Säule wurde mit 5 mL Methanol erreicht, die anschließend mittels 5 mL bidest. Wasser wieder entfernt wurden. Nach dem Probenauftrag erfolgte ein Waschschriff mit zweimal 5 mL einer 9+1 Wasser/Methanolmischung (v/v), an die sich die Elution mit zweimal 3 mL einer 3+2 Wasser/Methanolmischung (v/v) anschloss. Das im Spitzkolben aufgefangene Eluat wurde unter Vakuum in einem Rotationsverdampfer bei 60 °C (Vakuumpumpe: Vacuubrand, Typ PC500 series, Wertheim, Deutschland; Display: Vacuubrand CVC 3000, Wertheim, Deutschland; Waterbath: Heidolph, Schwabach, Deutschland) eingeeengt, in 1 mL bidest. Wasser + 0,1 % Ameisensäure aufgenommen, auf einem Vortexer für 30 s gelöst und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Perfect Flow PES 0,2 µm, Wicom, Heppenheim, Deutschland) filtriert. Diese Lösung wurde in HPLC-Mikrovials (400 µL vial, 32 x12 mm, Polypropylen (PP), VWR International, Radnor, USA) überführt und zur Messung eingesetzt.

2.12.2.2 Extraktion und Aufreinigung mittels Immunaffinitätschromatographie

10 mL Fermentationsbrühe wurden in ein Probenröhrchen (50 mL) überführt und mit 5 mL Natriumacetatpuffer pH 4,0 (50 mM), 0,5 g Pepsin, 0,1 g Amylase und 0,5 mL 1 %iger Kaliumcyanid-Lösung versetzt. Die Mischung wurde auf einem Vortexer (Reax Top, Heidolph, Schwabach, Deutschland) homogenisiert, in einem Schüttelwasserbad (Gyrotory Water Bath Shaker Model G 76, New Brunswick Scientific, Hamburg, Deutschland) für 3 h bei 37 °C inkubiert, gefolgt von einem Denaturierungsschritt in einem Wasserbad für 30 min bei 100 °C. Danach wurde die Probe für 15 min in einer Varifuge 3.OR bei 4010 g zentrifugiert und durch einen Papierfilter (Mn 615 1/4 Ø 185) filtriert. 4 mL des Filtrats wurden auf eine zuvor abgelassene Immunaffinitätssäule (EASI-EXTRACT® VITAMIN B₁₂, R-Biopharm Rhône LTD, Glasgow, Schottland) aufgebracht. Die Säule wurde mit 10 mL bidest. Wasser gewaschen und Wasserrückstände wurden durch 10 mL Luft entfernt. Die Elution der Corrinoiden wurde mit zweimal 3 mL Methanol durchgeführt, während die Säule mit je dreimal 10 mL Luft rückgespült wurde. Mit dem Eluat wurde weiter wie im Kapitel 2.12.2.1 beschrieben verfahren.

2.12.2.3 Corrinoidextraktion aus Zellmaterial

50 mL Kulturbrühe (siehe Kapitel 2.9) wurden in ein Reaktionsgefäß (50 mL) überführt und bei 4010 g für 20 min zentrifugiert (Varifuge 3.OR). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 10 mL Natriumacetatpuffer (pH 4,0, 50 mM) resuspendiert und 0,5 mL KCN Lösung (1%) hinzugefügt. Die Suspension wurde für 40 min bei 90 °C im Wasserbad (GFL 1004 water bath, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) erhitzt und 20 min bei 4010 g (Varifuge 3.OR) zentrifugiert. 9 mL des Überstands wurden auf eine zuvor abgelassene Immunaffinitätssäule aufgetragen. Anschließend wurde damit weiter verfahren wie im Kapitel 2.12.2.1 beschrieben

2.12.2.4 Bestimmung von Wiederfindungsraten und Vergleich der Immunaffinitätssäulen

Für die Extraktion von Vitamin B₁₂ wurde unter Einsatz von 1350 ng des Analyten eine Wiederfindungsrate in der Matrix Tofu 4 g und in 1,5 mL Wasser mit der Formel 6.1.1. (Anhang) bestimmt. Zum direkten Vergleich wurden Immunaffinitätssäulen mit und ohne Reservoir herangezogen (EASI-EXTRACT® VITAMIN B₁₂, EASI-EXTRACT® VITAMIN B₁₂ (LGE), R-Biopharm Rhône LTD, Glasgow, Schottland). Die Probe aus der Fermentation im Rührkessel mit Gartenbohnen wurde sechsmal so extrahiert wie in 2.12.2.2 dargelegt. Danach wurden die Extrakte vereint und anschließend vom vereinigten Extrakt je drei Aufreinigungen mit

den untersuchten Säulen durchgeführt. Die Aufreinigung mit den Säulen ohne Reservoir erfolgte wie in 2.12.2.2 beschrieben, bei den Säulen mit Reservoir wurde aber ein zusätzlicher Inkubationsschritt durchgeführt: dazu wurde die Probe aufgetragen, die Säule verschlossen und für 15 min bei 37 °C auf einem Rotationsständer bei 10 UpM (Stuart rotator SB3, Staffordshire, United Kingdom) platziert. Daraufhin wurde wie mit den Säulen ohne Reservoir weiter verfahren. Tests der Parameter Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ auf Normalverteilung, Varianzenhomogenität und Mittelwert-Vergleich wurden wie in Kapiteln 2.15.1, 2.15.3 und 2.15.4 beschrieben durchgeführt.

2.12.3 Hochleistungsflüssigchromatographie Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD)

Das verwendete HPLC System bestand aus einer Merck Hitachi L-7100 Pumpe, einem Merck Hitachi D-7000 Interface, einem Merck Hitachi L-7250 Probeninjektor und einem Merck Hitachi L-7455 Diodenarray-Detektor (alle Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland) sowie einem Entgaser HPLC Degasser 2004 (VWR International, Radnor, PA, USA). Die Software D-7000 HPLC-System-Management HSM, Version 4.1, wurde zur Verwaltung des HPLC-Systems herangezogen und zur Verarbeitung der Daten genutzt. Das Injektionsvolumen betrug 100 µL und das Eluat wurde mit einem Diodenarraydetektor bei 361 nm erfasst. Die chromatographische Trennung erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Beide HPLC-Analysen wurden bei Raumtemperatur ausgeführt.

Methode 1

Die Trennung erfolgte auf einer reversen Phase RP-18ec Säule (LiChoCART 125-4 mm I.D., LiChrospher 100, 5 µm, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min. Die Probe wurde mit den Laufmitteln bidest. Wasser + 1 % (v/v) Ameisensäure (A) und Methanol + 0,1 % (v/v) Ameisensäure (B) aufgetrennt. Es kam dabei der in Tabelle 3 gelistete Gradient zur Anwendung.

Tabelle 3: Zeitlicher Verlauf des Gradienten bei der HPLC-Trennung auf einer vollporösen RP-18ec Säule LiChoCART 125-4

Zeit [min]	H ₂ O bidest. (+ 0,1 % Ameisensäure) (A) [%]	Methanol (+ 0,1 % Ameisensäure) (B) [%]
0	80	20
2	80	20

3	75	25
11	65	35
19	80	20
20	0	100
22	0	100
26	80	20
36	80	20

Methode 2

Die Trennung der Probe mit einer teilporösen Säule Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7 µm); 4,6 × 150 mm (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) wurde bei einem Fluss von 0,7 mL/min durchgeführt. Die Laufmittel entsprachen denen aus Methode 1 und wurden mit dem in Tabelle 4 beschriebenen Gradienten verwendet.

Tabelle 4: Zeitlicher Verlauf des Gradienten bei der HPLC-Trennung auf einer teilporösen RP-18ec Säule Poroshell 120

Zeit [min]	H ₂ O bidest.	Methanol
	(+ 0,1 % Ameisensäure) (A) [%]	(+ 0,1 % Ameisensäure) (B) [%]
0	90	10
2	90	10
25	40	60
26	0	100
30	0	100
31	90	10
35	90	10

Die Quantifizierung von Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ erfolgte durch den Einsatz von sechs externen Cyanocobalaminstandards von 100 – 1100 ng/mL. Die Konzentration der Corrinoid wurde nach folgender Formel berechnet:

$$G_{\text{Corrinoid}} = \frac{(\text{Fläche} - t) \cdot V_{\text{Extraktion}}}{m \cdot m_E \cdot V_{\text{Säule}}}$$

$G_{\text{Corrinoid}}$: Corrinoidgehalt der jeweiligen Messung [ng/g] oder [ng/mL]

Fläche : Fläche des Signals [Skt]

t : y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden [Skt]

$V_{\text{Extraktion}}$: Extraktionsvolumen [mL]

- m : Steigung der Kalibriergeraden $\left[\frac{\text{Skt} \cdot \text{mL}}{\text{ng}} \right]$
- m_E : Masse der Einwaage [g] bzw. Volumen der Probe [mL]
- $V_{\text{Säule}}$: Volumen, welches auf die Säule aufgetragen wurde [mL]

2.12.4 Ultrahochleistungsflüssigchromatographie Massenselektive-Detektion (UHPLC-MS)

Die Corrinoiden wurden wie in 2.12.3 beschrieben aufgetrennt, allerdings mit einer geringeren Fließgeschwindigkeit von 0,4 mL/min. Die chromatographische Trennung wurde auf einem Thermo Scientific System Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland) durchgeführt, das aus einer Pumpe, einem Autosampler und einem Säulenofen bestand. Dabei wurde mit einem geringeren Injektionsvolumen von 50 µL gearbeitet. Zur Detektion wurde ein Massenspektrometer Bruker maXis 3G QTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) mit einer ESI Ionenquelle eingesetzt, die im positiven Ionenmodus lief. Die Ionisierung wurde bei folgenden Parametereinstellungen durchgeführt: End Plate Offset 200 V, Kapillarspannung 4000 V, Nebulizerdruck von 4.0 bar, Trocknungsgasfluss von 9.0 L/min, einer Trocknungstemperatur von 200 °C und einem Massenbereich von 80 – 1500 m/z . Die Methoden-Parameter wurden für das Signal des doppelt geladenen Cyanocobalamin-Ions $[M+2H]^{2+}$ mit 678,30 m/z optimiert. Die Fragmentierung des Vorläuferions erfolgte mit einer Kollisionsenergie von 36 eV.

2.13 Bestimmung des Gesamtfolatgehalts

2.13.1 Extraktion von Folaten

Die Versuche mit Vitamin B₉ wurden unter bestmöglichem Lichtausschluss durchgeführt, um Vitaminverluste zu vermeiden. Zudem wurde das eingesetzte Glasmaterial vor der Verwendung für 2 h bei 250 °C im Hitzeschrank von Vitamin-B₉-Rückständen befreit.

Phosphatpuffer 0,1 M pH 6,1

1 M Kaliumdihydrogenphosphat	80 mL
1 M Dikaliumhydrogenphosphat	20 mL
Natriumascorbat	10 g
pH-Wert mit Phosphorsäure und Kaliumhydroxid	6,1
Wasser (demineralisiert und steril)	ad 1000 mL

Pankreatin-Lösung 0,5 % (γ -Glutamylhydrolase)

Getrocknete Bauchspeicheldrüse vom Huhn	0,5 g
Natriumascorbat	10 g
0,1 M Phosphatpuffer eingestellt mit Kaliumhydroxid auf pH 7,8	ad 100 mL

Zur Aufarbeitung von festen Proben wurden zunächst 10 g gestomachert (Kapitel 2.12.2.1). Davon wurde 0,5 g zur Analyse eingesetzt und bei flüssigen Proben wurde je 1 mL verwendet. Im 20 mL Braunglasmesskolben wurden die Proben mit 6 mL sterilem bidest. Wasser und 4 mL Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6,1) verdünnt. Diese Lösung wurde 15 min im Wasserbad bei 100 °C extrahiert und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung auf 20 mL mit Phosphatpuffer aufgefüllt und durch einen Faltenfilter MN614 $\frac{1}{4}$ filtriert. 1 mL des Filtrats wurde mit 3,5 mL Pankreatin-Lösung in einen 10 mL Braunglasmesskolben gegeben und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Überführung der Polyglutamate in die Monoglutamatform wurde die Probe zur Inaktivierung der Enzyme für 3 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzt, anschließend wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und ad 10 mL mit Phosphatpuffer aufgefüllt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden mittels Rotilabo-Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert und für die Vitaminanalytik eingesetzt.

2.13.2 Turbidimetrische Analyse

Die Vorkultur von *L. rhamnosus* erfolgte analog zu Kapitel 2.12.1, wobei 10^8 Zellen zu 50 mL Vitamin-B₉-Testbouillon gegeben wurden (Suspension). Eine Kalibrierreihe mit Lösungen von 0, 20, 50, 80, 110, 140, 170 und 200 pg/mL Vitamin B₉ wurde aus einer 200 mg/L Stammlösung mit sterilem bidest. Wasser hergestellt. Die Extrakte wurden zur Analyse pur und 1:5 - 1:20 verdünnt eingesetzt. Für den Test wurden die Standards fünffach und die Proben dreifach bestimmt. In jede Kavität einer Mikrotiterplatte wurden 200 μ L Suspension und 100 μ L Probe pipettiert. Die so vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden bei 550 nm mit einem Mikrotiterplattenphotometer zum Erhalt eines Blindwerts vermessen. Es erfolgte eine anaerobe Inkubation für 48 h bei 30 °C mit anschließendem Resuspendieren der Zellen. Danach wurden die Proben erneut turbidimetrisch vermessen. Nach Abzug der Blindwerte und linearer Regression erfolgte die Berechnung der Gesamtfolatgehalte in den Proben nach folgender Formel (Beschreibung siehe nächste Seite):

$$G_{\text{Gesamt-Folat}} = \frac{(Ex - t) VF \cdot 10 \cdot V}{m \cdot m_E \cdot 1000}$$

$G_{\text{Gesamt-Folat}}$:	Gesamtfolatgehalt der jeweiligen Messung [ng/g]
Ex :	Extinktion der jeweiligen Messung [Skt]
t :	y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden [Skt]
VF :	Verdünnungsfaktor der jeweiligen Messung
10:	Verdünnungsfaktor, der aus der Extraktion resultiert (1 mL Probenextrakt wurde ad 10 mL verdünnt)
V :	Extraktionsvolumen [mL]
m :	Steigung der Kalibriergeraden $\left[\frac{\text{Skt} \cdot \text{mL}}{\text{pg}} \right]$
m_E :	Masse der Einwaage [g]
1000:	Umrechnung von pg in ng

2.14 Zucker und organische Säuren

2.14.1 Extraktion von organischen Säuren und von Glycerin

Für die Aufarbeitung wurde 1 mL der Fermentationsbrühe in ein Mikroreaktionsgefäß (Safe-Lock Tube 2,0 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt und zur Entfernung der Proteine 40 µL Kaliumhexacyanoferrat(III)-trihydrat (150 g/L) hinzugegeben. Nach dreimaligem Invertieren wurden 40 µL Zinksulfat-heptahydrat (300 g/L) und 920 µL bidest. Wasser dazugegeben und die Probe auf einem Vortexer homogenisiert. Die Sedimentation der ausgefällten Proteine wurde durch Zentrifugation bei 9503 g für 5 min erreicht (Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Deutschland). 1 mL des Überstands wurden mit einem Spritzenvorsatzfilter (Perfect Flow PES 0,2 µm) gefiltert und in eine 1,5-mL-Gewindeflasche (32 · 12 mm, VWR International, Radnor, USA) für den Autosampler überführt.

2.14.2 Extraktion von Zuckern und Ethanol

Die Entfernung der Proteine aus den Proben erfolgte wie im Kapitel 2.14.1 beschrieben. Anschließend wurden die organischen Säuren mittels einer Anionenaustauschersäule

(Strata-X-A 33u Polymeric Strong Anion 200 mg/3 mL, Phenomenex, Torrance, USA) entfernt. Dazu wurde die Säule mit 1 mL 0,1 M Salzsäure equilibriert und mit 5 mL bidest. Wasser gewaschen. Danach wurde 1 mL Überstand mit einer Geschwindigkeit von 5 Tropfen/s über die Säule gegeben und in einem Mikroreaktionsgefäß (Safe-Lock Tube 2,0 mL) aufgefangen. Mit 1 mL bidest. Wasser wurde die Säule gewaschen und das Eluat ebenfalls aufgefangen. Die so behandelte Probe wurde sterilfiltriert (Perfect Flow PES 0,2 µm, Wicom, Heppenheim, Deutschland) und in eine 1,5-mL-Gewindeflasche überführt.

2.14.3 Hochleistungsflüssigchromatographie mit Brechungsindex-Detektion (HPLC-RI)

Das verwendete HPLC-System bestand aus einem Degaser ERC 3512 (Erma, Tokyo, Japan), einem Autosampler AS-2000A, einer Intelligent pump L-6200, einem Säulenofen L-7350D und einem Brechungsindex Detektor L-7490 (alle Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland). Die Software D-7000 HPLC-System-Management HSM, Version 4.1, wurde zur Verwaltung des HPLC-Systems herangezogen und zur Verarbeitung der Daten genutzt.

Die Glucose-, Galactose-, Mannitol- und Fructosekonzentrationen sowie die Lactat-, Acetat-, Propionat-, Glycerin und Ethanolkonzentrationen in der Fermentationsbrühe wurden mit dem HPLC-System bestimmt. Die Trennung der Probe erfolgte mit dem Verfahren der Ionenaustauschchromatographie und einer isokratischen Elution. Die eluierten Stoffe wurden über einen Brechungsindexdetektor erfasst, dessen Signal von einem Rechner ausgewertet und in einem Chromatogramm dargestellt wurde.

Bei der Säule zur Analyse von Glycerin, Milch-, Essig- und Propionsäure handelte es sich um eine Organic Acid Column, 850 BP-OA H⁺-Ionenaustauscher, 300 x 7,8 mm (Benson, Polymeric, USA). Die Trennung erfolgte bei 60 °C, mit 26 mM H₂SO₄ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 mL/min. Das Injektionsvolumen betrug 30 µL und das Eluat wurde mit einem Brechungsindexdetektor erfasst. Die gemessenen Werte wurden durch lineare Regression in die jeweiligen Konzentrationen umgerechnet. Die linearen Regressionen wurden zu Standards von 0,625 – 10 g/L berechnet.

Zur Analyse von Glucose, Fruktose, Mannitol und Ethanol wurde eine Rezex RCM-Monosaccharide Ca²⁺-Säule (Phenomenex, Torrance, CA, USA) verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min und einer Temperatur von 80 °C isokra-

tisch mit dem Laufmittel bidest. Wasser. Die gemessenen Werte wurden durch lineare Regression in die jeweiligen Konzentrationen umgerechnet. Die linearen Regressionen wurden zu Standards von 0,625 – 10 g/L berechnet. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte mit folgender Formel:

$$G_{Analyt} = \frac{(Fläche - t) \cdot VF}{m}$$

G_{Analyt} : Analytgehalt der jeweiligen Messung [ng/mL]

$Fläche$: Fläche des Signals [Skt]

t : y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden [Skt]

VF : Verdünnungsfaktor [mL]

m : Steigung der Kalibriergeraden $\left[\frac{\text{Skt} \cdot \text{mL}}{\text{ng}} \right]$

2.15 Auswertung und Statistik

2.15.1 Test auf Normalverteilung der Stichprobe nach David

Die Normalverteilung der Cobaltgehalte wurde über den Quotienten der Spannweite der Messwerte durch deren Standardabweichung geprüft und nach der Formel 6.1.3 (Anhang) berechnet. Das berechnete Verhältnis wurde mit den kritischen Grenzen hinsichtlich des Vorliegens einer Normalverteilung aus Hedderich (2018) verglichen. Die Nullhypothese (Normalverteilung liegt vor) wurde nicht verworfen, wenn die Prüfgröße zwischen oberer und unterer kritischer Grenze (OQ = oberes Quantil und UQ = unteres Quantil) für eine Normalverteilung der Stichprobe lag.

2.15.2 Ausreißertest nach Dean Dixon

Proben, die mindestens dreimal aufgeschossen und vermessen wurden, wurden einem Ausreißertest nach Dixon (1950) unterzogen und mit aktuellen Tabellenwerten nach Verma und Quiroz-Ruiz (2006) verglichen. Dazu wurden die Messwerte der Größe nach sortiert und es wurde eine Prüfgröße (PG) nach der Formel 6.1.2 (Anhang) berechnet. Anschließend wurde die Prüfgröße mit dem Tabellenwert verglichen. Im Fall von $PG > \text{Tabellenwert}$ wurde die Nullhypothese (untersuchter Messwert ist kein Ausreißer, sondern Element derselben Normalverteilung) verworfen und der untersuchte Messwert als Ausreißer angesehen.

2.15.3 Test auf Varianzenhomogenität (F-Test)

Die Homogenität der Varianzen der Cobaltgehalte der zwei Stichproben Tofusorte 1 und Tofusorte 2 wurde mittels eines F-Tests geprüft. Dazu wurden die Varianzen der beiden Stichproben berechnet sowie deren Verhältnis (siehe 6.1.4). Die Prüfgröße wurde mit der zugehörigen kritischen Grenze der Fischer-Verteilung (Hedderich 2018) verglichen und die Nullhypothese (Varianzen sind gleich) im Falle von $PG > \text{Tabellenwert}$ verworfen.

2.15.4 Vergleich der Erwartungswerte (Zweistichproben-*t*-Test)

Mit einem Zweistichproben-*t*-Test für unabhängige Stichproben wurden die Mittelwerte der Cobaltgehalte der beiden Tofusorten verglichen. Als Voraussetzungen wurden Normalverteilung und homogene Varianzen sichergestellt. Zur Entscheidungsfindung, ob die Nullhypothese (Mittelwerte sind gleich) verworfen werden sollte, wurde das Verhältnis von der Differenz der Stichprobenmittelwerte zu dem Standardfehler der Differenz der beiden Mittelwerte berechnet (siehe 6.1.5). Die Prüfgröße wurde mit der zugehörigen kritischen Grenze der *t*-Verteilung (Hedderich 2018) verglichen und im Fall von $PG > \text{Tabellenwert}$ verworfen.

2.15.5 Vergleich der Erwartungswerte bei gepaarten Stichproben

Der paarweise Vergleich der Vitamin-B₁₂-Gehalte von Fermentationsbrühen mit Kichererbsen- und Gartenbohnen-Extrakten wurde mit einem *t*-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Die Paarung erfolgte hierbei nach gemeinsamer Fermentationsreihe. Zur Entscheidungsfindung, ob die Nullhypothese (Differenz der Wertepaare ist Null) verworfen werden sollte, wurde das Verhältnis von der mittleren Differenz der Wertepaare zu dem Standardfehler der mittleren Differenz berechnet (siehe 6.1.5). Die Prüfgröße wurde mit der zugehörigen kritischen Grenze der *t*-Verteilung (Hedderich 2018) verglichen und im Fall von $PG > \text{Tabellenwert}$ verworfen.

2.15.6 Modellierung der Prozessergebnisse

Die Versuche wurden nach wiederholter Durchführung mit Hilfe des Programms MODDE® (Sartorius, Göttingen, Deutschland) ausgewertet. Es wurde je ein multiples lineares Regressionsmodell nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate auf die beiden Zielvariablen Vitamin-B₁₂-Gehalt in der Fermentationsbrühe und Ausbeute bei der Extraktion erstellt. Die Auswahl der Terme für das Modell begann mit allen drei Steuergrößen und deren Inter-

aktionen. Schrittweise wurden einzelne Terme entfernt, deren skalierte und zentrierte Koeffizienten nicht signifikant waren (Koeffizient $\pm 95\%$ -Konfidenzintervall des Koeffizienten enthielt den Wert 0). Die Skalierung und Zentrierung erfolgte per z-Transformation. Für die Beurteilung des Modells wurden das Bestimmtheitsmaß (R^2) und das kreuzvalidierte Bestimmtheitsmaß (Q^2) verwendet. Zur Validierung des Modells wurde außerdem die Zielvariable randomisiert und eine erneute Modellberechnung durchgeführt. Neben der Randomisierung wurden vorhergesagte Werte mit Daten aus vorherigen Experimenten verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Vitamin-B₁₂-Analyse mittels Immunitätschromatographie

Vor dem Einsatz zur Fermentation wurden die beiden Tofusorten sowie die Proben Kichererbsen und Gartenbohne auf ihren Vitamin-B₁₂-Gehalt hin untersucht, wobei in keiner der untersuchten Proben Vitamin B₁₂ oder Pseudovitamin B₁₂ nachgewiesen werden konnte. Für die Matrix Tofu der Tofusorte 1 konnte eine mittlere Wiederfindungsrate von $83,2 \pm 3,7\%$ ($n = 3$) bestimmt werden. Im Vergleich zur Wiederfindungsrate in Wasser $94,9 \pm 8,7\%$ ($n = 3$) ist die Wiederfindungsrate in Tofu zwar geringer, weist aber auch eine geringere Streuung auf. Es muss in der Folge davon ausgegangen werden, dass Bestandteile der Probenmatrix die Extraktion mehr oder weniger stark erschweren. In diesem Zusammenhang muss auch bedacht werden, dass die Wiederfindungsraten nicht zwangsläufig exakt auf fermentierte Proben übertragen werden können. Aufgrund der einfacheren Handhabung der Probenmatrix Fermentationsbrühe und der etwas höheren Wiederfindungsrate wurde im weiteren Verlauf der Fokus auf die Fermentationsbrühen gelegt. Um die Qualität der Aufreinigung von Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ aus einer Fermentationsprobe abschätzen zu können, wurde dies anhand der Fermentation von Tofu mit Gartenbohnen untersucht.

Anhand der derivatisierten Fermentationsprobe wurden die zwei unterschiedlichen Immunitätschromatographiesäulentypen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ aufzureinigen. Die Ergebnisse dazu sind in der Tabelle 5 dargelegt. Das Verhältnis von Spannweite der Messwerte zu deren Standardabweichung spricht jeweils dafür, die

Normalverteilungsannahme nicht abzulehnen ($PG_{\text{Vitamin B}_{12}} = 1,772$ und $1,999$; $PG_{\text{Pseudovitamin B}_{12}} = 1,800$ und $1,958$; $UQ = 1,745$; $OQ = 2,000$; $\alpha = 0,025$). In den normal-verteilten Stichproben wird deutlich, dass sich die Mittelwerte im Falle von Vitamin B₁₂ bei vorliegender Varianzenhomogenität ($PG = 1,52$; $F_{\text{krit.}}(2; 2; 0,975) = 39,00$; $p = 0,7952$) nicht signifikant unterscheiden ($PG = 2,03$; $t_{\text{krit.}}(4; 0,975) = 2,78$; $p = 0,1122$). Dagegen sind die Unterschiede der Mittelwerte bei gegebener Varianzenhomogenität ($PG = 6,58$; $F_{\text{krit.}}(2; 2; 0,975) = 39,00$; $p = 0,2639$) des Analyten Pseudovitamin B₁₂ signifikant ($PG = 4,91$; $t_{\text{krit.}}(4; 0,975) = 2,78$; $p = 0,0080$). Die lange Inkubationszeit bei den EASI-EXTRACT Vitamin B₁₂ LGE Säulen beeinflusst die Bindung von Pseudovitamin B₁₂ an die Antikörper der Säule offensichtlich positiv. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden diese größeren Säulen nur für die Analysen der Fermentationsbrühen der Fed-Batch-Fermentationen von Tofu mit Rohstoffen gewählt (Kapitel 3.6) und ansonsten die kleineren Säulen verwendet, da diese eine kürzere Analysezeit ermöglichten.

Tabelle 5: Vergleich der Analytkonzentration eines derivatisierten Extrakts einer Fermentationsprobe aufgereinigt mit unterschiedlichen Immunaффinitätssäulen. Die Varianzen der unterschiedlichen Analyten Vitamin B₁₂ (VB₁₂) und Pseudovitamin B₁₂ (PSB₁₂) erwiesen sich als homogen. Die Mittelwerte (a) des Analyten Vitamin B₁₂ wurden in t-Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ als nicht signifikant unterschiedlich erkannt. Die Mittelwerte (b) des Analyten Pseudovitamin B₁₂ wurden mithilfe von t-Tests auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ als signifikant unterschiedlich erkannt.

Analyt	Säulentyp	Wiederholung			Mittelwert [ng/mL]	Standard- abweichung [ng/mL]
		# 1 [ng/mL]	# 2 [ng/mL]	# 3 [ng/mL]		
VB ₁₂	EASI-EXTRACT Vitamin B ₁₂	88,3	97,0	88,7	91,3 _a	4,96
	EASI-EXTRACT Vitamin B ₁₂ (LGE)	106,5	94,3	100,7	100,5 _a	6,10
PSB ₁₂	EASI-EXTRACT Vitamin B ₁₂	46,6	61,7	60,5	56,3 _b	8,38
	EASI-EXTRACT Vitamin B ₁₂ (LGE)	78,9	81,0	85,3	81,7 _b	3,27

3.2 Bioinformatische Untersuchungen am *Acetobacter* Genom

Der Stamm *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 zeigte auch nach dem achten Überimpfen in Vitamin-B₁₂-Testbouillon noch Wachstum in Abwesenheit von Vitamin B₁₂. Um die Fähigkeit der Cobalaminbiosynthese zu bestätigen, wurde die DNA-Sequenz des Uro-III-Gens amplifiziert. Die PCR von *uro III* in *A. pasteurianus* brachte ein Produkt mit der gleichen Größe und

identischen Sequenz von *uro III* in *Acetobacter pasteurianus* IFO 3191 (Abbildung 4) hervor, welcher als Positivkontrolle herangezogen wurde.

Neben der PCR wurde das annotierte Proteom von *A. pasteurianus* ssp. *ascendens* LMG1590 mit BlastKOALA auf orthologe bekannte Proteinsequenzen der Cobalaminbiosynthese durchsucht (Liste siehe Anhang 6.3). Dabei wurde nahezu der gesamte aerobe Biosyntheseweg gefunden, wie er von Roessner et al. (2002) zusammengefasst wurde. Dieser umfasst die Gene *hemB*, *hemC*, *hemD*, *cobA*, *cobI*, *cobG*, *cobM*, *cobK*, *cobL*, *cobH*, *cobB*, *cobNST*, *cobO*, *cobQ*, *cobC*, *cobD*, *cobP*, *cobV* und *cobU*. Nur die beiden Gene *cobJ* und *cobF* fehlten. Nebst dem Biosyntheseweg wurden auch drei Enzyme gefunden, deren Funktion die Anwesenheit von Cobalamin bedarf. Das erste derartige Enzym, welches durch die Gene *eutB* und *eutC* codiert wird, war die Ethanolamin-Ammonium-Lyase. Das zweite Enzym wurde als Vitamin-B₁₂-abhängige Ribonukleotid-Reduktase erkannt und das letzte Enzym war nicht in der FASTA-Datei benannt, wurde aber von BlastKOALA als cobalaminabhängige Methionin-Synthase Meth identifiziert. Das Gen für die cobalaminunabhängige Methionin-Synthase *metE* wurde ebenfalls aufgefunden. Die Suchergebnisse für den Stamm *A. pasteurianus* ssp. *pasteurianus* SRCM101468 waren nahezu identisch. Lediglich das Gen, welches CobQ codiert, wurde nicht gefunden.

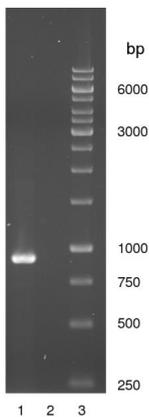


Abbildung 4: Agarosegelelektrophorese des Uroporphyrinogen-III-Synthase PCR Produkts vervielfältigt aus dem Chromosom von *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509. Bahn 1, Zielfragment mit 910 bp in *A. pasteurianus*; Bahn 2, Negativkontrolle; Bahn 3, 1kb DNA Marker.

3.3 Corrinoid-Analyse mit quantitativem mikrobiologischem Test

Nach der Fermentation von Vitamin-B₁₂-Testbouillon durch *A. pasteurianus* DSM 3509, wurden 4,57 ng/mL Cyanocorrinoide und 0,75 ng/mL nicht-corrinoide Wachstumsfaktoren gefunden. Im Vergleich zu *L. reuteri* produzierte *A. pasteurianus* weniger Cyanocorrinoide, dafür aber mehr nicht-corrinoide Wachstumsfaktoren (Abbildung 5). Annähernd 86 % des *A. pasteurianus* Produkts waren Cyanocorrinoide, die unter aeroben Bedingungen produziert wurden.

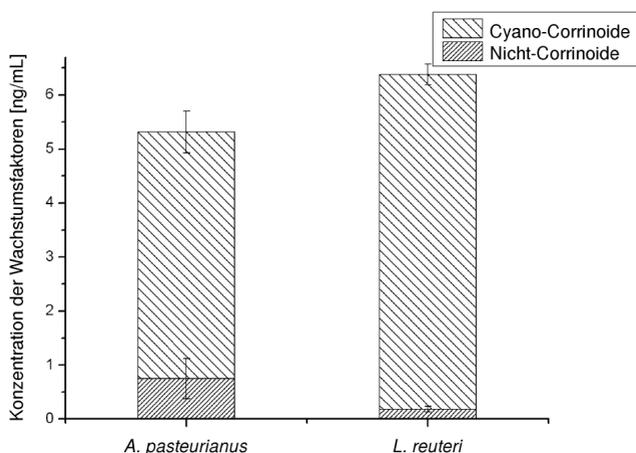


Abbildung 5: Die gemittelten Konzentrationen der Cyanocorrinoide und der nicht-corrinoidalen Wachstumsfaktoren mit Standardabweichung produziert von *A. pasteurianus* and *L. reuteri* (n = 3) in zuvor Vitamin-B₁₂-freiem Medium (n = 3).

3.4 Identifikation der isolierten Corrinoid

Abbildung 6 zeigt, dass das Produkt von *A. pasteurianus* mit 16,66 min die gleiche Retentionszeit besitzt wie die Vitamin-B₁₂-Standardlösung. Dies deutet auf strukturelle chemische Ähnlichkeit hin. Im Kontrast dazu wurde für das Produkt von *L. reuteri* eine Retentionszeit von 16,22 min bestimmt, wodurch sich auf leichte chemische Unterschiede in den analysier-

ten Produkten schließen lässt. Außerdem wurden die Absorptionsspektren der per HPLC getrennten Produkte von *A. pasteurianus*, *L. reuteri* und einer Standardlösung verglichen (Abbildung 7). Alle drei Spektren waren identisch und zeigten signifikante Peaks bei 364 nm sowie 567 nm. Dies legt nahe, dass *A. pasteurianus* ein sehr ähnliches Molekül produziert. Aus diesem Grund wurde *P. freudenreichii* auf die Produktion von Corrinoiden hin untersucht und so konnte gezeigt werden, dass dessen Produkt in Cyano-Form isoliert dem von *A. pasteurianus* entspricht und somit die gleiche Retentionszeit aufwies wie ein Vitamin-B₁₂-Standard.

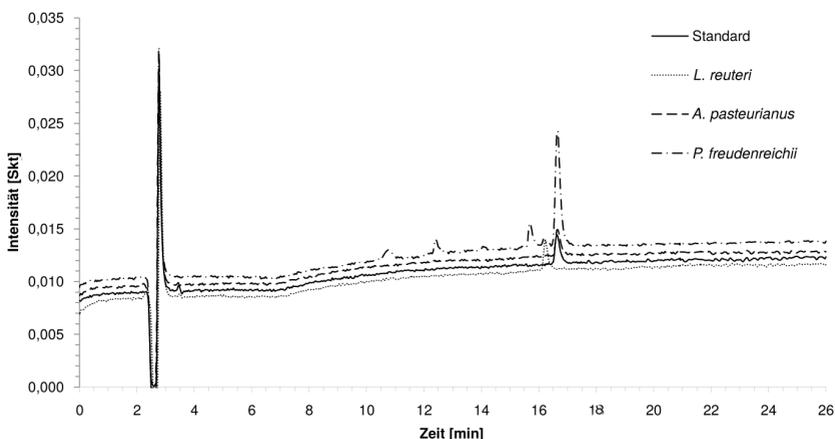


Abbildung 6: Chromatographischer Vergleich der derivatisierten Kulturextrakte nach Immunitäts-Aufreinigung. Diese HPLC-Chromatogramme wurden nach einer Immunitäts-Aufreinigung der Cyano-Corriinoide aus einer Fermentationsprobe der Stämme *P. freudenreichii* (— · — ·), *A. pasteurianus* (---), *L. reuteri* (·····) und von einer Cyanocobalamin-Standardlösung 300 ng/mL (—) aufgenommen. Die Retentionszeiten der Cyano-Corriinoide von *P. freudenreichii* und *A. pasteurianus* stimmen mit der Retentionszeit von Cyanocobalamin bei 16,66 min überein. Die Retentionszeit des Cyanocorriinoids, derivatisiert und aufgereinigt aus einem *L. reuteri* Extrakt, unterscheidet sich mit 16,22 min deutlich von den anderen.

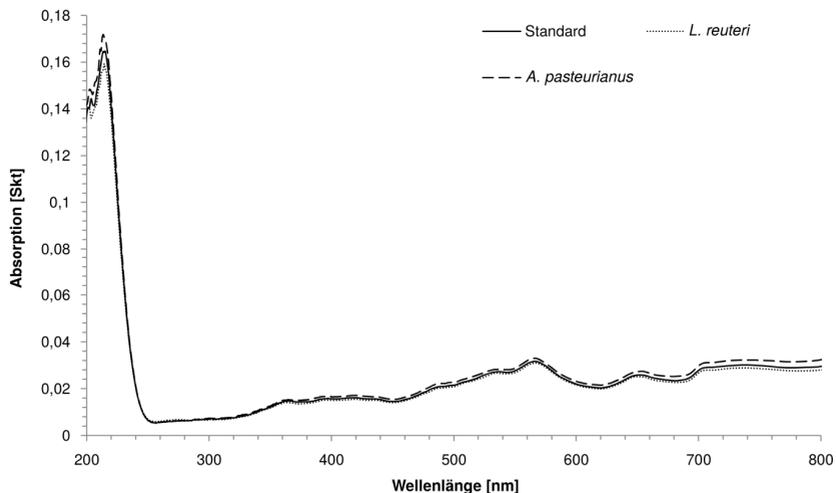


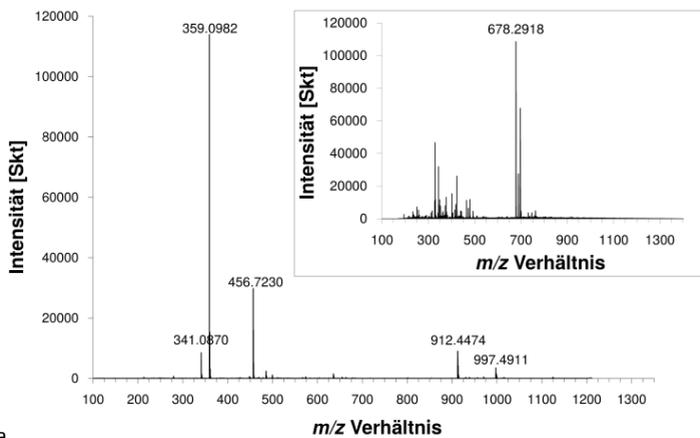
Abbildung 7: Absorptionsspektren von Cyanocobalamin bei der Elution in einem Methanol-Wasser-Gemisch (40:60) mit 0,1 % Ameisensäure im Vergleich zu Fermentationsprodukten aus Fermentationen mit *A. pasteurianus* und *L. reuteri*. Beim Vergleich der Extrakte mit der Standardlösung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Messwerte für die erwarteten Substanzen, quantifiziert per HPLC-DAD, sind in der Tabelle 6 aufgezeigt. In der Wiederholung 1 der *P. freudenreichii* Kultur war die Vitamin B₁₂ Akkumulation höher als in der Wiederholung 2. Die gemessenen Konzentrationen von Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ in den Kulturen von *L. reuteri* und *A. pasteurianus* spiegeln in etwa die Konzentrationen des mikrobiologischen Tests wieder.

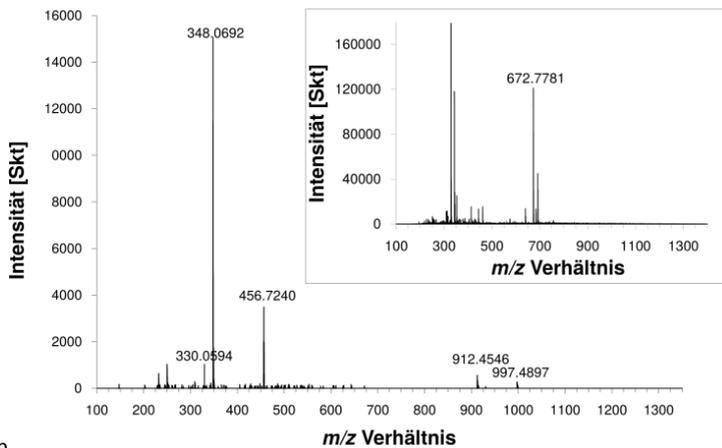
Tabelle 6: Konzentrationen von Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ in [ng/mL] aus den Kulturen von *A. pasteurianus* in Vitamin-B₁₂-Testbouillon und *L. reuteri* in Vitamin-B₁₂-Testbouillon sowie *P. freudenreichii* in ProM-Bouillon. Die Analyten wurden nach Immunaффinitätsaufreinigung und HPLC-Trennung quantifiziert.

Stamm	Vitamin B ₁₂		Pseudovitamin B ₁₂	
	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 1	Wiederholung 2
<i>A. pasteurianus</i>	7,3	3,6	nichts detektiert	nichts detektiert
<i>L. reuteri</i>	nichts detektiert	nichts detektiert	7,7	3,0
<i>P. freudenreichii</i>	64,48	28,2	nichts detektiert	2,2

Die Strukturaufklärung der vorhergesagten Moleküle Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ erfolgte per Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) im Anschluss an eine chromatographische Auftrennung. Zur Fragmentierung wurden die zweifach geladenen Quasi-Molekülonen [M+2H]²⁺ herangezogen, da diese die größten Massensignale aufwiesen (Abbildung 8). Im Fall der extrahierten Probe aus *L. reuteri* war dies für das Ion mit dem Masse-Ladungsverhältnis 672,7781 m/z (Abbildung 8 b) der Fall. Für die drei anderen Proben Cyanocobalamin Standard, extrahierte Probe aus *P. freudenreichii* und extrahierte Probe aus *A. pasteurianus* besaß das häufigste zweifach geladene Ion ein Masse-Ladungsverhältnis von 678,2918 m/z (Abbildung 8 a), 678,2927 m/z (Abbildung 8 d) und 678,2912 m/z (Abbildung 8 c). Diese entsprechen dem Molekulargewicht von Pseudovitamin B₁₂ im ersten Fall und dem von Vitamin B₁₂ in den letzteren Fällen, wie sie auch schon von Tanioka et al. (2012), Ishihara et al. (2013), Tanioka et al. (2014), Deptula et al. (2015) und Chamlagain et al. (2018) bestimmt wurden. Die aufgenommenen MS/MS-Fragmentspektren passten ebenfalls zu den erwähnten Strukturen. Die Fragmentsignale 997,49 m/z [M+H-Base-Zucker-PO₃]⁺ und 912,44 m/z [M+H Base-Zucker-PO₃-CN-Co]⁺, wie von Ishihara et al. (2013), Tanioka et al. (2014) und Chamlagain et al. (2015) beschrieben, wurden in beiden Fällen gefunden. Die Fragmentmuster unterschieden sich in den Fragmenten des unteren Liganden, wobei die Fragmente von 348,0692 m/z als [Ade+Zucker+PO₃]⁺ und 359,0981 m/z als [DMBI+Zucker+PO₃]⁺ in Übereinstimmung mit Santos et al. (2007), Ishihara et al. (2013), Tanioka et al. (2014), Chamlagain et al. (2015) und Deptula et al. (2015) identifiziert wurden. Das nicht identifizierte Fragment mit 341,0870 m/z, das ebenfalls von Chamlagain et al. (2018) bei Vitamin B₁₂ gefunden wurde, unterstützt die Ergebnisse.

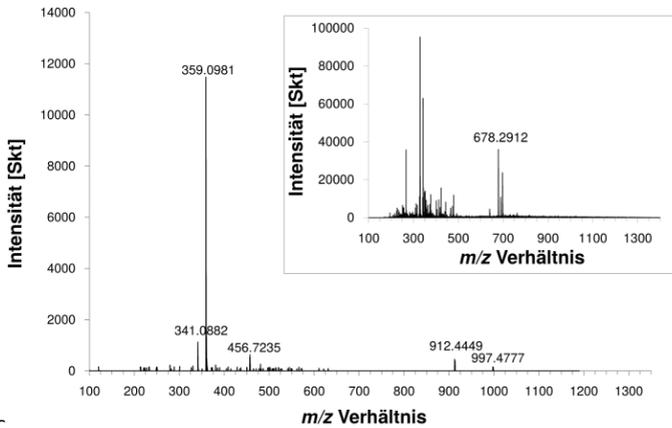


a

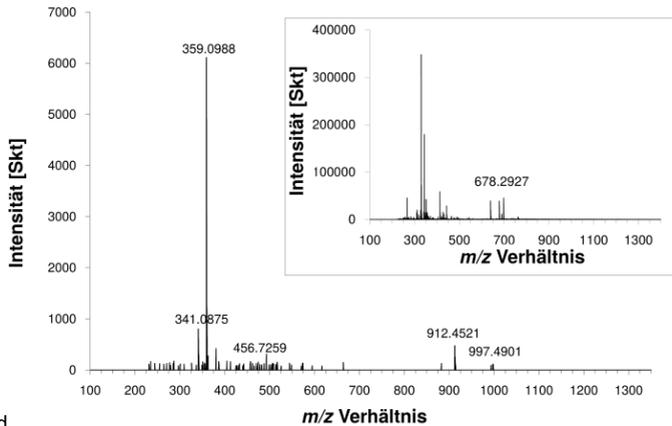


b

Fortsetzung der Abbildung 8 auf der nächsten Seite



c



d

Abbildung 8: Fragmentspektren der extrahierten Cyanocorrinoide nach Immunaффinitäts-Aufreinigung und HPLC-MS/MS. Die Fragmentierung des doppelt geladenen quasi-Moleküls von Cyanocobalamin (a) mit dem Masse-Ladungsverhältnis 678,2918 m/z $[M+2H]^{2+}$ (Einfügung), resultierte in den signifikanten Fragmenten 997,4911 $[M+H-DMBI-Zucker-PO3]^+$, 912,4474 $[M+H-DMBI-Zucker-PO3-CN-Co]^+$, 456,7230 $[?]$, 359,0982 $[DMBI+Zucker+PO3]^+$ und 341,0870 $[?]$. Die Fragmentierung des Cyanocorrinoids (b) mit dem Masse-Ladungsverhältnis von 672,7781 m/z $[M+2H]^{2+}$ (Einfügung) extrahiert aus *L. reuteri* resultierte in den Fragmenten 997,4897 $[M+H-Ade-Zucker-PO3]^+$ und 912,4546 $[M+H-Ade-Zucker-PO3-CN-Co]^+$, 456,7240 $[?]$, 348,0692 $[Ade+Zucker+PO3]^+$ und 330,0594 $[?]$. Diese Fragmente stimmen mit dem bekannten Fragmentmuster von Pseudovitamin B₁₂ überein. Die Fragmentmuster der Cyanocorrinoide extrahiert aus *A. pasteurianus* (c) und *P. freudenreichii* (d) passten zu den bekannten Fragmentmustern von Cyanocobalamin. Insbesondere waren die Signale mit dem Masse-Ladungsverhältnis von 359,0981 m/z und 341,0882 m/z nach der Fragmentierung des doppelt geladenen quasi-Moleküls 678,2912 m/z signifikant.

Die Corrinioide der Fermentationsproben wurden ebenfalls chromatographisch und massenspektrometrisch identifiziert. Die chromatographische Trennung der Cyanocorrinoide aus einer Co-Fermentationsprobe von Tofu mit Kichererbsenextrakt nach IAC-Aufreinigung ist in der Abbildung 9 im Vergleich zu den isolierten Cyanocorrinoiden aus Einzelstammkulturen dargestellt. Darin lassen sich deutlich die beiden Signale erkennen, die zu den gleichen Zeiten eluieren wie Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂.

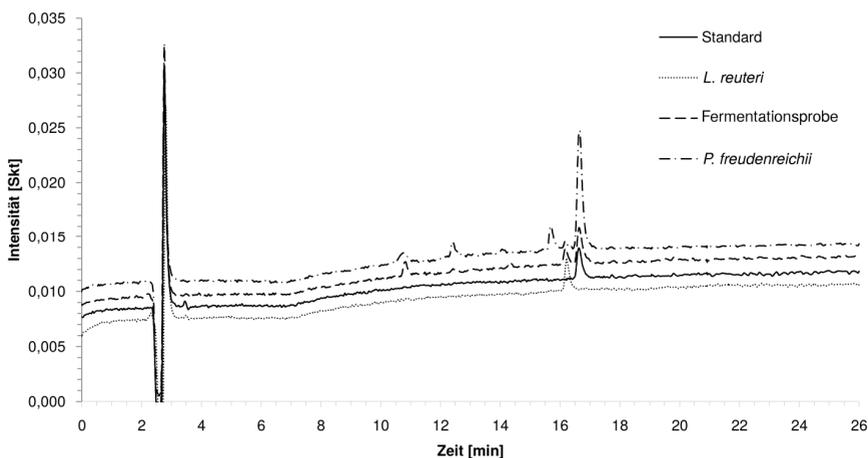
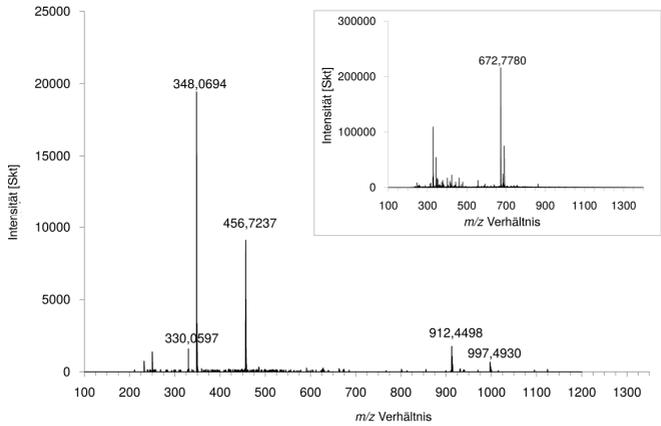


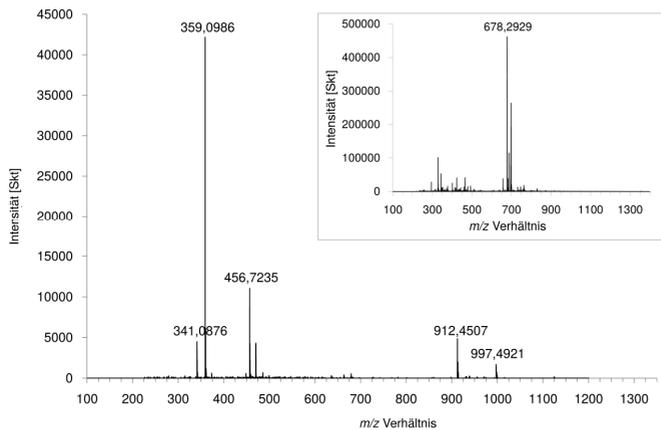
Abbildung 9: Chromatographischer Vergleich der derivatisierten Kulturextrakte nach Immunitäts-Aufreinigung. Diese HPLC-Chromatogramme wurden nach einer Immunitäts-Aufreinigung der Cyanocorrinoide aus einer Fermentationsprobe der Stämme *P. freudenreichii* (— · — ·), *L. reuteri* (·····) sowie von einer Co-Fermentationsprobe von Tofu mit Kichererbsenextrakt (- - - -) und von einer Cyanocobalamin-Standardlösung 300 ng/mL (—) aufgenommen. Die Retentionszeiten der Cyanocorrinoide von *P. freudenreichii* und das letzte Signal der Fermentationsprobe von Tofu mit Kichererbsenextrakt stimmen mit der Retentionszeit von Cyanocobalamin bei 16,66 min überein. Die Retentionszeit von 16,22 min des Cyanocorrinoids, derivatisiert und aufgereinigt aus einem *L. reuteri* Extrakt, findet sich ebenfalls in der Co-Fermentationsprobe von Tofu mit Kichererbsenextrakt.

In der Abbildung 10 sind die Massensignale der beiden wichtigsten Corrinioide, welche in den Fermentationen von Tofu gefunden wurden, am Beispiel einer Fermentationsprobe von Tofu mit Kichererbsenextrakt dargestellt. Bereits das Masse-Ladungsverhältniss der Quasi-Moleküle 672,7780 m/z $[M+2H]^{2+}$ und 678,2929 m/z $[M+2H]^{2+}$ deutete auf Pseudovitamin B₁₂ und Vitamin B₁₂ hin. Das Fragmentspektrum in Abbildung 10 a mit den Fragmenten 997,4930

[M+H-Ade-Zucker-PO₃]⁺ und 912,4498 [M+H-Ade-Zucker-PO₃-CN-Co]⁺, 456,7237 [?], 348,0694 [Ade+Zucker+PO₃]⁺ und 330,0597 [?] entspricht dem Fragmentspektrum des Cyanocorrinoids, welches aus *L. reuteri* isoliert wurde und kann damit eindeutig als Pseudovitamin B₁₂ identifiziert werden. Das Fragmentspektrum in Abbildung 10 b mit den Fragmenten 997,4921 [M+H-DMBI-Zucker-PO₃]⁺, 912,4507 [M+H-DMBI-Zucker-PO₃-CN-Co]⁺, 456,7235 [?], 359,0986 [DMBI+Zucker+PO₃]⁺ und 341,0876 [?] entspricht dem Fragmentenspektrum von Cyanocobalamin, wie es auch aus einer Kultur von *P. freudenreichii* isoliert wurde (Abbildung 8).



a



b

Abbildung 10: Fragmentspektren der extrahierten Cyanocorrinoide aus einer Fermentationsprobe von Tofu mit Kichererbsenextrakt nach Immunaffinitäts- Aufreinigung und HPLC-MS/MS.

Die Fragmentierung des doppelt geladenen quasi-Moleküls des Cyanocorrinoids (a) mit einem Masse-Ladungsverhältnis von 672,7780 m/z $[M+2H]^{2+}$ (Einfügung) und der Retentionszeit 16,22 min resultierte in den Fragmenten 997,4930 $[M+H\text{-Ade-Zucker-PO3}]^+$ und 912,4498 $[M+H\text{-Ade-Zucker-PO3-CN-Co}]^+$, 456,7237 [?], 348,0694 $[Ade+Zucker+PO3]^+$ und 330,0597 [?]. Diese Fragmente stimmen mit dem bekannten Fragmentmuster von Pseudovitamin B₁₂ überein. Die Fragmentierung des Cyanocobalamins (b) mit dem Masse-Ladungsverhältnis 678,2929 m/z $[M+2H]^{2+}$ (Einfügung) und der Retentionszeit von 16,66 min, resultierte in den signifikanten Fragmenten 997,4921 $[M+H\text{-DMBI-Zucker-PO3}]^+$, 912,4507 $[M+H\text{-DMBI-Zucker-PO3-CN-Co}]^+$, 456,7235 [?], 359,0986 $[DMBI+Zucker+PO3]^+$ und 341,0876 [?]. Diese Fragmente passten zu den bekannten Fragmentmustern von Cyanocobalamin. Insbesondere die Signale mit dem Masse-Ladungsverhältnis von 359,0986 m/z und 341,0876 m/z nach der Fragmentierung des doppelt geladenen quasi-Moleküls 678,2912 m/z waren signifikant.

3.5 Cobaltmessungen

Vor dem Einsatz der Rohstoffe zur Fermentation wurden diese auf ihren Cobalt- sowie Wassergehalt hin untersucht. Darauf aufbauend konnte der Cobaltgehalt in Bezug auf die Frischmasse berechnet werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Trockenmasse-Anteil und Cobaltgehalte der untersuchten Rohstoffe. Die Auflistung erfolgte nach absteigendem Cobaltgehalt. Die bestimmten Cobaltgehalte wurden bei Messungen ab $n = 3$ einem Ausreißertest nach Dixon unterzogen. Die entsprechenden Werte wurden auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,2$ als Ausreißer betrachtet und sind mit * gekennzeichnet. Werte, die auch auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,1$, $\alpha = 0,05$ und $\alpha = 0,01$ ausreißerverdächtig waren, wurden mit **, *** und **** gekennzeichnet.

Probenbezeichnung	TM-Anteil in %	Cobaltgehalt [mg/kgFM]			
		Verdau 1	Verdau 2	Verdau 3	Verdau 4
Buschmangokerne	97,30%	1,5244	1,6839		
Paranuss	99,78%	0,9888	0,7504	1,0074	
Anis	95,28%	0,7144	0,6981		
Kakaotesta	91,81%	0,6549	0,6194		
Kreuzkümmel	91,67%	0,5904	0,6497		
Okra	93,54%	3,1468****	0,5660	0,5922	
Kakaonibs (fermentiert)	99,60%	0,5266	0,5972		
Leinmehl	91,64%	0,5517	0,5245		
Rohkakao "Crusty layer"	77,53%	0,6939	0,3275		
Kakaonibs (unfermentiert)	100,00%	0,4586	0,5471		
Liebstockel (gemahlen)	95,49%	0,4814	0,4294		
Rillenkürbisblätter (Lieferant 1)	92,01%	0,4228	0,4322		
Rohkakao (Probtiefe: 1,5 – 2,5 m)	92,04%	0,3637	0,4440		
Bitterblätter (Lieferant 2)	91,33%	0,3462	0,4039		
Leinsamen	93,41%	0,3013	0,3011		
Dillspitzen	94,60%	0,2853	0,2748		
Paprika (gemahlen)	94,60%	0,2578	0,2755		
Blaumohnsamen	95,66%	0,2477	0,2645	0,2828	
Haselnusskerne	96,97%	0,2153	0,1315		
Quinoa (rot)	91,30%	0,1383	0,1532		
Alfalfa	96,27%	0,1456	0,1450		
Süßlupinenmehl	92,36%	0,1371	0,1380		
Petersilie	93,99%	0,1263	0,1308		
Kümmel	92,82%	0,1180	0,1241		
Kichererbse	92,24%	0,1245	0,1168		
Sojabohne (ungeschält)	93,60%	0,1160	0,1211		
Melonensamen	96,18%	0,1097	0,1240	0,0050*	
Rillenkürbis (Samenschale)	93,51%	0,1539	0,0765	0,1128	

Probenbezeichnung	TM-Anteil in %	Cobaltgehalt [mg/kgFM]			
		Verdau 1	Verdau 2	Verdau 3	Verdau 4
Rillenkürbisblätter (Lieferant 2)	93,05%	0,1069	0,1173		
Linse	91,36%	0,1157	0,1082		
Gartenbohne	86,18%	0,1130	0,1081		
Rillenkürbis (trocken)	93,97%	0,1044	0,1010		
Sojabohne (geschält)	95,94%	0,0974	0,0944		
Bitterblätter (Lieferant 1)	91,33%	0,1110	0,0587		
Haselnusschalen	89,17%	0,0756	0,0672		
Rispenhirse	91,28%	0,0634	0,0615	0,0692	
Adzukibohne	82,48%	0,0643	0,0623		
Koriander (gemahlen)	93,97%	0,0685	0,0504		
Pfeffer, schwarz (gemahlen)	92,66%	0,0633	0,0531		
Buchweizen	88,43%	0,0768*	0,0584	0,0543	
Kressesamen	93,99%	0,0490	0,0487		
Kürbiskerne	95,16%	0,0433	0,0432		
Staudensellerieblätter	12,64%	0,0405	0,0444		
Gartenerbse	90,82%	0,0398	0,0393		
Avocado	54,95%	0,0355	0,0348	0,0341	
Mungbohne	88,12%	0,0336	0,0340		
Süßkartoffel	26,00%	0,0068****	0,0324	0,0326	
Rillenkürbissamen	99,09%	0,0266	0,0201		
Knollensellerieblätter	13,33%	0,0248	0,0212		
Tofu	25,63%	0,0157	0,0151		
Zucchini	5,16%	0,0137	0,0142		
Reis	91,42%	0,0106	0,0105	0,0114	
Mangoldblätter	11,95%	0,0102	0,0103		
Reis (gemahlen)	90,02%	0,0105	0,0095	0,0098	0,0154***
Honigmelone	3,13%	0,0098	0,0089		
Okara	23,47%	0,0064	0,0067		
Datteln	78,21%	0,0064			
Blumenkohlblätter	12,21%	0,0116	0,0123		
Aubergine	6,21%	0,0021**	0,0038	0,0040	
Weißkohl	10,95%	0,0033	0,0040	0,0044	
Gemüsefenchel	6,67%	0,0040	0,0036		
Rotkohl	11,80%	0,0035	0,0039		
Rote Beete	11,33%	0,0006*	0,0030	0,0035	
Knollensellerie	9,17%	0,0028	0,0022	0,0035	
Staudensellerie	5,69%	0,0020	0,0026		
Blumenkohl	7,91%	0,0011	0,0029	0,0066*	0,0022
Erdbeeren	10,98%	0,0020	0,0019	0,0033**	

Probenbezeichnung	TM-Anteil in %	Cobaltgehalt [mg/kgFM]			
		Verdau 1	Verdau 2	Verdau 3	Verdau 4
Mangold (Stiel)	6,69%	0,0014	0,0015		
Bambussprossen	7,29%	0,0011	0,0014		
Zuckererbse	17,31%	0,0003			

Einige Messwerte wurden bei der Bestimmung des Cobaltgehalts durch einen Ausreißertest nach Dixon als Ausreißer erkannt und nicht in die weitere Auswertung mit einbezogen (Tabelle 7). Das Verhältnis der Spannweite zur Standardabweichung der Stichproben Reis und gemahlenem Reis deutete darauf hin, dass von einer Normalverteilung der Messwerte auszugehen ist ($PG_{\text{gemahlen}} = 1,936$; $PG_{\text{ungemahlen}} = 1,809$; $OQ = 2,000$; $UQ = 1,745$; $\alpha = 0,025$). Die Varianz der Stichproben erwies sich als homogen ($PG = 1,08$; $F_{\text{krit.}(2; 2; 0,975)} = 39,00$; $p = 0,9612$). Der studentische t-Test der Messungen von gemahlenem und unbehandeltem Reis zeigte keinen signifikanten Einfluss ($PG = 2,30$; $t_{\text{krit.}(4; 0,975)} = 2,78$; $p = 0,0828$) durch den Mahlvorgang. Die Proben des Rohstoffs Buschmangokerne wiesen mit $1,5244 - 1,6839$ mg/kgFM die höchsten Cobaltgehalte auf, gefolgt von den Proben der Rohstoffe Paranuss, Anis und Kakaotesta mit Cobaltgehalten von je $0,7504 - 1,0074 - 0,7504$ mg/kgFM, $0,6981 - 0,7144 - 0,6981$ mg/kgFM und $0,6194 - 0,6549 -$ mg/kgFM. Dagegen wiesen die Proben des Rohstoffs Zuckererbse mit $0,0003$ mg/kgFM die niedrigsten Cobaltgehalte auf. Die nächsthöheren Messwerte waren in den Proben der Rohstoffe Bambussprossen und Mangold (Stiel) mit je $0,0011 - 0,0014$ mg/kgFM und $0,0014 - 0,0015$ mg/kgFM zu verzeichnen.

Nachdem die Bezugsquelle für Tofu gewechselt worden war, sollte der Cobaltgehalt der beiden Tofusorten verglichen werden. Das Verhältnis von Spannweite der Messwerte zu deren Standardabweichung spricht jeweils dafür, die Normalverteilungsannahme nicht abzulehnen ($PG_{\text{Sorte 1}} = 2,307$; $OQ = 2,782$; $UQ = 2,090$; $PG_{\text{Sorte 2}} = 1,840$; $OQ = 2,000$; $UQ = 1,745$; $\alpha = 0,025$). Die Varianz der Stichproben erwies sich als homogen ($PG = 1,08$; $F_{\text{krit.}(2; 4; 0,975)} = 10,65$; $p = 0,8460$). Bei den Messungen ergab sich ein Unterschied in den Cobaltgehalten der Tofusorten um den Faktor $7 - 8$, der mit einem t-Test auf einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0,05$ ($PG = 72,80$; $t_{\text{krit.}(6; 0,975)} = 2,45$; $p = 4,5 \cdot 10^{-10}$) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 11). Die Proben unterschieden sich dabei kaum im Anteil ihrer Trockenmasse,

wobei Tofusorte 1 einen TM-Anteil von $25,63 \pm 1,79\%$ und Tofusorte 2 einen TM-Anteil von $24,26 \pm 0,57\%$ aufwies.

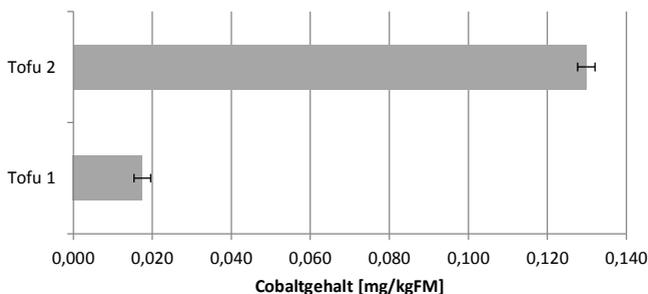


Abbildung 11: Vergleich des Cobaltgehalts mit Standardabweichung von zwei Tofuproben unterschiedlicher Hersteller. Der Cobaltgehalt von Tofusorte 1 ($n = 5$) ist um etwa den Faktor 7 – 8 kleiner als der Cobaltgehalt von Tofusorte 2 ($n = 3$). Auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ unterscheiden sich die untersuchten Proben im Zweistichproben- t -Test.

3.6 Fed-Batch-Fermentationen von Tofu mit pflanzlichen Rohstoffen

41 Pflanzenmaterialien, die im Vergleich mit Tofu der ersten Charge höhere Cobaltgehalte aufwiesen, wurden für eine Fed-Batch-Co-Fermentation mit Tofu herangezogen. Die Proben Liebstöckel, Kümmel, Koriander und schwarzer Pfeffer (gemahlen) wurden wegen zu intensiven Aromas im Produkt nicht verwendet. Ebenso wurde auf die beiden Rohkakaoproben verzichtet, da mit den Kakaonibs (fermentiert) bereits eine Rohkakaoprobe vorhanden war. Auf die Proben Rillenkürbis (Samenschale), Rillenkürbis (trocken) und Rillenkürbissamen wurde aufgrund des beschränkten Zugangs zu Probenmaterial ebenfalls verzichtet. Trotz niedrigerer Cobaltgehalte wurden die Pflanzenmaterialien Zucchini, Datteln, Zuckerbirse und Bambussprossen mit zur Fermentation herangezogen. Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, wurden die höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte von 129,2 ng/mL bei der Co-Fermentation von Tofu mit Gartenbohnen erzielt. Die nächsthöheren Vitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand lieferten die Rohstoffe Adzukibohne mit 115,9 ng/mL und ungeschälte Sojabohne mit 84,8 ng/mL. Die höchsten Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand mit 192,7 ng/mL wurden bei der Gartenbohne gefunden, gefolgt von Süßlupinenmehl mit

162,0 ng/mL und Leinmehl mit 110,6 ng/mL. Selbst unter Berücksichtigung der bereits vorhandenen Cobaltmenge im Tofu, konnte kein Zusammenhang (Korrelation) zwischen dem Cobaltgehalt im eingesetzten Pflanzenmaterial und dem Corrinoidgehalt hergestellt werden.

Tabelle 8: Vitamin-B₁₂-Gehalte und Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte gemessen in den Fermentationsüberständen von Fed-Batch-Co-Fermentationen der Rohstoffe mit Tofu. Die zwölf höchsten Gehalte der beiden Analyten wurden jeweils fett markiert.

Probenbezeichnung	Vitamin-B ₁₂ -Gehalt [ng/mL]	Pseudovitamin-B ₁₂ -Gehalt [ng/mL]
Adzukibohne	115,9	57,3
Alfalfa	9,2	22,1
Anis	16,3	35,6
Avocado	14,2	0,0
Bambussprossen	44,0	11,4
Bitterblätter (Lieferant 1)	20,3	0,0
Bitterblätter (Lieferant 2)	15,0	0,0
Blaumohnsamen	56,9	20,1
Buchweizen	56,9	20,5
Buschmangokerne	15,6	9,0
Dattel	14,8	25,2
Dillspitzen	25,3	0,0
Gartenbohne	129,2	192,7
Haselnusskerne	8,0	0,0
Haselnusschalen	34,9	17,8
Honigmelone	35,9	26,1
Kakaonibs (fermentiert)	10,2	0,0
Kakaonibs (unfermentiert)	39,8	47,9
Kakaotesta	77,3	12,4
Kichererbse	70,6	77,8
Kressesamen	21,5	9,1
Kreuzkümmel	8,6	5,5
Leinmehl	60,4	110,6
Leinsamen	74,5	31,6
Linse	8,2	15,2
Melonensamen	8,4	25,6
Okra	18,9	52,2
Paprika	8,4	0,0
Paranuss	75,4	61,6
Petersilie	31,5	0,0
Quinoa (rot)	35,6	83,4

Probenbezeichnung	Vitamin-B ₁₂ -Gehalt [ng/mL]	Pseudovitamin-B ₁₂ -Gehalt [ng/mL]
Rillenkürbisblätter (Lieferant 1)	37,0	25,6
Rillenkürbisblätter (Lieferant 2)	34,7	30,0
Rispenhirse	8,7	28,5
Sojabohne (geschält)	57,4	63,1
Sojabohne (ungeschält)	84,8	46,2
Staudensellerieblätter	43,4	16,1
Süßkartoffel	29,0	19,5
Süßlupinenmehl	10,0	162,0
Zucchini	32,1	11,9
Zuckererbse	11,0	0,0

3.7 Extraktionsversuche

Bevor Tofu mit Extrakten aus Pflanzenmaterial fermentiert werden konnte, musste evaluiert werden, ob eine annähernd gleiche Extraktion der unterschiedlichen Pflanzenmaterialien möglich sein würde. Der Rohstoff Leinsamen war nur schwer extrahierbar, da dessen Samen stark verschleimten. Die Auswirkungen sind auch anhand der Reproduzierbarkeit der Ausbeuten sichtbar (Abbildung 12), denn für Leinsamen wurde eine Standardabweichung der Ausbeute von 27 % festgestellt. Noch deutlicher zeigte sich die Verschleimung beim Rohstoff Leinmehl. Nach dem Erhitzen der wässrigen Suspension konnte kein Extrakt gewonnen werden. Daher und aufgrund der Ähnlichkeit zum Rohstoff Leinsamen wurde der Rohstoff Leinmehl aus den weiteren Versuchen ausgeschlossen. Bei der Extraktion von Buchweizen wurden stets weitere 320 mL Wasser nach dem Kochvorgang für eine kalte Extraktion zugegeben, sonst hätte ebenfalls kein Extrakt gewonnen werden können. Bei der Extraktion von Kakaotesta mussten einmal 80 mL und einmal 120 mL Wasser für eine kalte Extraktion zugegeben werden, um ausreichend Extraktvolumen zu erhalten.

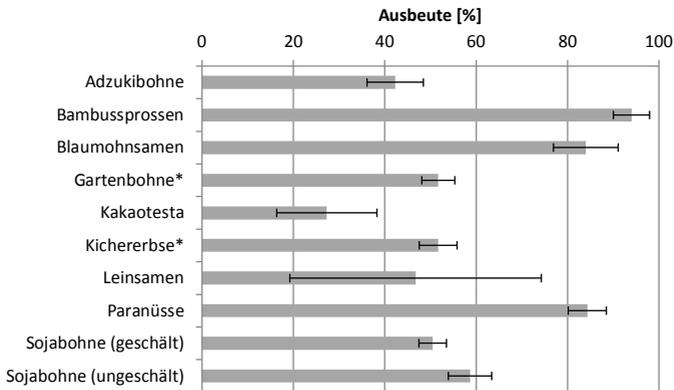


Abbildung 12: Mittlere Ausbeute heißer, wässriger Extraktionen von Pflanzenmaterial nach dem Siebvorgang mit Standardabweichung. Die Extraktion wurden jeweils dreifach bzw. fünffach wiederholt (*n = 5).

3.8 Fed-Batch-Fermentationen von Tofu mit pflanzlichen Extrakten

Die ersten beiden Wiederholungen wurden noch mit Tofusorte 1 durchgeführt und die Wiederholungen 3 – 5 jeweils mit Tofusorte 2. Bei Betrachtung der Tabelle 9 wird klar, dass die Vitamin-B₁₂-Gehalte in den letzten drei Wiederholungen deutlich höher waren. Dies gilt auch für die Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte (Tabelle 10). Ein Hinweis darauf, dass sich die Tofusorten unterschieden, ergibt sich bereits bei Betrachtung der Kontrollen, wobei die undotierte Kontrolle der dritten Wiederholung einen höheren Vitamin-B₁₂-Gehalt aufweist als die dotierten Kontrollen der ersten beiden Wiederholungen. Nach den ersten drei Wiederholungen war nicht eindeutig zu bestimmen, welche Substrate sich am besten zur Anreicherung mit Vitamin B₁₂ eignen. Sowohl bei alleiniger Betrachtung der ersten beiden Wiederholungen als auch unter Einbezug der dritten Wiederholung, wiesen die Fermentationen mit dem Extrakt aus Kichererbsen im Mittel die höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte auf. Auf Basis der Daten aus den ersten drei Wiederholungen wurde beschlossen mit Kichererbsen weiterzuarbeiten. Der höchste Einzelwert der untersuchten Fermentationen wurde mit 214 ng/mL bei der Fermentation mit einem Extrakt aus geschälten Sojabohnen gemessen. In den beiden ersten Wiederholungen konnten mit 57 ng/mL und 43 ng/mL nur geringe Vitamin-B₁₂-Gehalte detektiert werden. Daher wurde der Rohstoff geschälte Sojabohnen nicht weiterverwendet. Der

Einsatz von Kakaotesta als Extraktionsmaterial führte zu den höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalten der zweiten Wiederholung. Nach einer sensorischen Probe der Kakaotesta-Extrakte zeigte sich, dass diese stark bitter schmeckten. Dieser Umstand und die Tatsache, dass die Ausbeuten bei der Extraktion stark schwankten (Abbildung 12), führte dazu, dass auf eine weitere Verwendung von Kakaotesta verzichtet wurde. Die Gartenbohne wurde zum direkten Vergleich mit der Kichererbse ausgewählt, da diese in der ersten Versuchsreihe (Rohstoff mit Tofu) den höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalt geliefert hatte und in den ersten beiden Wiederholungen im Mittel die höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte nach Kakaotesta gemessen wurden. Die Fermentationsüberstände aus den Rohstoffen Kichererbse und Gartenbohne wiesen die höchsten Gehalte an Pseudovitamin B₁₂ auf. Die Messwerte lagen dabei im Bereich von 18 – 84 ng/mL. Ein signifikanter Unterschied im Pseudovitamin-B₁₂-Gehalt unter den beiden Rohstoffen wurde nicht festgestellt.

Tabelle 9: Vitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand nach der Co-Fermentation von Tofu mit Extrakten unterschiedlicher Pflanzenmaterialien. Die höchsten gemessenen Vitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand sind jeweils grün hinterlegt und die niedrigsten jeweils gelb.

Probenname	WDH 1	WDH 2	WDH 3	WDH 4	WDH 5
Adzukibohne	70	30	138		
Bambussprossen	0	54	95		
Blaumohnsamen	32	36	111		
Buchweizen	22	37	118		
Kakaotesta	89	108	61		
Kichererbse	148	103	172	87	142
Gartenbohne	108	59	128	67	112
Dotierte-Kontrolle	59	56	162	102	127
Undotierte-Kontrolle	20	23	92	99	132
Leinsamen	76	54	82		
Paranuss	103	15	153		
Sojabohne (geschält)	57	43	214		
Sojabohne (ungeschält)	75	80	153		

Tabelle 10: Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand nach der Co-Fermentation von Tofu mit Extrakten unterschiedlicher Pflanzenmaterialien. Die höchsten gemessenen Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand sind jeweils grün hinterlegt und die niedrigsten jeweils gelb.

Probename	WDH 1	WDH 2	WDH 3	WDH 4	WDH 5
Adzukibohne	45	21	36		
Bambussprossen	0	0	20		
Blaumohnsamen	0	5	40		
Buchweizen	0	0	18		
Kakaotesta	19,1	0	11		
Kichererbse	18	44	38	43	84
Gartenbohne	32	48	49	23	37
Dotierte-Kontrolle	0	7	12	12	8
Undotierte-Kontrolle	0	0	8	12	11
Leinsamen	15	19	12		
Paranuss	29	4	18		
Sojabohne (geschält)	0	12	32		
Sojabohne (ungeschält)	16	39	41		

In einem *t*-Test mit gepaarten Stichproben der normalverteilten Differenzen ($PG_{\text{Differenz}} = 1,995$; $OQ = 2,000$; $UQ = 1,745$; $\alpha = 0,025$) zeigte sich auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ ($PG = 4,41$; $t_{\text{krit.}(2; 0,975)} = 4,30$; $p = 0,0478$), dass die Fermentationen von Tofu mit Extrakten aus Kichererbsen höhere Vitamin-B₁₂-Gehalte in der Fermentationsbrühe aufwiesen als die Fermentation von Tofu mit Extrakten aus Gartenbohnen (Abbildung 13). Die mittlere Differenz der Stichprobenpaare belief sich auf 31 ± 12 ng/mL. Für den Test wurden nur die Wiederholungen 3 – 5 herangezogen, da diese mit der gleichen Tofusorte durchgeführt wurden. Wie der Abbildung 11 zu entnehmen ist, unterschieden sich diese Tofusorten im Cobaltgehalt um den Faktor 7 – 8 (siehe Kapitel 3.5). Die Berechnung des Cobalteintrags aus der Abbildung 14 zeigt, dass die beiden extrahierten Rohstoffe ähnliche Cobaltmengen in die Fermentationsbrühe einbringen. Daher ist davon auszugehen, dass selbst bei gleicher Cobaltmenge im Fermentationssubstrat der Rohstoff Kichererbse dem Rohstoff Gartenbohne bei der Anreicherung von Vitamin B₁₂ überlegen ist.

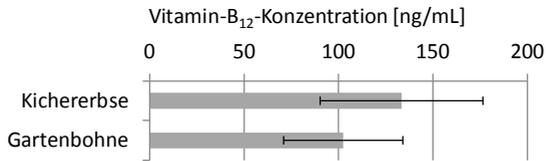


Abbildung 13: Vitamin-B₁₂-Gehalte des Fermentationsüberstands von co-fermentiertem Tofu mit Extrakten aus Kichererbse und Gartenbohne. Zum Vergleich wurden nur die Ergebnisse der Wiederholungen 3 – 5 (n = 3) mit Tofusorte 2 herangezogen. Im studentischen *t*-Test mit gepaarten Stichproben unterscheiden sich die Vitamin-B₁₂-Gehalte auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

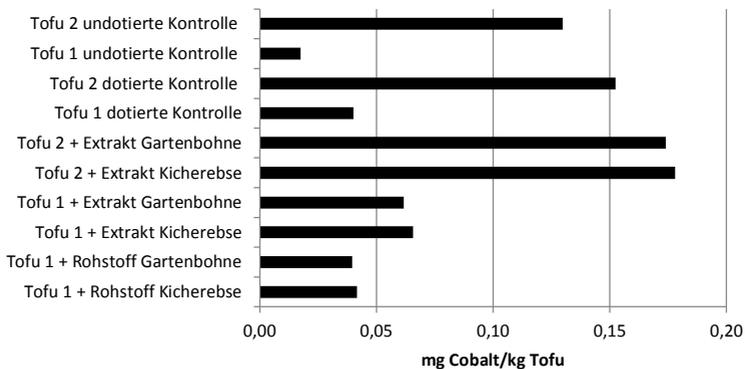


Abbildung 14: Maximaler Cobalteintrag in die Fermentationen berechnet als mg pro kg Tofu im Fermentationsansatz. Bei der Berechnung des Cobalteintrags durch ein Extrakt wurde davon ausgegangen, dass bei der Extraktion 100 % des Cobalts aus dem Rohstoff in die Flüssigkeit übertragen werden.

Die Abbildung 14 zeigt ebenfalls, dass der Cobalteintrag durch Tofusorte 2 in den Wiederholungen 3 – 5 (Tabelle 9) maßgeblich den Cobaltgehalt in den Positiv- und Negativkontrollen bestimmte. Es wurden auch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Vitamin-B₁₂-Gehaltes in der Fermentationsbrühe zwischen Positiv- und Negativkontrollen festgestellt. Der Unterschied im Cobalteintrag zwischen den Rohstoffen Gartenbohne und Kichererbse bzw. durch deren Extrakte ist, wie in Abbildung 14 sichtbar, nur sehr gering. Dies gilt vor allem für Tofusorte 2 und bei 100 %iger Extraktion. Die Dotierung der Kontrollen erhöhte bei Tofusorte 1 den Cobaltgehalt 2,3-fach und bei Tofusorte 2 nur noch 1,2-fach. Der Einfluss des Cobaltgehaltes im Tofu ist so groß, dass die undotierte Kontrolle von Tofusorte 2

3,2-mal mehr Cobalt enthält als die dotierte Kontrolle von Tofusorte 1. Dies erklärt die höheren Vitamin-B₁₂-Gehalte der undotierten Kontrollen von Tofusorte 2 im Vergleich zu den dotierten Kontrollen von Tofusorte 1. Ein Vitamin-B₁₂-Eintrag durch die Rohstoffe Tofu, Kichererbse und Gartenbohne kann ausgeschlossen werden, da sie vor dem Einsatz zur Fermentation auf ihren Vitamin-B₁₂-Gehalt hin analysiert wurden und kein Vitamin B₁₂ nachgewiesen werden konnte.

3.9 Optimierung der Extraktion von Kichererbsen

Die Lebendzellzahlen der beiden Fermentationsreihen sind in der Abbildung 15 aufgeführt. Die Daten waren zwar nicht geeignet, um ein Regressionsmodell zu erstellen, doch es wurde deutlich, dass *P. freudenreichii* in den Überständen stärker angereichert wurde als *L. reuteri*. Die Lebendzellzahlen von *P. freudenreichii* streuen dabei von $2,8 \times 10^9$ – $8,0 \times 10^9$ KBE/mL und liegen damit alle in derselben Größenordnung. Die Lebendzellzahlen von *L. reuteri* streuen von $4,8 \times 10^7$ – $1,2 \times 10^8$ KBE/mL mit zwei Ausnahmen der Parameterkombination (Kapitel 2.10.5) N2 und N5 aus Fermentationsreihe 1 (Abbildung 15). Die Fermentation N5 zeigte am Ende den niedrigsten Pseudovitamin-B₁₂-Gehalt und der pH-Wert sank verzögert auf den Endwert von 4,9. (Abbildung 16). Da sich die Vitamin-B₁₂-Gehalte der Parameterkombination N5 aus Fermentationsreihe 1 und 2 nicht deutlich unterschieden, wurde Fermentation N5 dennoch mit in die Modellbildung einbezogen (Tabelle 12). Der pH-Wert der Fermentationen lag zu Beginn bei 5,9 – 6,0 und fiel über den Verlauf der ersten 48 h auf einen Endwert zwischen 4,9 – 5,0 ab (Abbildung 16).

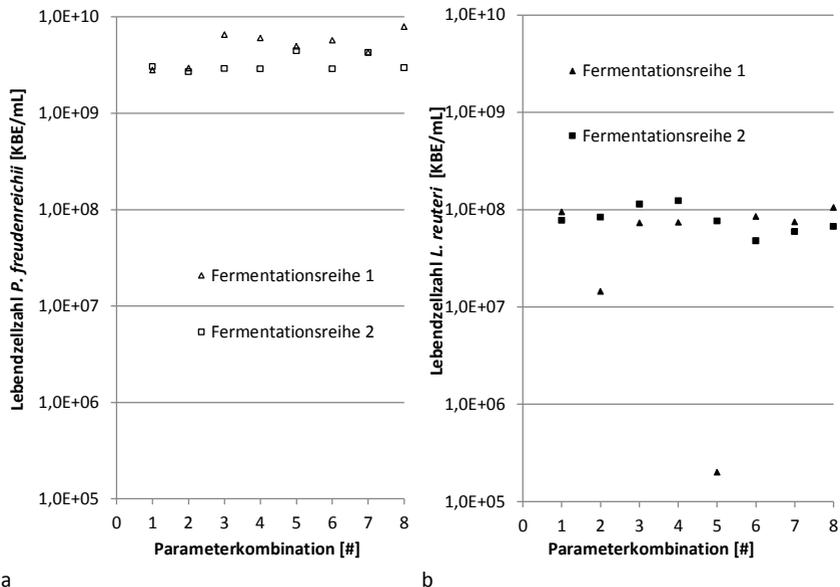


Abbildung 15: Gewogen arithmetisch gemittelte Lebendzellzahlen von zwei Fermentationsreihen am Ende des Fermentations-Prozesses. Vermessen wurde der Fermentationsüberstand von Tofu mit Kichererbsenextrakten, wobei die Kichererbsenextrakte mit unterschiedlichen Parameterkombinationen (N1 – N8) hergestellt wurden. a) *P. freudenreichii* b) *L. reuteri*.

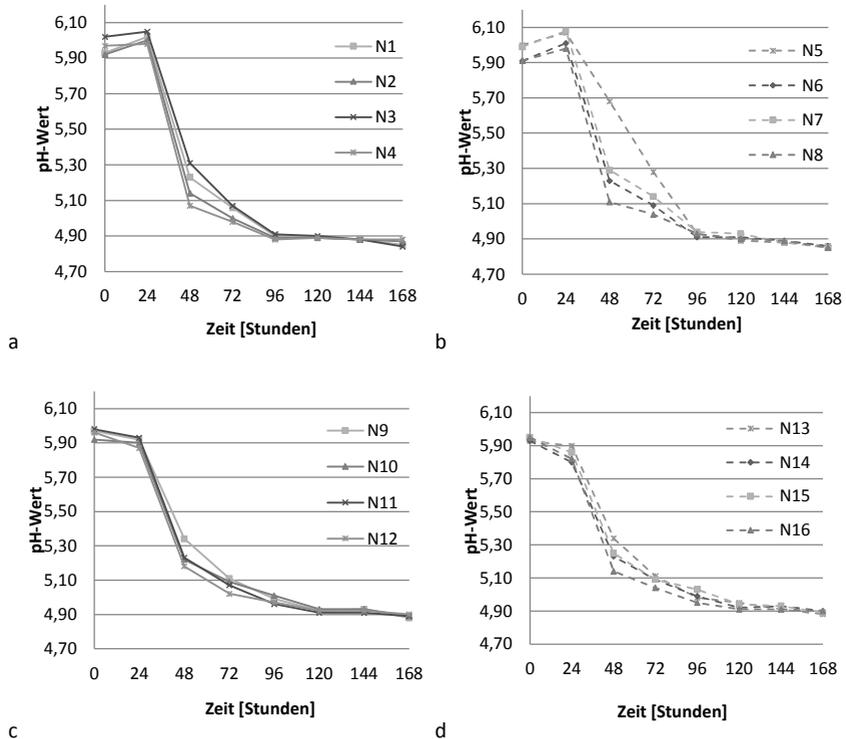


Abbildung 16: Verlauf der pH-Werte über die Dauer der Fermentationen von Tofu mit Kichererbsenextrakt der Fermentationsreihen 1 a) N1 – N4, b) N5 – N8 und 2 c) N9 – N12 d) N13 – N16. Die Kichererbsenextrakte wurden mit den Parameterkombinationen N1 – N8 hergestellt und wiederholt (N9 – N16).

Aus den gemessenen Volumina wurden nach der Extraktion von Kichererbsen die Extraktausbeuten berechnet. Diese sind in der Abbildung 17 dargestellt und weisen innerhalb einer Parameterkombination nur geringe Streuung bei gleichzeitig deutlichen Unterschieden zwischen den Parameterkombinationen auf. Anschließend wurde in einer multiplen Regressionsanalyse ein lineares Regressionsmodell mit der Gleichung $\text{Ausbeute [\%]} = 164,497 - 1,13194 \cdot [\text{Temp}] + 0,118125 \cdot [\text{Que}] - 21,1968 \cdot [\text{Bre}] + 0,420635 \cdot [\text{Temp}] \cdot [\text{Bre}] - 0,375 \cdot [\text{Que}] \cdot [\text{Bre}]$ berechnet. Die Koeffizienten der gewählten Faktoren waren signifikant (Abbildung 18 a). Der Interaktionskoeffizient der Variablen Quelldauer und Temperatur erfüllte das Kriterium für die Signifikanz nicht, weshalb dieser Interaktionsterm aus dem Modell entfernt wurde. Die Fehlanpassung von 1,106 ($p = 0,347$) spricht dafür, dass die ge-

messenen Daten mit der Linearität des Modells (vergleiche 6.2) konsistent sind. Die geringe Streuung um die Gerade in Abbildung 18 b zeigt eine große Übereinstimmung von vorhergesagten Extraktausbeuten durch das Regressionsmodell mit den tatsächlich gemessenen Werten. Das berechnete Modell besitzt ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,968$, womit 96,8 % der Variation der Extraktausbeute durch das Modell aufgeklärt werden können. Für das Regressionsmodell wurde ein kreuzvalidiertes Bestimmtheitsmaß von $Q^2 = 0,944$ berechnet. Dies spricht für eine sehr hohe Vorhersagekraft des Modells mit nur geringem Vorhersagefehler, was auch durch die Prognose der Extraktausbeute von $52,09 \pm 2,24 \%$ bei der Parameterkombination 121 °C, 20 h, 1 (ungebrochene Kichererbsen) (Abbildung 19) belegt wird. Diese Vorhersage deckt sich mit den Ergebnissen zur Extraktgewinnung in Kapitel 3.7, bei welchen eine Extraktausbeute von $51,7 \pm 3,6 \%$ ($n = 5$) gemessen wurde. Nach einer Randomisierung der Zielvariablen konnte kein Modell angepasst werden ($Q^2 < 0$). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Chance für ein zufällig passendes Modell mit willkürlichen Daten gering ist (Wold et al. 2001).

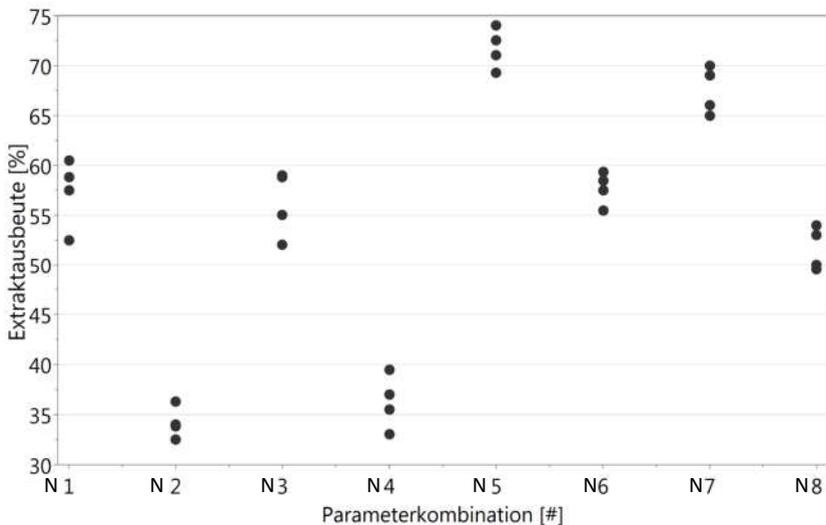


Abbildung 17: Extraktausbeuten bei der wässrigen heißen Extraktion von Kichererbsen mit den Parameterkombinationen N1 – N8 ($n = 4$).

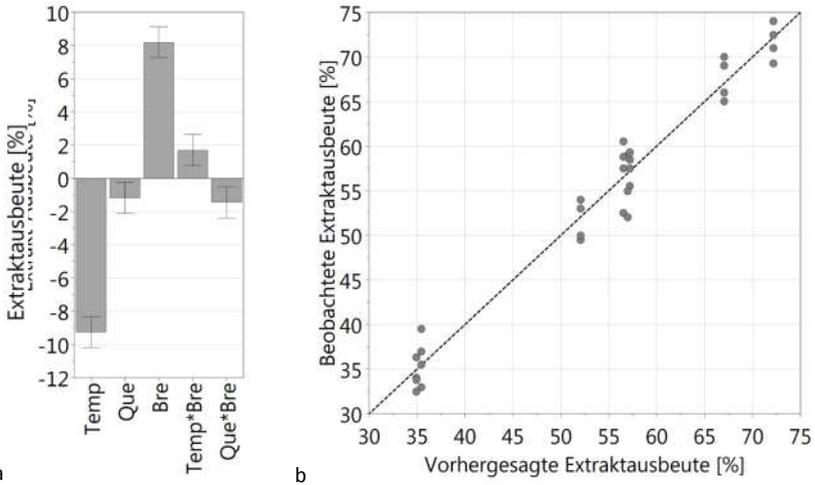


Abbildung 18: a) Darstellung der skalierten und zentrierten Koeffizienten mit 95 % Konfidenzintervallen des multivariaten Regressionsmodells für den Zielparameter Extraktausbeute. Die Abkürzungen stehen dabei jeweils für Temp = Temperatur, Que = Quelldauer und Bre = Brechung. b) Vergleich der beobachteten Extraktausbeuten (Punkte) mit den durch das Regressionsmodell vorhergesagten Extraktausbeuten (Gerade).

Tabelle 11: Regressionstabelle mit Kenndaten der multiplen linearen Regression für die Zielvariable Extrakt-Ausbeute

Faktoren	Koeffizienten skaliert und zentriert	Standardfehler	P	Konfidenzintervall (±)
Konstante	54,0563	0,4452	2,41E-37	0,9150
Temperatur	-9,2710	0,4523	1,42E-17	0,9297
Quelldauer	-1,1811	0,4523	1,48E-02	0,9297
Brechung	8,2042	0,4523	2,79E-16	0,9297
Temp*Bre	1,7097	0,4595	9,64E-04	0,9445
Que*Bre	-1,4516	0,4595	3,99E-03	0,9445

N = 32 | df = 26 | Comp. = 1

Q² = 0,944 | R² = 0,968 | R² adj. = 0,962 | Standardabweichung der Modelantwort = 12,839 | Modellvalidität = 0,735

Cond. no. = 1,032 | RSD = 2,518 | Konfidenz = 0,95 | Reproduzierbarkeit = 0,962

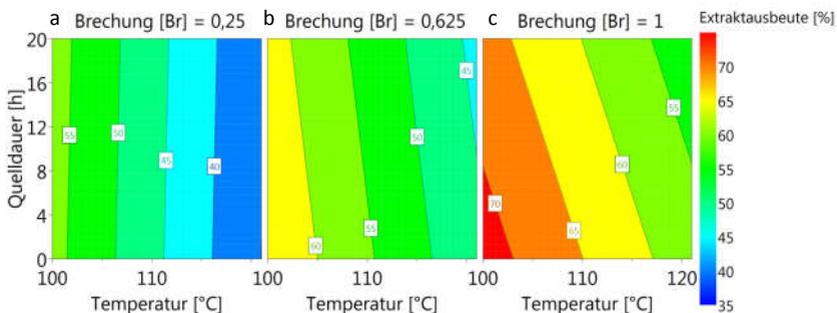


Abbildung 19: 4D-Höhenliniendiagramm zur Prognose der Extraktausbeuten bei der heißen, wässrigen Extraktion von Kichererbsen und deren Abhängigkeit von den untersuchten Prozessparametern Quelldauer, Temperatur und Brechung. Dargestellt ist hier die Extraktausbeute [%] als eine Funktion von Temperatur und Quelldauer unter den drei Bedingungen a) zu Vierteln gebrochenen, b) halbierten und c) unversehrten Kichererbsen. Die vorhergesagte Extraktausbeute wird mithilfe eines Farbgradienten von blau (niedrige Extraktausbeute) nach rot (hohe Extraktausbeute) veranschaulicht.

Wie in der Tabelle 12 ersichtlich, wurden die ersten beiden Fermentationsreihen dreifach auf ihren Vitamin-B₁₂-Gehalt und Pseudovitamin-B₁₂-Gehalt hin vermessen (n = 3). Die Messwerte wurden gemittelt und zur Berechnung eines Regressionsmodells herangezogen. Die Mittelwerte sind in Abbildung 20 dargestellt und weisen sowohl teilweise innerhalb der Parameterkombination als auch zwischen den Parameterkombinationen eine gewisse Streuung auf. Anschließend wurde in einer multiplen Regressionsanalyse ein lineares Regressionsmodell mit der Gleichung: Vitamin-B₁₂-Gehalt [ng/mL] = 348,234 - 1,93651*[Temp] + 7,99286*[Que] - 364,318*[Bre] - 0,0714286*[Temp]*[Que] + 3,26984*[Temp]*[Bre] berechnet. Die Koeffizienten der gewählten Faktoren waren jeweils signifikant (Abbildung 21a). Der Interaktionskoeffizient der Variablen Quelldauer und Brechung erfüllte das Kriterium der Signifikanz nicht, weshalb dieser Interaktionsterm aus dem Modell entfernt wurde. Um die hierarchische Struktur des Modells aufrechtzuerhalten, wurden die Koeffizienten der unabhängigen Variablen Quelldauer und Brechung im Modell behalten. Die Streuung um die Gerade in Abbildung 21 b zeigt eine Übereinstimmung von vorhergesagten Vitamin-B₁₂-Gehalten durch das Regressionsmodell mit den tatsächlich gemessenen Werten. Das Modell besitzt ein Bestimmtheitsmaß von R² = 0,782, womit 78,2 % der Variation der Vitamin-B₁₂-Gehalte durch das Modell aufgeklärt werden. Die Fehlanpassung von 0,938 (p = 0,431) spricht dafür, dass die gemessenen Daten mit der Linearität des Modells (vergleiche 6.2)

konsistent sind. Für das Regressionsmodell wurde ein kreuzvalidiertes Bestimmtheitsmaß von $Q^2 = 0,540$ berechnet. Dies spricht für eine gute Vorhersagekraft des Modells, was auch durch die Prognose der Vitamin-B₁₂-Gehalte von 132 ± 15 ng/mL bei der Parameterkombination 121 °C, 20 h, 1 (ungebrochene Kichererbsen) belegt wird (Abbildung 22). Diese Vorhersage deckt sich mit den Ergebnissen zu den Fed-Batch-Fermentationen von Tofu mit pflanzlichen Extrakten aus Kichererbsen in Kapitel 3.8, bei welchen ein Vitamin-B₁₂-Gehalt von 133 ± 43 ng/mL ($n = 3$) gemessen wurde. Nach einer Randomisierung der Zielvariablen konnte kein Modell angepasst werden ($Q^2 < 0$). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Chance für ein zufällig geeignetes Modell mit willkürlichen Daten gering ist (Wold et al. 2001).

Tabelle 12: Messwerte der Vitamin-B₁₂-Gehalte und Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte der Fermentationen von Tofu mit Kichererbsenextrakt nach Extraktion der Kichererbsen mit den Parameterkombinationen N1 – N8. Aufgelistet sind die Analyseergebnisse des Fermentationsüberstandes von je drei Aufarbeitungen mittels IAC und anschließender HPLC-DAD-Messung.

Probe	Vitamin B ₁₂ [ng/mL]			Pseudovitamin B ₁₂ [ng/mL]		
	Aufarbeitung			Aufarbeitung		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3
N1	161	146	125	57	52	49
N2	89	106	123	44	61	74
N3	159	219	133	56	130	51
N4	104	142	100	67	125	75
N5	96	127	98	0	14	0
N6	122	179	123	40	89	52
N7	126	153	117	21	32	27
N8	133	137	107	43	71	48
N9	139	171	153	130	100	79
N10	123	137	130	85	104	93
N11	142	155	142	75	79	74
N12	89	118	123	68	100	101
N13	92	133	136	52	85	80
N14	131	174	164	63	114	92
N15	125	164	143	64	78	58
N16	102	155	135	64	128	95

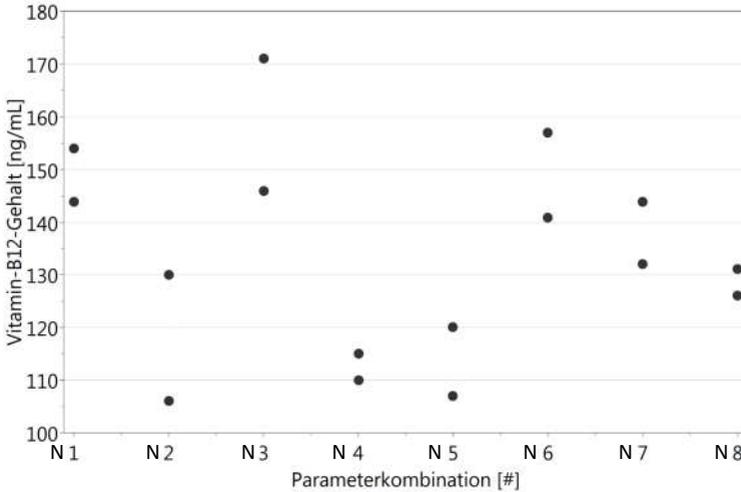


Abbildung 20: Vitamin-B₁₂-Gehalte der Fermentationen von Tofu mit Kichererbsenextrakt nach Extraktion der Kichererbsen mit den Parameterkombinationen N1 – N8 (n = 2). Abgebildet sind die gemittelten Vitamin-B₁₂-Gehalte (n = 3) des Fermentationsüberstands nach Aufreinigung mittels IAC und anschließender HPLC-DAD-Messung.

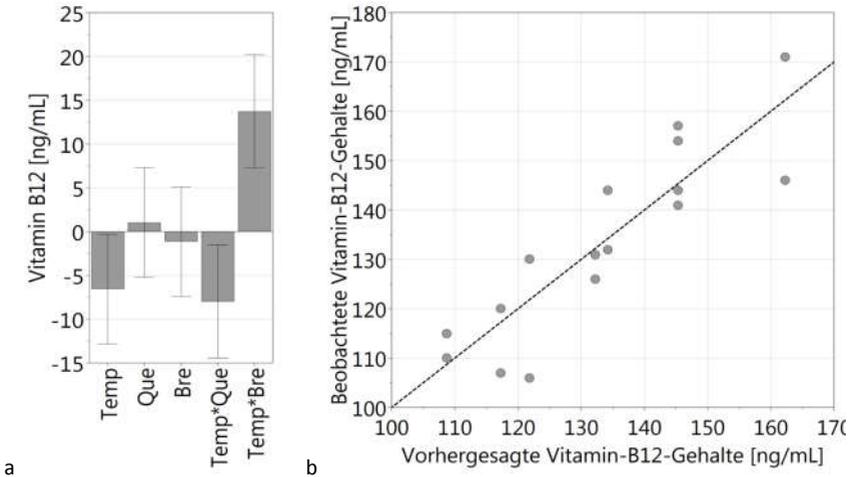


Abbildung 21 a) Darstellung der skalierten und zentrierten Koeffizienten mit 95 % Konfidenzintervallen des multiplen Regressionsmodells für den Zielparameter Vitamin-B₁₂-Gehalt. Die Abkürzungen stehen dabei jeweils für Temp= Temperatur, Que= Quelldauer und Bre= Brechung. **b)** Vergleich der beobachteten Vitamin-B₁₂-Gehalte (Punkte) mit den durch das Regressionsmodell vorhergesagten Vitamin-B₁₂-Gehalten (Gerade).

Tabelle 13: Regressionstabelle mit Kenndaten der multiplen linearen Regression für die Zielvariable Vitamin-B₁₂-Gehalt

Faktoren	Koeffizienten skaliert und zentriert	Standardfehler	P	Konfidenzintervall (±)
Konstante	133,3750	2,7214	3,02E-13	6,0637
Temperatur	-6,5841	2,8107	4,11E-02	6,2626
Quelldauer	1,0328	2,8107	7,21E-01	6,2626
Brechung	-1,1619	2,8107	6,88E-01	6,2626
Temp*Que	-8,0000	2,9029	2,02E-02	6,4679
Temp*Bre	13,7333	2,9029	8,03E-04	6,4679

N = 16 | df = 10 | Comp. = 1

Q² = 0,540 | R² = 0,782 | R² adj. = 0,672 | Standardabweichung der Modelantwort = 19,0153 | Modellvalidität = 0,789

Cond. no. = 1,067 | RSD = 10,89 | Konfidenz = 0,95 | Reproduzierbarkeit = 0,668

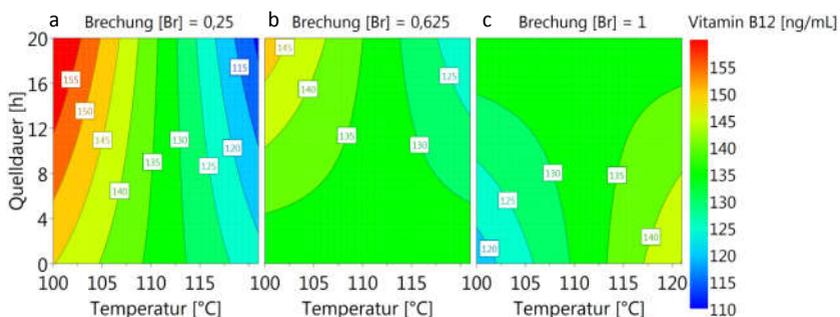
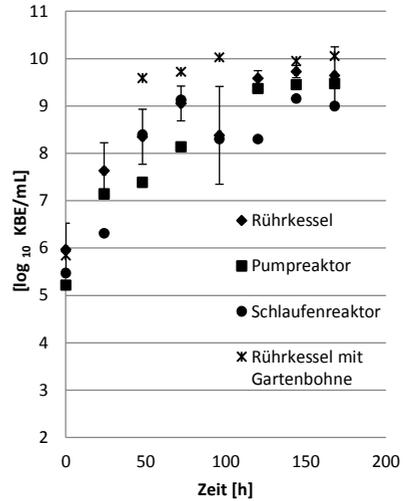
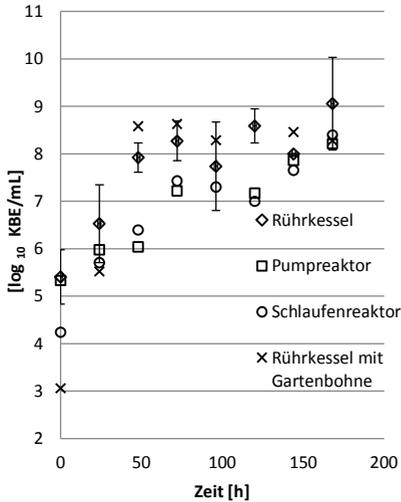


Abbildung 22: 4D-Höhenliniendiagramm zur Prognose der Vitamin-B₁₂-Gehalte in den Fermentationen von Tofu mit Kichererbsenextrakt und deren Abhängigkeit von den untersuchten Prozessparametern Quelldauer, Temperatur und Brechung. Dargestellt ist hier der Vitamin-B₁₂-Gehalt [ng/mL] als eine Funktion von Temperatur und Quelldauer unter den drei Bedingungen a) zu Vierteln gebrochenen, b) halbierten und c) unversehrten Kichererbsen. Der vorhergesagte Vitamin-B₁₂-Gehalt wird mithilfe eines Farbgradienten von blau (niedriger Vitamin-B₁₂-Gehalt) nach rot (hoher Vitamin-B₁₂-Gehalt) veranschaulicht.

Zur Prognose des Pseudovitamin-B₁₂-Gehalts und des Gesamt-Corrinoid-Gehalts konnte jeweils kein Regressionsmodell an die Daten angepasst werden.

3.10 Scale-up-Versuche

Die Maßstabsvergrößerung ermöglichte umfassendere Analysen, da anschließend mehr Material zur Verfügung stand. Das Wachstum der beiden Stämme wurde über den Verlauf der Fermentationen festgehalten. Dabei war jeweils nur ein geringer Unterschied zwischen den Prozessvarianten feststellbar. Abgesehen von der Prozessvariante im Rührkessel mit Gartenbohnen stiegen die Lebendzellzahlen von *L. reuteri* kontinuierlich über die gesamte Prozesszeit (Abbildung 23 a) an. Bei der Prozessvariante Rührkessel mit Gartenbohnen wurde das Maximum von $8,6 \log_{10}$ KBE/mL bereits nach 72 h erreicht. Die Lebendzellzahl von *L. reuteri* erreichte bei der Prozessvariante im Rührkessel einen Wert von $9,1 \log_{10}$ KBE/mL, während die Lebendzellzahlen der anderen Prozessvarianten am Ende um den Faktor 10 niedriger waren. Die Lebendzellzahl von *P. freudenreichii* erreichte im Rührkessel einen Wert von $9,6 \log_{10}$ KBE/mL im Pumpreaktor und im Schlaufenreaktor waren die Zellzahlen am Ende mit $9,5 \log_{10}$ KBE/mL und $9,0 \log_{10}$ KBE/mL geringer. Im Schlaufenreaktor war das Maximum bereits nach 72 h erreicht, im Rührkessel mit Gartenbohnen nach 96 h ($10,1 \log_{10}$ KBE/mL) und bei der Prozessvariante im Pumpreaktor nach 14 h. Einzig bei der Prozessvariante im Rührkessel stiegen die Lebendzellzahlen von *P. freudenreichii* bis zum Ende der Fermentation an.



a

b

Abbildung 23: Mittelwerte gewogener arithmetischer Mittelwerte der Lebendzellzahlen während der Fermentation in vier verschiedenen Prozessvarianten. Vermessen wurde der Fermentationsüberstand von Tofu. a) □ *L. reuteri* im Pumpreaktor (n = 2) ◇ mit Fehlerbalken (Standardabweichung) *L. reuteri* im Rührkessel (mind. n = 2) ○ *L. reuteri* im Schlaufenreaktor (n = 1) × *L. reuteri* im Rührkessel mit Gartenbohne (n = 1) b) ■ *P. freudenreichii* im Pumpreaktor (n = 2) ◆ mit Fehlerbalken (Standardabweichung) *P. freudenreichii* im Rührkessel (mind. n = 3) ● *P. freudenreichii* im Schlaufenreaktor (n = 1); * *P. freudenreichii* im Rührkessel mit Gartenbohne (n = 1).

Die Fruktosekonzentration unterschied sich in den drei Systemen von Beginn an deutlich. Während im Rührsystem zu Beginn 0,38 g/Liter Fruktose im Überstand gemessen wurde und diese im Verlaufe der Fermentation auch kurzzeitig zunahm, war im Pumpsystem zu Beginn des Prozesses nur halb so viel Fruktose vorhanden und nahm über den Verlauf der Fermentation stetig ab. Die Fruktosekonzentration im Schlaufensystem stieg von 0,01 g/Liter am Anfang auf 0,08 g/L bis zur 96. Stunde, um dann wieder auf ihren Ursprungswert zurückzufallen. Die Glukosekonzentrationen des Rührsystems und des Pumpsystems sanken im Verlauf der Fermentationen von 4,5 g/L auf 2,1 g/L am Ende der Prozesse ab. Das Schlaufensystem startete mit 3,1 g/L Glukose und der Prozess endete mit 2,4 g/L Glukose im Fermentationsüberstand. Von Beginn an waren in allen drei Systemen geringe Mengen an Galaktose vorhanden. Die Galaktose-Konzentration war mit 0,13 g/L im Rührsystem am höchsten, gefolgt vom Schlaufensystem mit 0,03 g/L und vom Pumpsystem mit 0,01 g/L. Die vorhandene

Galaktose verschwand in den Pump- und Schlaufensystemen binnen der ersten 72 h gänzlich. In den Rührsystemen blieben bis zur 96. Stunde stets Galaktose-Konzentrationen von 0,04 g/L nachweisbar, anschließend verschwand auch hier die Galaktose vollständig.

Die Konzentration der Milchsäure fiel sowohl im Rührkessel als auch im Schlaufenreaktor auf einen Wert von 0,02 g/mL binnen der ersten 48 h. Im Pumpreaktor stellte sich dieser Status erst verzögert ein. Die Konzentrationen von Essigsäure und Propionsäure stiegen im Verlauf der Fermentationen im Schlaufensystem auf 0,1 g/L, im Pumpsystem auf 1 g/L und im Rührsystem auf 1,4 g/L an. Die Konzentrationen der Propionsäure waren zuvor bereits auf 0,2 g/L im Schlaufensystem, auf 1,3 g/L im Pumpsystem und auf 1,6 g/L im Rührsystem gestiegen – im Verlauf der letzten 48 h jedoch wieder gesunken. Die Konzentrationen von Ethanol stiegen in allen drei Prozessvarianten binnen der ersten 24 h auf 0,2 g/L an (bzw. 0,1 g/L im Pumpsystem), sanken in den darauffolgenden 48 h wieder nahezu vollständig ab und stiegen anschließend wieder auf 0,3 g/L (bzw. nun, 1 g/L im Pumpsystem). Simultan verlief die Konzentration von Mannitol im Rührkessel bis zu einer Konzentration von 0,4 g/L. In den anderen beiden Systemen wurde Mannitol stetig gebildet, bis zu einer Konzentration von 0,3 g/L im Schlaufensystem und 0,1 g/L im Pumpensystem.

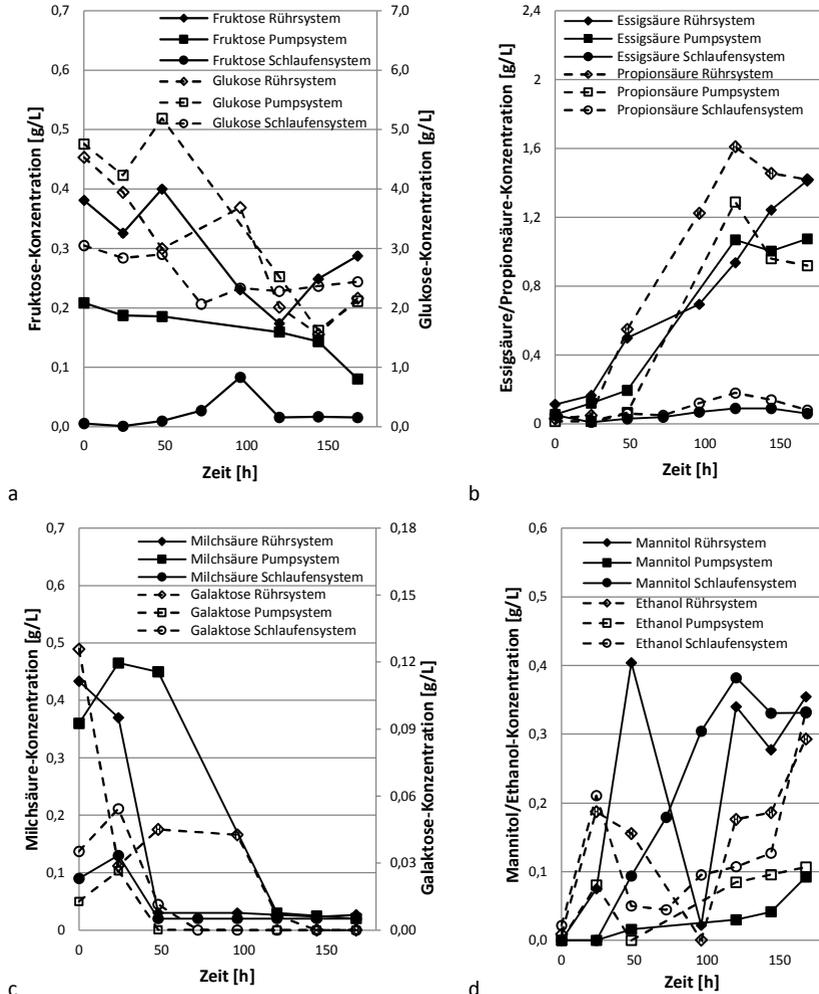


Abbildung 24: Änderung der Konzentration der Substrate und Produkte während der Fed-Batch-Fermentation von Tofu in Wasser in drei verschiedenen Prozessvarianten gemessen mittels HPLC-RH im Fermentationsüberstand. a) \blacklozenge Fruktose im Rührkessel \blacksquare Fruktose im Pumpreaktor \bullet Fruktose im Schlaufenreaktor \diamond Glukose im Rührkessel \square Glukose im Pumpreaktor \circ Glukose im Schlaufenreaktor b) \blacklozenge Propionsäure im Rührkessel \square Propionsäure im Pumpreaktor \circ Propionsäure im Schlaufenreaktor \blacklozenge Essigsäure im Rührkessel \blacksquare Essigsäure im Pumpreaktor \bullet Essigsäure im Schlaufenreaktor c) \blacklozenge Milchsäure im Rührkessel \blacksquare Milchsäure im Pumpreaktor \bullet Milchsäure im Schlaufenreaktor \diamond Galaktose im Rührkessel \square Galaktose im Pumpreaktor \circ Galaktose im Schlaufenreaktor d) \diamond Ethanol im Rührkessel \square Ethanol im Pumpreaktor \circ Ethanol im Schlaufenreaktor \blacklozenge Mannitol im Rührkessel \blacksquare Mannitol im Pumpreaktor \bullet Mannitol im Schlaufenreaktor.

Exemplarisch wurden die Fermentationsprodukte der Fermentation im Rührkessel mit Gartenbohnen auf ihren Gehalt an Folaten untersucht (Tabelle 14). Im verwendeten Tofu wurden bereits vor der Fermentation 194,0 ng/g Gesamtfolat gemessen. Nach der Fermentation hatte sich die Folatmenge etwa auf $403,6 \pm 117,9$ ng/g verdoppelt. Die Fermentationsbrühe wies nach sieben Tagen Fermentation einen Gesamtfolatgehalt von $631,1 \pm 110,3$ ng/g auf. Die höchsten Gehalte an Gesamtfolat waren mit $4073,9 \pm 555,1$ ng/g im Anschluss an die Fermentation in den Gartenbohnen vorhanden.

Tabelle 14: Messwerte der Gesamtfolatgehalte von unfermentiertem Tofu (n = 2) und Proben der Fermentation von Tofu im Rührkessel mit Gartenbohnen (jeweils n = 4)

Messung	Gesamtfolat [ng/g]				Mittelwert	Standardabweichung
	#1	#2	#3	#4		
Tofu unfermentiert	184,6	203,5	-	-	194,0	
Tofu fermentiert	515,4	271,4	489,9	338,0	403,6	117,9
Fermentationsbrühe	692,0	551,3	755,1	525,9	631,1	110,3
Bohnen fermentiert	4735,7	3510,8	4311,3	3737,7	4073,9	555,1

Die Vitamin-B₁₂-Gehalte am Ende der Fermentation wurden in allen Prozessvarianten untersucht (Abbildung 25). Im Fermentationsüberstand des Rührkessels wurden im Mittel Vitamin-B₁₂-Gehalte von 972 ± 346 ng/mL und Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte von 98 ± 35 ng/mL gemessen (n = 4). Der Tofu dieser Prozessvariante hatte einen Vitamin-B₁₂-Gehalt von 296 ± 111 ng/g und einen Pseudovitamin-B₁₂-Gehalt von 49 ± 20 ng/g. In den Prozessvarianten Pumpreaktor und Schlaufenreaktor wurden mit 192 ng/mL und 92 ng/mL niedrigere Vitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand gemessen. Ebenso war der Pseudovitamin-B₁₂-Gehalt des Fermentationsüberstands im Schlaufenreaktor mit 15 ng/mL deutlich geringer. Die Vitamin-B₁₂-Gehalte des Tofus in Pump- und Schlaufenreaktor entsprachen mit 278 ng/g und 254 ng/g etwa den Vitamin-B₁₂-Gehalten des Tofus im Rührkessel. Bei der Tofuanalyse zeigte sich auch, dass sich die Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte des fermentierten Tofus kaum unterschieden.

Beim Einsatz der Prozessvariante Rührkessel mit dem Pflanzenmaterial Gartenbohne als Cobaltquelle wurde ein Vitamin-B₁₂-Gehalt von 225 ng/mL im Fermentationsüberstand gemessen. Dieser war damit deutlich niedriger als die gleiche Prozessvariante beim Einsatz von Cobaltchlorid. Dagegen war der Pseudovitamin-B₁₂-Gehalt mit 225 ng/mL im Fermentations-

überstand deutlich höher als bei den Fermentationen mit Cobaltchlorid. Diese Verhältnisse spiegeln sich mit 115 ng/g Vitamin B₁₂ und 77 ng/g Pseudovitamin B₁₂ im Tofu nicht wider.

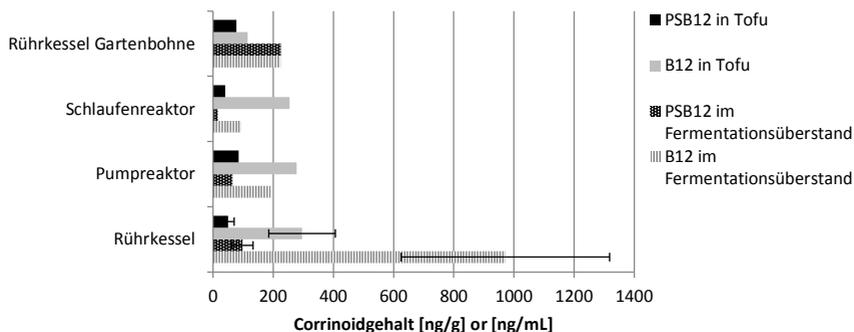


Abbildung 25: Vergleich der gemittelten Vitamin-B₁₂- und Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte, jeweils von Tofu und Fermentationsüberstand aus vier Prozessvarianten bestimmt, mittels SPE-Aufreinigung und anschließender HPLC-DAD-Messung. Die Darstellung zeigt die Ergebnisse des Prozesses im Rührkessel mit Standardabweichung (n = 4). Die übrigen Prozessvarianten Pumpreaktor (n = 2) und Schlaufenreaktor (n = 1) sowie Rührkessel mit Gartenbohne (n = 1) sind ohne Standardabweichung dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Bestätigung des Potentials zur Cobalamin-Synthese in

Acetobacter pasteurianus

Zur Biosynthese von Adenosylcobalamin sind zwei Stoffwechselwege bekannt, die sich anhand der frühen oder späten Chelatisierung des Cobaltions unterscheiden (Rodionov et al. 2003). Die Synthese von Uroporphyrinogen-III erfolgt dabei vor der Aufteilung des Biosynthesewegs. Damit ist sie ein wichtiger Schritt zur Produktion von Cobalamin, da sie den ersten Teil der Biosynthese durch die Gestaltung des makrozyklischen Tetrapyrrol-Vorläufers abschließt (Shoolingin-Jordan 1998). Die Bande in Abbildung 4 mit 910 bp mit identischer Sequenz zu *uroIII* in *Acetobacter pasteurianus* IFO 3191 weist daraufhin, dass ein Gen für die Uroporphyrinogen-III-Synthase in *Acetobacter pasteurianus* DSM3509 vorhanden ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass noch andere Biosynthesegene für Cobalamin vorhanden sind, wie sie schon von Matsutani et al. (2012) in thermotoleranten Stämmen

nachgewiesen wurden. Sie berichteten von Genen für die Proteine Precorrin-6Y C5, 15-Methyltransferase, Precorrin-6x-Reduktase, Uroporphyrinogen-III-Synthase, und Precorrin-3B-Biosynthese Protein CobG.

Die Ergebnisse der Suche nach orthologen Proteinsequenzen mit BlastKOALA deckten, abgesehen von CobF und CobJ, den gesamten aeroben Biosyntheseweg ab. Schon Rodionov et al. (2003) hoben die Rolle von CobF als variablem Teil des Biosynthesewegs hervor. Sie hielten auch fest, dass die Heterogenität zwischen den Spezies unter den Genen, die an der Ringkontraktion beteiligt sind, hoch ist. In diese Kategorie fällt auch das Gen *cobJ*. Die Tatsache, dass ein nahezu vollständiger Biosyntheseweg gefunden wurde und die offensichtliche Anwesenheit von Enzymen die Cobalamin verwenden, legten nahe, einen Versuch zu unternehmen, die physiologische Produktion von Corrinoiden nachzuweisen.

4.2 Corrinoid-Detektion und quantitativer mikrobiologischer Test

In Übereinstimmung mit den "Official Methods of Analysis of AOAC International" (Blake 2007) wurde *L. delbrueckii* ssp. *lactis* als Referenz-Mikroorganismus der Vitamin-B₁₂-Detektion eingesetzt. Der Nachteil, dass dieser Stamm auch andere Corrinotide, Deoxynukleotide und Deoxyriboside als Vitamin B₁₂ erkennt, ist hinreichend bekannt (Friedrich 1975, Schneider und Stroński 1987). Da *A. pasteurianus* auch letztere produzieren könnte, wurden diese von den Corrinoiden durch Erhöhung des pH-Werts und Erhitzen befreit. Dabei wurde eine von Denter und Bisping (1994) und Keuth und Bisping (1994) beschriebene Methode eingesetzt, die auf Hoffmann et al. (1949), Strohecker und Henning (1963) und Chin (1985) zurückgeht. Dadurch konnte die Konzentration an Cyanocorrinoiden in den Fermentationsbrühen bestimmt werden. Bei diesen Versuchen wurde *L. reuteri* als Positivkontrolle gewählt, da diese Spezies in diesem Medium Corrinotide synthetisieren kann und sie leicht in ihrer Cyano-Form isoliert werden können. Die mit dem mikrobiologischen Test beobachtete Produktion von 4,57 ng/mL Cyanocorrinoiden unter aeroben Bedingungen und die zuvor berichtete Identifikation von *cobG* durch Matsutani et al. (2012) legt nahe, dass *A. pasteurianus* aerob Corrinotide synthetisieren kann. Wie bereits von Rodionov et al. (2003) dargelegt, ist die Anwesenheit eines CobG-Proteins für die aerobe Cobalaminbiosynthese bestimmend.

4.3 Trennung der Corrinoiden und Messung der Absorptionsspektren mittels HPLC-DAD

Um zu belegen, dass das beobachtete Wachstum von *L. delbrueckii* ssp. *lactis* ein Indikator für die Cobalamin-Produktion ist – und nicht nur ein Indikator für nicht-corrinoide Wachstumsfaktoren – wurde eine HPLC-Methode verwendet, um damit die Ergebnisse des mikrobiologischen Tests zu bestätigen.

Die Bildung von Pseudovitamin B₁₂ durch *Lactobacillus reuteri* wurde bereits von Santos et al. (2007) nachgewiesen und von Crofts et al. (2013) als einziges Produkt, auch unter Anwesenheit von anderen Ligand-Basen, bestätigt. Konsequenterweise war eine andere Positivkontrolle für die Produktion von Cyanocobalamin notwendig. Dazu wurde *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* herangezogen und bewiesen, dass sein einziges Produkt in der Cyaniform, so wie das von *A. pasteurianus*, die gleiche Retentionszeit hatte wie der Vitamin B₁₂-Standard (Abbildung 6). Der bekannte Vitamin-B₁₂-Produzent diente auch als Positivkontrolle für die massenspektrometrische Analyse (Hargrove et al. 1955, Quesada-Chanto et al. 1998, Hugschmidt et al. 2010). Die unterschiedlichen Konzentrationen in den Kulturen von *P. freudenreichii* weisen darauf hin, dass die Zellen zu früh geerntet wurden. Die kleinen Mengen Pseudovitamin B₁₂, die ebenfalls gefunden wurden, deuten in die gleiche Richtung, denn wie Deptula et al. (2015) nachweisen konnten, produzieren *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* DSM 4902 und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* 2067 (Deptula et al. 2017) Pseudovitamin B₁₂ unter anaeroben Bedingungen, bevor daraus unter aeroben Bedingungen Vitamin B₁₂ gebildet wird.

4.4 Identifikation von Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ mittels Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Ergebnisse belegen, dass es sich bei dem Cyanocorrinoid, das aus den *A. pasteurianus*-Kulturen extrahiert wurde, um Vitamin B₁₂ handelte. Dies war vor der Fermentation in den Medien nicht nachweisbar. Diese Tatsache legt nahe, dass Entwickler von Starterkulturen nach neuen *Acetobacter*-Stämmen mit einer höheren Vitamin-B₁₂-Produktion suchen sollten, um diese als Starterkulturen einzusetzen. Auch wenn die Vitamin-B₁₂-Produktivität niedrig und die Mutationsrate in *Acetobacter*-Stämmen hoch ist (Matsutani et al. 2012), so sind sie eine vielversprechende Vitamin-B₁₂-Quelle für die Produktion von

pflanzlichen Lebensmitteln. Die Ergebnisse erhöhen die Bandbreite von möglichen Anwendungen, zum Beispiel als Teil einer Starterkultur für Kakaofermentationen, in denen *Acetobacter pasteurianus* bevorzugt vor anderen *Acetobacter* spp. eingesetzt werden sollten (Lefeber et al. 2012, Crafacck et al. 2013, Moens et al. 2014, De Vuyst und Weckx 2016). Für einen Einsatz bei der Fermentation von Tofu waren die gebildeten Vitamin-B₁₂-Mengen noch nicht ausreichend, daher wurde auf die bereits bewährte Stammkombination aus *L. reuteri* und *P. freudenreichii* zurückgegriffen (Zhu 2013).

Die chromatographischen und massenspektrometrischen Daten der co-fermentierten Tofuproben belegen, dass die beiden Moleküle Vitamin B₁₂ und Pseudovitamin B₁₂ die dominanten derivatisierten Moleküle in den Fermentationsproben waren. Diese wurden so jeweils auch in den Einzelstammfermentationen der Stämme *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* und *L. reuteri* gefunden.

4.5 Methodenetablierung

Die gezeigte Detektion von Pseudovitamin B₁₂ aus *L. reuteri* nach Aufreinigung mittels Immunaффinitätssäule veranlasst weitere Überlegungen zu den spezifischen Eigenschaften der Antikörper in den Säulen. Zum einen stellt sich die Frage, ob Pseudovitamin B₁₂ die Bindungskapazität der Immunaффinitätssäulen für Vitamin B₁₂ beeinflusst, wenn beide Analyten in der Testlösung vorhanden sind. Außerdem ist nicht offensichtlich, welche Struktur bevorzugt durch den Antikörper gebunden wird. Dies könnten kritische Faktoren für eine akkurate Analyse sein und würde auch für Messungen mit ELISA Methoden gelten, die den gleichen Antikörper einsetzen.

Beim Einsatz der unterschiedlichen Säulen zeigte sich an der Fermentationsprobe, dass die lange Inkubationszeit der Probenflüssigkeit mit den Antikörpern bei den LGE-Säulen eine verlässlichere Analyse von Pseudovitamin B₁₂ ermöglicht. Dies legt eine geringfügig niedrigere Affinität von Pseudovitamin B₁₂ im Vergleich zu Vitamin B₁₂ gegenüber den Antikörpern nahe.

4.6 Cobalt

Wie in den Kapiteln 3.6 und 3.8 dargelegt, konnte kein direkter Zusammenhang zwischen den Cobaltgehalten der Rohstoffe, die mit Tofu fermentiert wurden und den letztendlich in

den Fermentationsüberständen vorhandenen Vitamin-B₁₂-Mengen hergestellt werden. Ebenso wenig war ein Einfluss des Cobaltgehaltes der extrahierten Rohstoffe, welche mit Tofu fermentiert wurden, auf die Vitamin-B₁₂-Mengen in den Fermentationsüberständen feststellbar. Viele andere mit den Rohstoffen eingetragene Substanzen, wie zum Beispiel sekundäre Pflanzenstoffe, zeigten einen größeren Einfluss auf den Vitamin-B₁₂-Gehalt in den Fermentationsüberständen (Kapitel 4.7.1).

Erst durch den Einsatz unterschiedlicher Tofusorten – bei der Versuchsreihe, in der Tofu zusammen mit Extrakten fermentiert wurde – konnte ein Zusammenhang zwischen dem Cobalteintrag in den Fermentationsansatz und dem Vitamin-B₁₂-Gehalt am Ende des Prozesses nachgewiesen werden. Zum einen wurde dies bei Betrachtung der Positiv- und Negativkontrollen und zum anderen beim Vergleich der Fermentationen der Wiederholungen 1 und 2 mit den Fermentationen der Wiederholung 3 deutlich.

In beiden Fällen wurde der unterschiedliche Cobalteintrag in die Fermentationsansätze von den sich im Cobaltgehalt stark unterscheidenden Tofusorten verursacht. Der Eintrag durch die Tofusorte 2 war so gravierend, dass zwischen den Positiv- und Negativkontrollen in den Fermentationen mit Tofusorte 2 keine signifikanten Unterschiede mehr sichtbar waren. Zudem zeigten die Negativkontrollen mit der Tofusorte 2 etwa zweimal so hohe Vitamin-B₁₂-Gehalte wie die Positivkontrollen mit der Tofusorte 1. Der deutlich erhöhte Cobalteintrag durch die Tofusorte 2 bewirkte auch, dass in den Fermentationen von Tofu mit zehn verschiedenen Extrakten die für jeden Rohstoff höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte mit Tofusorte 2 erzielt wurden. Die einzige Ausnahme hierzu waren die Extrakte aus dem Rohstoff Kakao-testa (Kapitel 4.7.2).

Die Ursache für die unterschiedlichen Cobaltgehalte in den Tofusorten ist auf unterschiedliche Lieferanten zurückzuführen. Die Betriebe verwenden eventuell verschiedene Rohstoffe, Maschinen und Produktionsprozesse. Die in den einzelnen Herstellungsbetrieben eingesetzten regionalen Trinkwasser, Rohrleitungssysteme und Gerätschaften könnten ein Eintrag für Cobalt schon beim Quellen der Sojabohnen darstellen. Eine Untersuchung von 71 kanadischen Trinkwassern zeigte jedoch, dass Trinkwasser meist nur sehr niedrige Cobaltmengen von unter 2 ng/mL enthält (Meranger et al. 1981). Bei einer Analyse von 3969 Trinkwasserproben in Deutschland fanden Becker et al. (1997) in keiner Probe mehr als 6,7 ng/mL Cobalt. Der Großteil der Proben lag unter einem Wert von 0,8 ng/mL. Daher ist davon aus-

zugehen, dass das Wasser für keinen nennenswerten Cobalteintrag in das Produkt sorgt. Es ist ebenfalls denkbar, dass die Wahl des Fällungsmittels sowie dessen Konzentration die Mineraliengehalte (Cobaltgehalte) direkt beeinflusst. Bei einer Untersuchung von 17 kommerziellen Nigariproben fanden Ogimoto et al. (2006) keine Schwermetallbelastungen. Außerdem können sich andere Prozessschritte in der Herstellung wie z. B. Wässern (Waschen) des Tofus in frischem Wasser nach dem Pressvorgang auf den Mineralstoffgehalt auswirken. Ein solcher Wässerungsprozess kann vorhandene Mineralstoffe aus dem Produkt auswaschen. Im Hinblick auf einen hohen Cobaltgehalt im Produkt wäre ein solcher Wässerungsprozess mit Trinkwasser nicht von Vorteil.

Neben dem Produktionsprozess bildet der Cobaltgehalt des Rohstoffs Sojabohnen die Basis für den Cobaltgehalt des Produkts Tofu. Dabei sind eigentlich nicht die Samen der Sojabohnen der Teil der Pflanze, in dem aufgenommener Cobalt akkumuliert wird, sondern eher die Wurzeln und Blätter, wie von Chatterjee et al. (2006) am Beispiel von Gartenbohnen festgestellt und durch Jayakumar und Cheruth (2009) an Sojabohnen bestätigt wurde. Sie untersuchten den Einfluss des Cobalts im Boden auf den Cobaltgehalt in der Sojabohne mittels eines zugesetzten Cobaltgradienten von 50 – 250 mg/kg im Boden. Dadurch fanden sie Cobaltgehalte von 0,10 – 0,23 mg Cobalt/kg in den Sojabohnen am Ende der Wachstumsperiode. Ähnliche Experimente machten auch McLaren et al. (1987), wobei sie Cobalt verschiedenen cobaltarmen schottischen Böden zusetzten. Für die diversen darauf wachsenden Pflanzen stellten sie fest, dass deren Cobaltgehalt zunahm. Die Zunahme wurde durch folgende drei Faktoren begünstigt: durch einen niedrigeren pH-Wert, steigende Cobaltmengen die durch Calciumchlorid extrahiert werden konnten sowie durch die Unfähigkeit des Bodens Cobalt dauerhaft zu adsorbieren. Diese Fähigkeit des Bodens konnten sie über die anfängliche Steigung der Cobaltadsorptionsisotherme beurteilen, welche die Bindung des Cobalts durch die Bodenpartikel bei geringer Absättigung beschreibt. Keinen Zusammenhang fanden sie jedoch mit dem Gesamtcobaltgehalt des Bodens. Die Erwartung, dass Pflanzenwachstum auf cobaltarmem Boden zu geringeren Cobaltgehalten in der Pflanze führt als Pflanzenwachstum auf cobaltreichem Boden, greift daher zu kurz (Smith und Paterson 1999). Diese allgemeine Gültigkeit des Zusammenhangs zwischen dem Gesamtcobaltgehalt des Bodens und dem Cobaltgehalt der Pflanze wird vom Einfluss vieler weiterer Faktoren verhindert. Die Faktoren Wassergehalt (Adams und Honeysett 1964, Berrow et al. 1983, Li et al. 2004b), pH-Wert (Wright und Lawton 1954, Graham 1973, McLaren et al. 1987) und Mineralien (Taylor

und McKenzie 1966, McKenzie 1967, Adams et al. 1969, Li et al. 2004b) bedingen zusätzlich die Verfügbarkeit von Cobalt für Pflanzen. Hierbei gilt, dass eine schlechte Entwässerung, niedriger pH-Wert (<5,5) und die begrenzte Präsenz von Manganoxiden die Aufnahme von Cobalt positiv beeinflussen. Auch ist denkbar, dass symbiotische Pilze die Cobaltaufnahme fördern. Von Mykorrhizapilzen ist jedenfalls bekannt, dass diese in der Lage sind, die Cobaltaufnahme positiv zu beeinflussen, wie Whitehead (2000) berichtet. Die Aufnahmewege von Cobalt über Transporter wie z. B. IRT1 und NRAMP1 und deren Regulation durch Eisen, Zink, Mangan, Cobalt und Cadmium ist bei Pflanzen bekannt (Nevo und Nelson 2006, Cailliatte et al. 2010, Zelazny und Vert 2015). Auch existieren Kenntnisse über Ferroportine z.B. FPN1 und FPN2, die cytosolisches Cobaltionen ins Xylem und in die Vakuole transportieren (Morrissey et al. 2009). Aber anders als bei Bakterien sind für Pflanzen keine Proteine bekannt, für deren Funktion Cobalt nötig wäre (Kobayashi und Shimizu 1999, Zhang et al. 2009). Auf den Transport von Cobalt durch Bakterien in die Pflanze hinein wird in Kapitel 4.7.2 genauer eingegangen. Betrachtet man den Rohstoff Sojabohn als Cobaltlieferant für den untersuchten Tofu, so müssen folglich verschiedenste Umweltbedingungen berücksichtigt werden. Der deutlich positive Einfluss des höheren Cobaltgehalts der Tofusorte 2 zeigt, dass Tofu bereits bioverfügbares Cobalt mit in den Fermentationsprozess einbringen kann. Auf die genaueren Cobaltgehalte der einzelnen Rohstoffe soll hier nicht näher eingegangen werden, da deren Auswirkungen auf den Vitamin-B₁₂-Gehalt in der Fermentation nicht nachgewiesen werden konnte. Die möglichen Ursachen dafür werden in Kapitel 4.7.1 kurz beleuchtet.

4.7 Fed-Batch

4.7.1 Tofu mit Zusatz von pflanzlichen Rohstoffen

Der Cobaltgehalt des eingesetzten Pflanzenmaterials sollte für einen wesentlichen Cobalt eintrag in die Fermentation sorgen, war aber nicht der ausschlaggebende Faktor für die gebildeten Vitamin-B₁₂-Mengen. Andere Störgrößen müssen einen größeren Einfluss auf den Prozess ausgeübt haben. Die Umweltbedingungen wurden soweit möglich bei allen Versuchen konstant gehalten, daher ist der entscheidende Faktor in den Fermentationsansätzen in anderen Inhaltsstoffen des Pflanzenmaterials zu suchen. Die Bioverfügbarkeit von Cobalt ist demzufolge pflanzenabhängig und kann nicht allein auf die Konzentration im Pflanzen-

material zurückgeführt werden. Es ist davon auszugehen, dass primäre und sekundäre Pflanzenstoffe einen starken Einfluss auf die Bildung von Vitamin B₁₂ ausüben.

Im Folgenden wird auf einzelne Inhaltsstoffe im Pflanzenmaterial eingegangen. Die Matrices der zugesetzten Pflanzenmaterialien waren hoch divers (vergleiche Liste der Proben). Die untersuchten Arten gehören verschiedensten Pflanzenfamilien an: *Apiaceae* (5x), *Amaranthaceae* (1x), *Areaceae* (1x), *Betulaceae* (2x), *Brassicaceae* (1x), *Convolvulaceae* (1x), *Cucurbitaceae* (7x), *Fabaceae* (9x), *Irvingiaceae* (1x), *Lauraceae* (1x), *Lecynthidaceae* (1x), *Linaceae* (2x), *Malvaceae* (4x), *Papaveraceae* (1x), *Poaceae* (3x) und *Solanaceae* (1x), die in ihrer Morphologie, Anatomie und Funktion differieren. Sie divergieren zusätzlich in ihren verschiedensten Strukturen und Gewebetypen. Darunter finden sich Nährgewebe von Samen deren Speichergewebe, die hohe Fettanteile (Lein) oder Kohlenhydratanteile (Buchweizen) enthalten. Andere Gewebe wiederum sind reich an Proteinen und Aminosäuren oder auch Mineralien und Vitaminen sowie Polyphenolen und Antioxidantien.

Eine denkbare Störgröße könnten präformierte Abwehrstoffe im Pflanzenmaterial sein. Derartige Verteidigungsmechanismen von Pflanzen gegenüber Mikroorganismen können mithilfe von Phenolen, phenolischen Glucosiden, ungesättigten Laktonen, Schwefelkomponenten, Saponinen, cyanogenen Glucosiden und Glucosinolaten erreicht werden (Osborn 1996). Auf eine Auswahl präformierter Abwehrstoffe wird im Folgenden eingegangen. Der Fokus liegt dabei auf den Proben, die einen hohen Cobaltgehalt aufwiesen, aber keine hinreichenden Vitamin-B₁₂-Mengen im Fermentationsprozess lieferten.

Die Proben Anis, Kreuzkümmel und Dillspitzen konnten trotz Cobaltgehalten von mehr als 0,2 mg/kg FM das Fermentationsergebnis nicht positiv beeinflussen. Diese Pflanzenteile stammen von Pflanzen aus der Familie der *Apiaceae*, welche verschiedene Polyacetylene enthalten (Schulte et al. 1970, Degen et al. 1999, Christensen und Brandt 2006). Darunter fallen Verbindungen wie Falcarinol und Falcarindiol, welchen bereits eine antifungale und antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden konnten (Hansen 1986, Kobaisy et al. 1997, Hinds et al. 2017).

Buschmangokerne wiesen Cobaltgehalte von über 1,5 mg/kg FM auf, jedoch war die erzielte Vitamin-B₁₂-Menge mit 15,6 ng/mL sehr gering. In den Kernen der Buschmango konnten Sun und Chen (2012) Ellagsäure und deren Derivate nachweisen. Von diesen Polyphenolen ist

bekannt, dass sie eine antibakterielle Wirkung gegenüber *Helicobacter pylori* (Brown et al. 2009, Martini et al. 2009, De et al. 2018) und anderen gramnegativen sowie einigen grampositiven Bakterien wie *Corynebacterium diphtheriae* und *Bacillus subtilis* besitzen (Krauze-Baranowska et al. 2014). So wäre es denkbar, dass der hohe Gehalt an Ellagsäure und ihrer Derivate beim Einsatz dieser Probe mit hohem Cobaltgehalt zur Folge hatte, dass die Vitamin-B₁₂-Gehalte hinter den Erwartungen zurückblieben.

Die Paprika als einziger Vertreter der *Solanaceae* liefert hohe Cobaltgehalte, die jedoch offensichtlich nicht bioverfügbar sind. Wachstumshemmende Effekte durch Paprikaextrakte wurden bereits auf *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* von einigen Autoren berichtet (Al-Delaimy und Ali 1970, Cichewicz und Thorpe 1996, Dorantes et al. 2000, Careaga et al. 2003, Bacon et al. 2017). Die Prüfung der einzelnen Capsaicinoide als einzelne Reinsubstanzen konnte bei Dorantes et al. (2000) nicht den gesamten inhibitorischen Effekt erklären. Dieser wurde aber anschließend experimentell auf Zimtsäure und deren Derivat m-Cumarsäure zurückgeführt. Zudem konnten Bacon et al. (2017) die inhibitorischen Effekte auf verschiedene Capsianoside zurückführen.

Der Einsatz der Probe Bitterblätter (Lieferant 2) mit dem rund fünfmal höheren Cobaltgehalt als die Probe Bitterblätter (Lieferant 1) führte zu keiner Steigerung des Vitamin-B₁₂-Gehalts im Fermentationsprodukt. Dies könnte an einem hohen Eintrag von Saponinen (Mohammed et al. 2012, Quasie et al. 2016, Okonwu et al. 2017, Wang et al. 2018) in die Fermentation durch die beiden Proben liegen. Gegen einen negativen Einfluss von Saponinen spricht jedoch der hohe Vitamin-B₁₂-Gehalt bei den Fermentationen mit Kichererbsen und Gartenbohnen, da diese ebenfalls einen hohen Gehalt an Saponinen aufweisen, die durch den Kochprozess nicht zerstört werden (Applebaum et al. 1969, Fenwick und Oakenfull 1983). Die Zusammensetzung der Saponine variiert jedoch schon von Spezies zu Spezies, daher sind vergleichende Rückschlüsse auf sekundäre Pflanzenstoffe zwischen unterschiedlichen Pflanzenfamilien nur ein grober Anhaltspunkt (Applebaum et al. 1969, Kinjo et al. 1998).

Die Vermutung, Vertreter der Pflanzenfamilie *Fabaceae* eignen sich generell zur Anreicherung von Vitamin B₁₂ liegt deshalb nahe, weil sich unter den geeigneten Rohstoffen mehrere *Fabaceen* (z.B. Kichererbse, Gartenbohne, Sojabohne und Adzukibohne) finden ließen. Die-

ser Annahme widerspricht jedoch, dass die Proben Linse und Süßlupinenmehl, trotz vergleichbarer Cobaltgehalte wie im Pflanzenmaterial Kichererbse, dieser Erwartung nicht entsprachen. Der Einsatz der Probe Süßlupinenmehl führte lediglich zu hohen Pseudovitamin-B₁₂-Gehalten. Der Einsatz der Probe Zuckererbsen, ebenfalls ein Vertreter der *Fabaceae*, führte ebenfalls zu einem niedrigen Vitamin-B₁₂-Gehalt im Fermentationsüberstand. Diese erklären sich allerdings auch durch die bereits niedrigen Cobaltgehalte der Probe.

Die unterschiedlichen Kakaoproben lieferten durchweg Cobaltgehalte von mehr als 0,3 mg/kg FM. Diese wirkten sich jedoch lediglich bei der Probe Kakaotesta auffallend positiv auf das Fermentationsergebnis aus. Eventuell verhindern begleitende hohe Nickelgehalte oder Quecksilbergehalte die Aufnahme von Cobalt durch Propionibakterien. Eine Konkurrenz um Cobaltbindungsstellen durch andere mono- und divalente Metallionen wurde bereits von Schneider et al. (1995) festgestellt, daher ist die Mineralienkomposition der Fermentationsbrühe für die Vitamin-B₁₂-Produktion kritisch. Dies ist vor allem bei Kakaoproben relevant, denn hohe Schwermetallgehalte in Kakaoproben sind ein bekanntes Phänomen (Bertoldi et al. 2016).

4.7.2 Tofu mit Zusatz von pflanzlichen Extrakten

Die Schwankungen der Extraktions-Ausbeute sind unter anderem auf die Methode und das jeweilige Substrat zurückzuführen. Bei der Betrachtung des Substrats im Speziellen sind die Schwankungen auch auf einzelne Individuen (Samen) zurückzuführen, da davon auszugehen ist, dass die für die Extraktion verwendeten Individuen (Samen) nicht alle gleich waren. Wird die Individuenzahl erhöht, so können negative Effekte auf das Prozessziel, verursacht durch einzelne Individuen (Samen), stärker verdünnt (reduziert) werden. Dies gilt dann, wenn die Häufigkeit des mit einem negativen Einfluss assoziierten Individuums in der Stichprobe größer ist als dessen Häufigkeit in der Grundgesamtheit. Gegen einen diesbezüglich starken Einfluss einzelner Individuen (Samen) der extrahierten Substrate auf den Vitamin-B₁₂-Gehalt in den Fermentationen sprechen jedoch die hohe Streuung der Messwerte bei den Positiv- und Negativkontrollen von Tofusorte 2. Bei der Beurteilung zur Extrahierbarkeit spielt die Individualität ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle, wie anhand der größeren Standardabweichung der Proben von Leinsamen und Blaumohn gegenüber größeren Samen wie Sojabohne und Paranuss deutlich wird. Wichtig sind bei diesem Prozess hingegen Schleimstoffe

und quellfähige Bestandteile der untersuchten Rohstoffe. Deutlich wird dies bei den Proben Leinsaat und Kakaotesta. Die Schleimepidermis bei Leinsaat sorgt für eine sehr hohe Wasserbindekapazität von bis zum 30fachen des Eigengewichts (Fedeniuk und Biliaderis 1994), wodurch die verhältnismäßig großen Standardabweichungen bei der Extraktionsausbeute zu erklären sind. Bei der Probe Leinmehl stellte die Samenschale kein Hindernis mehr bei der Quellung der Samen dar und verhinderte so jegliche Extraktion durch effektive Wasserbindung. Kakaotesta nahm lediglich das Wasser auf und speicherte es, daher war auch die Extrakt-Ausbeute sehr gering. Das Phänomen der Schleimbildung ist bei Kakaotesta bereits bekannt (Bahmann 2014). Bei der Probe Buchweizen war nur eine kalte Extraktion im Anschluss an den Kochvorgang möglich, was auf die gelbildenden Eigenschaften von Buchweizenstärke zurückgeführt werden kann (Lorenz und Dilsaver 1982).

Die Aufnahme von Cobalt durch Bakterien kann sowohl passiv als auch aktiv erfolgen. Relevanz haben hierbei vor allem Symbiosepartner, die Stickstoff fixieren, deren Diversität sich über etliche Phyla erstreckt (Boyd und Peters 2013) und die im weiteren Sinne fast alle mit verschiedenen Pflanzen in symbiotischer Beziehung stehen (Hardoim et al. 2015). Einige dieser Stickstoff-Fixierer nutzen Cobalt zur Biosynthese von Vitamin B₁₂ (Dilworth et al. 1979, Campbell et al. 2006). Da keine Wurzeln verwendet wurden und in den untersuchten unfermentierten Proben kein Vitamin B₁₂ gefunden werden konnte, scheiden diese als Vitamin-B₁₂-Quelle aus. Die Aufnahme von Cobalt wird bei Propionibakterien durch die Anwesenheit von Chelatkomplexbildnern wie EDTA negativ beeinflusst (Schneider et al. 1995). Diverse Substanzen aus den pflanzlichen Extrakten wie Peptide und organische Säuren, so zum Beispiel Citronensäure oder Oxalsäure, besitzen solche chelierenden Eigenschaften und haben damit eventuell einen Einfluss auf die Aufnahme von Cobalt.

Die Extrakte bringen neben Cobalt auch Substanzen in den Prozess ein, welche die Vitamin-B₁₂-Bildung fördern können. Zum Beispiel ist hier der Eintrag von Riboflavin zu nennen, welches aufgrund vorangegangener Entwicklungsarbeiten zur Fermentation zugegeben wurde. Tofu weist direkt nach der Produktion einen Riboflavingehalt von etwa 0,1 mg/kg. Die Menge an Riboflavin nimmt jedoch selbst bei gekühlter Lagerung (4 °C) schnell ab bzw. das Riboflavin wird in die umgebende Lagerungsflüssigkeit ausgewaschen (Fernando und Murphy 1990). Der Riboflavingehalt der extrahierten Rohstoffe liegt laut Souci et al. (2008) bei der Sojabohne mit 4,6 µg/100 g am höchsten und fällt somit im Vergleich zu der supple-

mentierten Menge von 80 µg/kg Tofu noch am meisten ins Gewicht. Nach den Ergebnissen von Margier et al. (2018) ist davon auszugehen, dass Riboflavin nahezu vollständig mit Wasser extrahiert wurde, obwohl Rickman et al. (2007) von höherer Retention im Extraktionsmaterial ausgehen. Zhu konnte in seinen Experimenten nachweisen, dass zu hohe Riboflavinkonzentrationen das Prozessergebnis (Vitamin-B₁₂-Gehalt) negativ beeinflussen können, weshalb diese für weiterführende Experimente mit dem gewählten Extrakt in Zukunft spezifisch in Abhängigkeit von dem jeweiligen Rohstoff eingestellt werden sollten (Zhu 2013).

Die Gehalte einzelner Aminosäuren in Sojabohnensorten, die speziell für die Produktion von Tofu gezüchtet wurden, wurden von Zarkadas et al. (2007) zusammengefasst, wobei die relativen Verhältnisse der Aminosäuren in Tofu denen in der Sojabohne ähneln (Wang und Cavins 1988). Die am häufigsten vertretene Aminosäure L-Glutaminsäure förderte bei den Versuchen von Marwaha et al. (1983), an drei verschiedenen *Propionibacterium* Stämmen die Biomassebildung sowie auch die Vitamin-B₁₂-Produktion wie keine andere der untersuchten Aminosäuren. In den Versuchen von Wang und Cavins (1988) war Glutaminsäure mit fast 20 % anteilig die größte Stickstoffkomponente in Quellwasser von Sojabohnen sowie in anschließend produzierter Sojamilch, was neben dem Eintrag von Cobalt den positiven Einfluss von Sojabohnenextrakt auf die Vitamin-B₁₂-Gehalte der Fermentation von Tofu mit Sojabohnenextrakt erklären könnte. Sehr ähnliche Glutaminsäureanteile (ca. 18 %) fanden Singh et al. (1988) ebenfalls in Kichererbsen. Wu et al. (ca. 18 %) und Pusztai et al. (ca. 16 %) berichten dies unabhängig voneinander für Gartenbohnen (Pusztai et al. 1979, Wu et al. 1996).

Im Vitamin-B₁₂-Anabolismus werden mehrere Kohlenstoffatome des Corrin-Rings methyliert. Diese Methylgruppen stammen bei *Propionibacterium* spp. in erster Linie von der Aminosäure L-Methionin. Durch Isotopenanalyse von *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* Kulturen mit markierten Aminosäuren wurde ersichtlich, dass die Funktion von L-Methionin außerdem von L-Glycin und L-Asparaginsäure teilweise kompensiert werden kann (Iida und Kajiura 2007). Diese sind in Aminosäureanteilen von etwa 2 %, 4 % und 14 % in den Gartenbohnenproben (Pusztai et al. 1979, Wu et al. 1996) sowie etwa 2 %, 4 % und 11 % in Kichererbsenproben (Singh et al. 1988) zu erwarten, so dass die Zufuhr dieser Aminosäuren durch die Extrakte gewährleistet sein sollte. Auch sonst unterscheiden sich die beiden untersuchten Rohstoffe nicht sehr stark in ihrer Nährstoffzusammensetzung und

Extrahierbarkeit (Margier et al. 2018). Margier et al. (2018) erkannten auch, dass die Wahl der Extraktionsmethode Kochen oder Sterilisieren einen signifikanten Einfluss auf die im Rohstoff verbleibenden Proteine (Δ 17 %), essentielle und nicht essentielle Aminosäuren (Δ 17 % und Δ 18 %), Phospholipide (Δ 6 %), Gesamtlipide (Δ 13 %), Gesamtballaststoffe (Δ 22 %), Folsäure (Δ 49 %), Magnesium (Δ 36 %) und Phytat (Δ 24 %) hat. Ähnliche Experimente führten zur Erkenntnis, dass durch einen wässrigen Extraktionsprozess etwa 2 % der Proteine, 40 % der Asche und 40 % der Zucker aus Kichererbsen gewonnen werden können (Attia et al. 1994). Außerdem werden auch Saponine durch Kochen zum Teil ausgewaschen (Fenwick und Oakenfull 1983).

4.7.3 Optimierung der Extraktion von Kichererbsen für den Einsatz zur Fermentation mit Tofu

Da der Extraktionsprozess, wie zuvor dargelegt, einen starken Einfluss auf die Zusammensetzung des Produkts hat, wurde dieser mit Hilfe eines Versuchsplans optimiert. Derartige Ansätze zur Optimierung der Vitamin-B₁₂-Produktion finden sich auch in der Literatur (Kośmider et al. 2012, Hajfarajollah et al. 2015, Piwowarek et al. 2018). Kośmider et al. (2012) und Hajfarajollah et al. (2015) setzten zunächst Plackett-Burman Pläne ein, um die wichtigsten Faktoren herauszufinden und optimierten anschließend mit einem zentral zusammengesetzten Versuchsplan die wichtigsten Steuergrößen. Piwowarek et al. (2018) setzten bei ihren Versuchen dagegen nur Mischungsdesigns mit Simplex-Plänen ein und optimierten damit die Medienkomponenten im Verhältnis zueinander, um die Ausbeute von Vitamin B₁₂ zu optimieren. Bei all diesen Ansätzen wurden jeweils Supplemente zu einem Basismedium untersucht. Dagegen wurden in dieser Arbeit Prozessparameter variiert, um deren Einfluss auf die Extrakt-Ausbeute und die Eignung des Extrakts als Zutat zum Fermentationsprozess zu charakterisieren. Dazu wurden die Prozessparameter Quelldauer, Brechung und Temperatur bei der Extraktion ausgewählt.

Der Parameter Quelldauer wurde gewählt, damit in der Quellphase bereits Enzyme aktiv werden können und somit eine Chance haben, die Extraktion zu beeinflussen. Der Parameter Temperatur sollte einen Unterschied im Energieeintrag bewirken und durch das Aufbrechen der Kichererbsen sollte die Matrix besser aufgeschlossen werden, unter anderem indem die Barriere der Samenschale eliminiert wurde. So sollten die Inhaltsstoffe der Kichererbsen für

ein Auswaschen von Mineralien, Proteinen und Ballaststoffen besser zugänglich gemacht werden. In der Tat beeinflusste ein Anstieg der Temperatur die Ausbeute der Extraktion negativ. Der Effekt wurde durch die Zwei-Faktor-Interaktion mit dem Brechen der Kichererbsen verstärkt. Das Brechen der Kichererbsen führte außerdem zu einer Nivellierung des Effekts, der durch eine lange Quelldauer hervorgerufen wurde. Denn während bei ungebrochenen Kichererbsen die lange Quelldauer noch einen negativen Einfluss auf die Extrakt-ausbeute hatte, wurde bei gebrochenen Kichererbsen die Extrakt-Ausbeute nicht mehr durch die Quelldauer beeinflusst. Je stärker also die Kichererbsen bearbeitet wurden, desto geringer war die Extrakt-ausbeute. Die höchsten Extrakt-ausbeuten wurden nämlich bei einer Quelldauer von 0 h, einer Temperatur von 100 °C und ungebrochenen Kichererbsen gemessen. In Bezug auf die gebildeten Vitamin-B₁₂-Mengen zeichnete sich ein anderes Bild. Hier hatte die Temperatur einen negativen Einfluss auf die Vitamin-B₁₂-Konzentration in der Fermentationsbrühe. Dieser negative Einfluss wurde durch ein Brechen der Kichererbsen noch verstärkt, konnte aber durch geringe Quelldauer und nicht Brechen der Kichererbsen umgekehrt werden. Durch den starken Einfluss der Zwei-Faktor-Interaktionen Brechung-Temperatur und Quelldauer-Temperatur bilden sich im Regressionsmodell zwei Optimumsbereiche für die höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte: so konnten einerseits bei langer Quelldauer, niedriger Temperatur und zu Vierteln gebrochenen Kichererbsen sowie andererseits bei kurzer Quelldauer, hoher Temperatur und ungebrochenen Kichererbsen die höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte erzeugt werden.

Daraus lässt sich schließen, dass Extrakte mit geringer Extrakt-Ausbeute zu reichhaltig für ein gutes Fermentationsergebnis waren. Dagegen führte ein Extraktionsprozess mit sehr hoher Extrakt-ausbeute zu dünnen Extrakten, die sich weniger gut für eine fermentative Anreicherung mit Vitamin B₁₂ eignen. Die Unterschiede könnten dadurch verursacht worden sein, dass unterschiedliche Mengen Phytat extrahiert wurden. Dies wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Martín-Cabrejas et al. 2009, Wang et al. 2010, Margier et al. 2018), da Phytat die Fermentation durch Komplexbildung mit Proteinen (Kies et al. 2006) und Kationen (Lönnerdal 2002) beeinflussen könnten. Ebendies könnte relevant sein, da Bickers (1995) keinen Abbau des vorhandenen Phytats über den Verlauf der Fermentation von Sojamilch mit *P. freudenreichii* (Stamm nicht angegeben) feststellen konnte, wodurch evtl. Phytat-gebundene Mineralien für die Bakterien nicht zur Verfügung standen. Dagegen sprechen jedoch der simultane Verlauf des pH-Werts während der Fermentationen und die einheit-

lichen Ergebnisse der Lebendzellzahlen am Ende der Fermentationen. Die Zellzahlen bestätigen das Wachstum beider inokulierten Stämme bei allen acht Parameterkombinationen in ähnlicher Größenordnung. Die beiden Ausreißer der Lebendzellzahlen von *L. reuteri* in Fermentationsreihe 1 führten weder zu auffällig unterschiedlichen Zellzahlen bei *P. freudenreichii* noch zu Auffälligkeiten im Vitamin-B₁₂-Gehalt der Fermentationsbrühe. Lediglich der pH-Wert fiel langsamer auf den finalen Wert ab und Fermentation N5 wies die niedrigsten Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte auf.

4.7.4 Fed-Batch Scale-up-Versuche

Die beobachteten Zellzahlen lagen in der gleichen Größenordnung wie sie von Liu und Moon (1982) am Ende der Co-Kultur von *Lactobacillus acidophilus* und *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* beschrieben wurden. Sie stimmen nicht ganz mit den Ergebnissen von Hugenschmidt et al. (2011) überein. Diese verwendeten allerdings auch einen anderen Stamm bei der Co-Kultur, nämlich *Lactobacillus plantarum* dessen Zellzahlen im Bereich von 9,6 log₁₀ KBE/mL lagen.

Bezüglich der gemessenen Gesamtfolatgehalte lagen die Messwerte unter denen, die von Ginting et al. (2003) und Mo et al. (2013) in Tofu gemessen wurden. Mo et al. verwendeten unter Umständen andere Sojabohnen-Sorten und ein anderes Herstellungsverfahren für ihren Tofu, so dass der Gesamtfolatgehalt des von ihnen produzierten Tofus 4 – 6 mal höher liegt. Sie konnten eine Abhängigkeit des Folatgehaltes von der Sojabohnensorte demonstrieren. Während der Fermentation verdoppelte sich der Folatgehalt des Tofus auf 403,6 ± 117,9 ng/g, gleichzeitig wurden in der Fermentationsbrühe 631,1 ± 110,3 ng/g neu gebildet oder aus den Gartenbohnen ausgewaschen. Die höchsten Gesamtfolatgehalte (4073,9 ± 555,1 ng/g) wurden in den fermentierten Gartenbohnen gemessen und liegen nur leicht über den Werten für rohe frische Gartenbohnen der Nährstoffdatenbank der USDA (2019). Dies spricht für eine moderate Anreicherung durch den Fermentationsprozess.

Der Vitamin-B₁₂-Gehalt im Tofu der Pump- und Schlaufensysteme war ähnlich des im Rührsystem, obwohl sich die Vitamin-B₁₂-Gehalte im Fermentationsüberstand deutlich unterschieden. Dies deutet darauf hin, dass die Bakterien bei kontinuierlicher Durchmischung an der Tofuoberfläche besser mit Nährstoffen versorgt werden und dadurch auch der Tofu besser mit Vitamin B₁₂ angereichert wird. Da in den gerührten Systemen der Tofu massiver

zerstört wurde, wurden auch mehr Nährstoffe aus dem Tofu in die Fermentationsflüssigkeit übertragen. Dies erklärt den erhöhten Vitamin-B₁₂-Gehalt in den Fermentationsbrühen des Rührkessels. Beim Einsatz von Gartenbohnen im Rührkessel wurde dies nicht im gleichen Maß erreicht, was an der schlechteren Cobaltversorgung gelegen haben könnte. Ein weiterer Grund dafür könnte aber auch sein, dass die Fermentation nur 24 h statt 48 h mit Sauerstoff versorgt wurde. Dadurch stand weniger Dimethylbenzimidazol zur Verfügung, welches von *P. freudenreichii* nur unter Anwesenheit von Sauerstoff synthetisiert wird (Hörig und Renz 1980). Die hohen Pseudovitamin-B₁₂-Gehalte deuten auch darauf hin, dass die Kultur zu früh geerntet worden sein könnte (Kapitel 4.3). Als das am besten up-scalebare Fermenter-Setup erwies sich der Pumpreaktor, da in diesem der Tofu nicht zerstört wurde und gleichzeitig der zweithöchste Vitamin-B₁₂-Gehalt im Tofu gemessen werden konnte. Die Zugabe eines Extrakts würde beim Scale-up den Vorteil mit sich bringen, dass sich die Viskosität der Fermentationsflüssigkeit durch die fortlaufende Zerstörung des zugegebenen Substrats eben nicht erhöht, wie es bei der Fermentation im Rührkessel mit Gartenbohnen beobachtet wurde.

Der Vitamin-B₁₂-Gehalt der Fermentationsbrühen des Rührkessels war vergleichbar mit den Vitamin-B₁₂-Gehalten der Co-Fermentationen von *Lactobacillus plantarum* SM39 und *P. freudenreichii* DF13 von Hugenschmidt et al. (2011). Diese fermentierten Molkepermeat Medium mit den Supplementen Cobaltchlorid, Dimethylbenzimidazol und Paraminobenzoessäure. Der produzierte Tofu besitzt im Vergleich zu Sufu (3,8 ng/g) (Cao et al. 2014) einen wesentlich höheren Vitamin-B₁₂-Gehalt. Andere Autoren berichten von Vitamin-B₁₂-Gehalten in Sufu von bis zu 188 µg/g (Li et al. 2004a). Dabei geben sie die verwendete Methode zur Messung jedoch nicht an und spezifizieren die Derivate folglich nicht. Dies ist angesichts der enorm hohen Angaben kritisch zu betrachten.

Die Fruktosekonzentration der Fermentationsbrühe im Rührkessel war im Vergleich zur Fruktosekonzentration im Pumpsystem zu Beginn doppelt so hoch. Dies könnte auf die Zerstörung des Tofus – durch den Rührer verursacht und eine damit zusammenhängende erhöhte Freisetzung von Fruktose aus dem Tofu – zurückzuführen sein. Diese rührerbedingten Freisetzungseffekte erklären auch die höheren Galaktosekonzentrationen im Rührsystem über den Verlauf der Fermentation. Da die Fruktosekonzentration von Zhu (2013) als ein kritischer Faktor bei der Produktion von Vitamin B₁₂ in Tofu identifiziert wurde, sollte diese je nach gewähltem Fermenter-Setup und Extrakt separat eingestellt werden.

Propionsäure wurde bis zum Einsetzen der Belüftung gebildet und in den darauffolgenden 48 h unter Sauerstoffeinfluss zum Teil von den Bakterien weiter metabolisiert. Dieser Effekt wurde auch von Miyano et al. (2000) bei der Kultur von *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* IFO 12424 beobachtet. Essigsäure wurde nur in geringem Umfang im Schlaufenreaktor durch die Belüftung ausgeblasen. Die Bildung von Vitamin B₁₂ sollte durch die Änderung der Sauerstoffverhältnisse angeregt werden, da beim Abbau von Propionat durch *P. freudenreichii* der Wood-Werkman-Zyklus umgedreht wird und aus Propionat wieder Pyruvat gebildet wird (Ye et al. 1999). Neben Propion- und Essigsäure werden mittels Lipolyse von *P. freudenreichii* auch andere freie Fettsäuren und aromaaktive Stoffe wie 2-Methylbuttersäure gebildet (Thierry und Maillard 2002). Milchsäure akkumuliert in keinem System, sondern wird verstoffwechselt. Dies wurde auch so von Liu und Moon (1982) bei der Co-Kultur von *Lactobacillus acidophilus* und *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* festgehalten. Ebenso wurde dies von Lee et al. (1976) bei der Co-Kultur von *Lactobacillus plantarum* mit *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* beobachtet.

Eine interessante Thematik für zukünftige Untersuchungen ist sicherlich die Lagerstabilität der angereicherten Produkte. Generell ist der pH-Wert von 5 am Ende der Fermentationen eine gute Voraussetzung für die Stabilität von Vitamin B₁₂, solange es keinem Lichteinfluss ausgesetzt ist (Veer et al. 1951). Wie Edlmann et al. (2016) demonstrierten, überstand mehr als die Hälfte von in situ produziertem Vitamin B₁₂ einen Backprozess. In Fleisch jedoch demonstrierten Ortigues-Marty et al. (2006) noch geringere Verluste von lediglich 5 – 25 % durch einen Kochprozess.

Ein weiterer Vorteil eines pH-Werts von 5 am Ende des Fermentationsprozesses ist, dass er sich nicht ideal für die Synthese von Reuterin durch *L. reuteri* eignet. Die Konzentration von Reuterin im Produkt müsste im Falle einer Anwendung des Prozesses kontrolliert werden, selbst wenn kein Glycerinüberschuss im Medium zu erwarten ist, der für eine Reuterinsynthese notwendig wäre (Bauer et al. 2010).

Obwohl im Pumpsystem nicht die höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte erzielt wurden, so erwies es sich dennoch als am besten für einen Scale-up einer Fermentation von Tofu mit pflanzlichen Extrakten geeignet. Der Vorteil dieses Systems war, im Gegensatz zum Rührsystem, bei dem die höchsten Vitamin-B₁₂-Gehalte gemessen wurden, dass der Tofu nicht zerstört wurde. Legt man die Messdaten aus den Optimierungsexperimenten zugrunde, so wären bei einer

Quelldauer von 20 h, zu Vierteln gebrochenen Kichererbsen und einer Extraktionstemperatur von 100 °C bei der Fermentation von Tofu mit Kichererbsenextrakt Vitamin-B₁₂-Gehalte von 171 ng/mL in der Fermentationsbrühe zu erwarten. Daraus resultiert, dass der Verzehr von 23 mL Fermentationsbrühe notwendig wäre, um den Schätzwert für die angemessene tägliche Zufuhr bei Erwachsenen von 4 µg zu erreichen.

Eine weitere Steigerung der Vitamin-B₁₂-Produktion durch *P. freudenreichii* könnte durch gentechnische Modifikation des Propionibakterienstammes (Piao et al. 2004a, Piao et al. 2004b, Moore et al. 2014) erreicht werden.

5 Literatur

- Adams SN, Honeysett JL (1964) Some effects of soil waterlogging on the cobalt and copper status of pasture plants grown in pots. *Aust J Agr Res* 15:357
- Adams SN, Honeysett JL, Tiller KG, Norrish K (1969) Factors controlling the increase of cobalt in plants following the addition of a cobalt fertilizer. *Aust J Soil Res* 7:29
- Al-Delaimy KS, Ali SH (1970) Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *J Sci Food Agric* 21:110-112
- Alexander P, Brown C, Arneith A, Dias C, Finnigan J, Moran D, Rounsevell MDA (2017) Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use? *Glob Food Sec* 15:22-32
- Alloway BJ (1999) Vorgänge in Böden und das Verhalten von Schwermetallen. In: Alloway BJ (ed) *Schwermetalle in Böden*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 11-40
- Andrews ED (1966) Cobalt concentrations in some new zealand fodder plants grown on cobalt-sufficient and cobalt-deficient soils. *New Zeal J Agr Res* 9:829-838
- Applebaum SW, Marco S, Birk Y (1969) Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. *J Agr Food Chem* 17:618-622
- Ardhana MM, Fleet GH (2003) The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int J Food Microbiol* 86:87-99
- Arskold E, Lohmeier-Vogel E, Cao R, Roos S, Radstrom P, van Niel EW (2008) Phosphoketolase pathway dominates in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 containing dual pathways for glycolysis. *J Bacteriol* 190:206-212
- Attia RS, Shehata AME-T, Aman ME, Hamza MA (1994) Effect of cooking and decortication on the physical properties, the chemical composition and the nutritive value of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Chem* 50:125-131
- Aubert H, Pinta M (1977) Cobalt. In: Aubert H, Pinta M (eds) *Trace Elements in Soils vol 7*. Elsevier, Amsterdam, pp 19-25
- Babuchowski A, Laniewska-Moroz L, Warminska-Radyko I (1999) Propionibacteria in fermented vegetables. *Lait* 79:113-124
- Bacon K, Boyer R, Denbow C, O'Keefe S, Neilson A, Williams R (2017) Antibacterial activity of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) extract fractions against select foodborne pathogens. *Food Sci Nutr* 5:730-738
- Bahmann C (2014) *Biotechnologie von Theobroma cacao* L. Dissertation, Universität Hamburg
- Baik HW, Russell RM (1999) Vitamin B₁₂ deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr* 19:357-377
- Bauer R, du Toit M, Kossmann J (2010) Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *Int J Food Microbiol* 137:28-31
- Becker K, Müssig-Zufika M, Hoffmann L, Krause O, Meyer E (1997) *Umwelt-Survey 1990/92 Band V: Trinkwasser*. Umweltbundesamt, Berlin

- Berrow M, Burridge J, Reith J (1983) Soil drainage conditions and related plant trace element contents. *J Sci Food Agric* 34:53-54
- Bertoldi D, Barbero A, Camin F, Caligiani A, Larcher R (2016) Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. *Food Control* 65:46-53
- Bickers GA (1995) Erzeugung von Vitamin B₁₂ mittels Propionibakterien in pflanzlichen Lebensmittelextrakten: Einfluss der Fermentation auf einige Fermentationsmerkmale. Dissertation, TU Berlin
- Bickers GA, Bärwald G (1994) Semikontinuierliche in vivo-Vitamin-B₁₂-Anreicherung mittels Propionifermentation in pflanzlichen Lebensmittelextrakten. *Industrielle Obst- und Gemüseverwertung* 79: 252-256
- Blake CJ (2007) Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem* 389:63-76
- Bodie EA, Goodman N, Schwartz RD (1987) Production of propionic acid by mixed cultures of *Propionibacterium shermanii* and *Lactobacillus casei* in autoclave-sterilized whey. *J Ind Microbiol* 1:349-353
- Boyd E, Peters J (2013) New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. *Front Microbiol* 4
- Brown JC, Huang G, Haley-Zitlin V, Jiang X (2009) Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 75:848-852
- Bullerman LB, Berry EC (1966) Use of cheese whey for vitamin B₁₂ production. I. Whey solids and yeast extract levels. *Appl microbiol* 14:353-355
- Burgé G, Saulou-Bérion C, Moussa M, Allais F, Athes V, Spinnler H-E (2015) Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains. *J Microbiol* 53:702-710
- Burgess CM, Smid EJ, van Sinderen D (2009) Bacterial vitamin B₂, B₁₁ and B₁₂ overproduction: An overview. *Int J Food Microbiol* 133:1-7
- Cailliatte R, Schikora A, Briat J-F, Mari S, Curie C (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *The Plant cell* 22:904-917
- Campbell GR, Taga ME, Mistry K, Lloret J, Anderson PJ, Roth JR, Walker GC (2006) *Sinorhizobium meliloti* bluB is necessary for production of 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B₁₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 103
- Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, Cleenwerck I, Vandamme P, Takrama JS, Vancanneyt M, De Vuyst L (2007) Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol* 73:1809-1824
- Cao L-l, Liu W, Chen C-y, Ye Z-x, Wang L-q (2014) Study on the main of nutrition of fermented sufu during fermentation by *Rhizopus oligosporus* Saito. *Food Ind*
- Capozzi V, Russo P, Dueñas MT, López P, Spano G (2012) Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1383-1394

- Careaga M, Fernandez E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo ME, Hernandez-Sanchez H (2003) Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *Int J Food Microbiol* 83:331-335
- Chamlagain B, Edelmann M, Kariluoto S, Ollilainen V, Piironen V (2015) Ultra-high performance liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of active vitamin B₁₂ in cells of *Propionibacterium* and fermented cereal matrices. *Food Chem* 166:630-638
- Chamlagain B, Sugito TA, Deptula P, Edelmann M, Kariluoto S, Varmanen P, Piironen V (2018) In situ production of active vitamin B₁₂ in cereal matrices using *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Sci Nutr* 6:67-76
- Chatterjee C, Gopal R, Dube BK (2006) Physiological and biochemical responses of French Bean to excess cobalt. *J Plant Nutr* 29:127-136
- Chin HB (1985) Vitamin B₁₂. In: Augustin J, Klein BP, Becker BS, Venugopal PB (eds) *Methods of vitamin assay* 4. edn. Wiley, New York, pp 497-514
- Christensen LP, Brandt K (2006) Bioactive polyacetylenes in food plants of the *Apiaceae* family: occurrence, bioactivity and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 41:683-693
- Cichewicz RH, Thorpe PA (1996) The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J Ethnopharmacol* 52:61-70
- Crafack M, Mikkelsen MB, Saerens S, Knudsen M, Blennow A, Lowor S, Takrama J, Swiegers JH, Petersen GB, Heimdal H, Nielsen DS (2013) Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *Int J Food Microbiol* 167:103-116
- Crofts TS, Seth EC, Hazra AB, Taga ME (2013) Cobamide structure depends on both lower ligand availability and CobT substrate specificity. *Chem Biol* 20:1265-1274
- DACH (2018) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr., 2. edn. Umschau/Braus-Verlag, Bonn
- Dalmaso M, Nicolas P, Falentin H, Valence F, Tanskanen J, Jatila H, Salusjärvi T, Thierry A (2011) Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int J Food Microbiol* 145:113-120
- Davey GK, Spencer EA, Appleby PN, Allen NE, Knox KH, Key TJ (2002) EPIC—Oxford:lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33 883 meat-eaters and 31 546 non meat-eaters in the UK. *Public Health Nutr* 6:259-268
- de Benoist B (2008) Conclusions of a WHO technical consultation on folate and vitamin B₁₂ deficiencies. *Food Nutr Bull* 29:S238-S244
- de Freitas R, Madec M-N, Chuat V, Maillard M-B, Mukdsi MCA, Falentin H, de Carvalho AF, Valence F, Thierry A (2015) New insights about phenotypic heterogeneity within *Propionibacterium freudenreichii* argue against its division into subspecies. *Dairy Sci Technol* 95:465-477
- De R, Sarkar A, Ghosh P, Ganguly M, Karmakar BC, Saha DR, Halder A, Chowdhury A, Mukhopadhyay AK (2018) Antimicrobial activity of ellagic acid against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *J Antimicrob Chemoth* 73:1595-1603
- De Vuyst L, Weckx S (2016) The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J Appl Microbiol* 121:5-17

- Degen T, Buser H, Städler E (1999) Patterns of oviposition stimulants for Carrot Fly in leaves of various host plants. *J Chem Ecol* 25:67-87
- Demain AL, Daniels HJ, Schnable L, White RF (1968) Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B₁₂ fermentation. *Nature* 220:1324
- Denter J, Bisping B (1994) Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation. *Int J Food Microbiol* 22:23–31
- Deptula P, Chamlagain B, Edelmann M, Sangsuwan P, Nyman TA, Savijoki K, Piironen V, Varmanen P (2017) Food-like growth conditions support production of active vitamin B₁₂ by *Propionibacterium freudenreichii* 2067 without DMBI, the lower ligand base, or cobalt supplementation. *Front Microbiol* 8:368
- Deptula P, Kylli P, Chamlagain B, Holm L, Kostiaainen R, Piironen V, Savijoki K, Varmanen P (2015) BluB/CobT2 fusion enzyme activity reveals mechanisms responsible for production of active form of vitamin B₁₂ by *Propionibacterium freudenreichii*. *Microb Cell Fact* 14:186
- Dilworth MJ, Robson AD, Chatel DL (1979) Cobalt and nitrogen fixation in *Lupinus angustifolius* L. II. Nodule formation and function. *New Phytol* 83:63-79
- Dixon WJ (1950) Analysis of extreme values. *The Annals of Mathematical Statistics* 21:488-506
- Dorantes L, Colmenero R, Hernandez H, Mota L, Jaramillo ME, Fernandez E, Solano C (2000) Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *Int J Food Microbiol* 57:125-128
- Edelmann M, Chamlagain B, Santin M, Kariluoto S, Piironen V (2016) Stability of added and in situ-produced vitamin B₁₂ in breadmaking. *Food Chem* 204:21-28
- Edim Etta H, Chinomso Olisaek C, Inah Iboh C (2013) Effect of *Irvingia gabonensis* (Aubry-Lecomte ex O'Rorke) seeds on the liver and gonads of male albino rats. *J Health Med Nurs* 2
- EFSA (2009) Assessment of the safety of cobalt(II) chloride hexahydrate added for nutritional purposes as a source of cobalt in food supplements and the bioavailability of cobalt from this source. *EFSA Journal* 7:1066
- EFSA (2012) Panel on Additives Products or Substances used in Animal Feed: Scientific opinion on safety and efficacy of cobalt compounds (E3) as feed additives for all animal species: cobaltous acetate tetrahydrate, basic cobaltous carbonate monohydrate and cobaltous sulphate heptahydrate, based on a dossier submitted by TREAC EEIG. *EFSA Journal* 10:2791
- Esuoso K, Lutz H, Kutubuddin M, Bayer E (1998) Chemical composition and potential of some underutilized tropical biomass: I: fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*). *Food Chem* 61:487-492
- Fedeniuk RW, Biliaderis CG (1994) Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. *J Agr Food Chem* 42:240-247
- Fedosov SN (2012) Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. In: Stanger O (ed) *Water Soluble Vitamins*, vol 56. Springer, Dordrecht, pp 347-367
- Fenwick DE, Oakenfull D (1983) Saponin content of food plants and some prepared foods. *J Sci Food Agric* 34:186-191
- Fernando S, Murphy P (1990) HPLC Determination of thiamine and riboflavin in soybeans and tofu. *J Agr Food Chem* 38

- Friedrich W (1975) Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinoiden vol III/2. Fermente Hormone Vitamine. Georg Thieme, Stuttgart
- Ginting E, Arcot J, Chox JM (2003) Determination of folate retention during tofu preparation using trypsin treatment and microbiological assay. *Indon J Agr Sci* 4:12-17
- Graham ER (1973) Selective distribution and labile pools of micronutrient elements as factors affecting plant uptake. *Soil Sci Soc Am J* 37:70-74
- Gruber K, Puffer B, Krautler B (2011) Vitamin B₁₂-derivatives-enzyme cofactors and ligands of proteins and nucleic acids. *Chem Soc Rev* 40:4346-4363
- Gustafson RH, Bowen RE (1997) Antibiotic use in animal agriculture. *J Appl Microbiol* 83:531-541
- Hajfarajollah H, Mokhtarani B, Mortaheb H, Afaghi A (2015) Vitamin B₁₂ biosynthesis over waste frying sunflower oil as a cost effective and renewable substrate. *J Food Sci Technol* 52:3273-3282
- Hamed SY, El Hassan NM, Hassan AB, Eltayeb MM, Babiker EE (2008) Nutritional evaluation and physicochemical properties of processed pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook) seed flour. *Pakistan J Nutr* 7:330-334
- Hansen LB, P.M. (1986) Polyacetylenes in *Araliaceae*: their chemistry, biosynthesis and biological significance. *Phytochemistry* 25:285-293
- Haridom PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:293-320
- Hargrove ER, Alexandria V, Abraham L (1955) Process for the manufacture of vitamin B₁₂.
- Hedderich J (2018) *Angewandte Statistik : Methodensammlung mit R*. 16. edn. Springer Spektrum, Berlin
- Herrero M, Havlík P, Valin H, Notenbaert A, Rufino MC, Thornton PK, Blümmel M, Weiss F, Grace D, Obersteiner M (2013) Biomass use, production, feed efficiencies, and greenhouse gas emissions from global livestock systems. *P Natl Acad Sci USA* 110:20888-20893
- Hinds L, Kenny O, Hossain MB, Walsh D, Sheehy E, Evans P, Gaffney M, Rai DK (2017) Evaluating the antibacterial properties of polyacetylene and glucosinolate compounds with further identification of their presence within various carrot (*Daucus carota*) and broccoli (*Brassica oleracea*) cultivars using high-performance liquid chromatography with a diode array detector and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses. *J Agr Food Chem* 65:7186-7191
- Hodgkin DC, Kamper J, Mackay M, Pickworth J, Trueblood KN, White JG (1956) Structure of vitamin B₁₂. *Nature* 178:64-66
- Hoffmann C, Stokstad E, Hutchings B, Dornbush A, Jukes TH (1949) The microbiological assay of vitamin B₁₂ with *Lactobacillus leichmannii*. *J Biol Chem* 181:635-644
- Hörig JA, Renz P (1980) Biosynthesis of Vitamin B₁₂. Some properties of the 5, 6-Dimethylbenzimidazole-forming system of *Propionibacterium freudenreichii* and *Propionibacterium shermanii*. *Eur J Biochem* 105:587-592
- Huffman MA, Seifu M (1989) Observations on the Illness and Consumption of a Possibly Medicinal Plant *Vernonia amygdalina* (Del), by a Wild Chimpanzee in the Mahale Mountains National-Park, Tanzania. *Primates* 30:51-63

- Hugenschmidt S, Schwenninger SM, Gnehm N, Lacroix C (2010) Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B₁₂ production in supplemented whey permeate. *Int Dairy J* 20:852-857
- Hugenschmidt S, Schwenninger SM, Lacroix C (2011) Concurrent high production of natural folate and vitamin B₁₂ using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. *Process Biochem* 46:1063-1070
- Iida K, Kajiwaru M (2007) Metabolic pathways leading from amino acids to vitamin B₁₂ in *Propionibacterium shermanii*, and the sources of the seven methyl carbons. *FEBS J* 274:5090-5095
- Ishihara Y, Ueta K, Bito T, Takenaka S, Yabuta Y, Watanabe F (2013) Characterization of vitamin B₁₂ compounds from the brackish-water bivalve *Corbicula japonica*. *Fisheries Sci* 79:321-326
- Jayakumar K, Cheruth AJ (2009) Uptake and accumulation of cobalt in plants: a study based on exogenous cobalt in soybean. *Bot Res Int* 2:310-314
- Johnson JE, Jr., Reyes FE, Polaski JT, Batey RT (2012) B₁₂ cofactors directly stabilize an mRNA regulatory switch. *Nature* 492:133-137
- Johnson MA (2007) If high folic acid aggravates vitamin B₁₂ deficiency what should be done about it? *Nutr Rev* 65:451-458
- Kabata-Pendias A, Pendias H (2001) Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton
- Kanchanarach W, Theeragool G, Inoue T, Yakushi T, Adachi O, Matsushita K (2010) Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1591-1597
- Kandler O (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Anton Leeuw* 49:209-224
- Kandler O, Stetter K-O, Köhl R (1980) *Lactobacillus reuteri* sp. nov., a new species of heterofermentative lactobacilli. *Zentralblatt für Bakteriologie: I Abt Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* 1:264-269
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K (2016) BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol* 428:726-731
- Kato K, Hayashi M, Kamikubo T (1968) Isolation of 5,6-dimethylbenzimidazolyl cobamide coenzyme as a cofactor for glutamate formation from *Acetobacter suboxydans*. *Biochim et Biophys Acta* 165:233-237
- Keuth S, Bisping B (1994) Vitamin B₁₂ production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. *Appl Environ Microbiol* 60:1495-1499
- Kies AK, De Jonge LH, Kemme PA, Jongbloed AW (2006) Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. *In Vitro Studies. J Agr Food Chem* 54:1753-1758
- Kinjo J, Hatakeyama M, Udayama M, Tsutanaga Y, Yamashita M, Nohara T, Yoshiki Y, Okubo K (1998) HPLC profile analysis of oleanene-glucuronides in several edible beans. *Biosci Biotech Bioch* 62:429-433
- Kirk SFL, Cade JE, Barrett JH, Conner M (1999) Diet and lifestyle characteristics associated with dietary supplement use in women. *Public Health Nutr* 2:69-73

- Kloke A, Sauerbeck DR, Vetter H (1984) The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. In: Nriagu JO (ed) *Changing Metal Cycles and Human Health* Springer, Berlin, pp 113-141
- Kobaisy M, Abramowski Z, Lermer L, Saxena G, Hancock REW, Towers GHN, Dooxsee D, Stokes RW (1997) Antimycobacterial polyynes of Devil's Club (*Oplopanax horridus*), a north american native medicinal plant. *J Nat Prod* 60:1210-1213
- Kobayashi M, Shimizu S (1999) Cobalt proteins. *Eur J Biochem* 261:1-9
- Kośmider A, Białas W, Kubiak P, Drożdżyńska A, Czaczyk K (2012) Vitamin B₁₂ production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Bioresource Technol* 105:128-133
- Kräutler B, Ostermann S (2003) Structure, reactions and functions of B₁₂ and B₁₂-proteins. In: Kadish K, Smith K, Guillard R (eds) *The Porphyrin Handbook*, vol 11 *Bioinorganic and Bioorganic Chemistry*. Academic press, Amsterdam, pp 229-276
- Krauze-Baranowska M, Majdan M, Hałas R, Glód D, Kula M, Fecka I, Orzeł A (2014) The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Food Funct* 5:2536-2541
- Lagunes Galvez S, Loiseau G, Paredes JL, Barel M, Guiraud JP (2007) Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *Int J Food Microbiol* 114:124-130
- Lawrence AD, Nemoto-Smith E, Deery E, Baker JA, Schroeder S, Brown DG, Tullet JMA, Howard MJ, Brown IR, Smith AG, Boshoff HI, Barry CE, Warren MJ (2018) Construction of fluorescent analogs to follow the uptake and distribution of cobalamin (vitamin B₁₂) in bacteria, worms, and plants. *Cell Chemical Biology* 25:941-951.e946
- LeBlanc JG, Rutten G, Bruinenberg P, Sesma F, de Giori GS, Smid EJ (2006) A novel dairy product fermented with *Propionibacterium freudenreichii* improves the riboflavin status of deficient rats. *Nutrition* 22:645-651
- Lee IH, Fredrickson AG, Tsuchiya HM (1976) Dynamics of mixed cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium shermanii*. *Biotechnol Bioeng* 18:513-526
- Lefebvre T, Papalexandratou Z, Gobert W, Camu N, De Vuyst L (2012) On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiol* 30:379-392
- Lerche M, Reuter G (1962) Das Vorkommen aerob wachsender grampositiver Stäbchen des Genus *Lactobacillus beijerinckii* im Darminhalt erwachsener Menschen (gleichzeitig ein Beitrag zur genaueren Kenntnis der aeroben Laktobazillen). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 1* 185:446 ff.
- Li LT, Yin LJ, Saito M (2004a) Function of traditional foods and food culture in China. *Jarq-Jpn Agr Res Q* 38:213-220
- Li Z, McLaren RG, Metherell AK (2004b) The availability of native and applied soil cobalt to ryegrass in relation to soil cobalt and manganese status and other soil properties. *New Zeal J Agr Res* 47:33-43
- Lieberei R, Reisdorff C (2012) *Nutzpflanzen: 118 Tabellen*. 8 edn. Thieme, Stuttgart

- Lim TK (2012) Pisum sativum. In: Lim T (ed) Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants Fruits, vol 2 pp 849-866
- Lin MY, Young CM (2000) Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 10:409-413
- Liu JAP, Moon NJ (1982) Commensalistic Interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Propionibacterium shermanii*. *Appl Environ Microbiol* 44:715-722
- Liu K (1997) Soybeans: Chemistry, technology, and utilization. Chapman & Hall, New York
- Lönnerdal B (2002) Phytic acid–trace element (Zn, Cu, Mn) interactions. *Int J Food Sci Technol* 37:749-758
- Lorenz K, Dilsaver W (1982) Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) starch – physico-chemical properties and functional characteristics. *Starch-Stärke* 34:217-220
- Luo X, Chen B, Ding L, Tang F, Yao S (2006) HPLC-ESI-MS analysis of vitamin B₁₂ in food products and in multivitamins-multimineral tablets. *Anal Chim Acta* 562:185-189
- Madhu A, Giribhattanavar P, Narayan M, Prapulla S (2010) Probiotic lactic acid bacterium from kanjika as a potential source of vitamin B₁₂: evidence from LC-MS, immunological and microbiological techniques. *Biotechnol Lett* 32:503-506
- Margier M, Georgé S, Hafnaoui N, Remond D, Nowicki M, Du Chaffaut L, Amiot M-J, Reboul E (2018) Nutritional composition and bioactive content of legumes: characterization of pulses frequently consumed in France and effect of the cooking method. *Nutrients* 10:1668
- Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D (2002) Microbial production of vitamin B₁₂. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:275-285
- Martín-Cabrejas MA, Aguilera Y, Pedrosa MM, Cuadrado C, Hernández T, Díaz S, Esteban RM (2009) The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chem* 114:1063-1068
- Martini S, D’Addario C, Colacevich A, Focardi S, Borghini F, Santucci A, Figura N, Rossi C (2009) Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *Int J Antimicrob Ag* 34:50-59
- Marwaha SS, Sethi RP, Kennedy JF (1983) Role of amino acids, betaine and choline in vitamin B₁₂ biosynthesis by strains of *Propionibacterium*. *Enzyme Microb Technol* 5:454-456
- Matsutani M, Hirakawa H, Saichana N, Soemphol W, Yakushi T, Matsushita K (2012) Genome-wide phylogenetic analysis of differences in thermotolerance among closely related *Acetobacter pasteurianus* strains. *Microbiol* 158:229–239
- McEwen SA (2006) Antibiotic use in animal agriculture: what have we learned and where are we going? *Anim Biotechnol* 17:239-250
- McKenzie R (1967) The sorption of cobalt by manganese minerals in soils. *Soil Res* 5:235-246
- McLaren RG, Lawson DM, Swift RS (1987) The availability to pasture plants of native and applied soil cobalt in relation to extractable soil cobalt and other soil properties. *J Sci Food Agric* 39:101-112
- Mejia A, Harwatt H, Jaceldo-Siegl K, Sranacharoenpong K, Soret S, Sabaté J (2018) Greenhouse gas emissions generated by tofu production: a case study. *J Hunger Envir Nutr* 13:131-142

- Mekonnen MM, Hoekstra AY (2012) A global assessment of the water footprint of farm animal products. *Ecosystems* 15:401-415
- Meranger JC, Subramanian KS, Chalifoux C (1981) Survey for cadmium, cobalt, chromium, copper, nickel, lead, zinc, calcium, and magnesium in Canadian drinking water supplies. *J Assoc Off Ana Chem* 64:44-53
- Minervini F, Lattanzi A, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M (2012) Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Appl Environ Microbiol* 78:5328-5340
- Minot GR, Murphy WP (1926, 2001) Treatment of pernicious anemia by a special diet. 1926. *Yale J Biol Med* 74:341–353
- Miyano K-i, Ye K, Shimizu K (2000) Improvement of vitamin B₁₂ fermentation by reducing the inhibitory metabolites by cell recycle system and a mixed culture. *Biochem Eng J* 6:207-214
- Mo H, Kariluoto S, Piironen V, Zhu Y, Sanders MG, Vincken JP, Wolkers-Rooijackers J, Nout MJ (2013) Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B₁₂ and isoflavones in tofu and tempe. *Food Chem* 141:2418-2425
- Moens F, Lefeber T, De Vuyst L (2014) Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Appl Environ Microbiol* 80:1848-1857
- Mohammed HA, Mada SB, Muhammad A, Olagunju A, Garba A, Mohammed A, Garba Y, Joseph AD (2012) Comparative proximate analysis of three edible leafy vegetables commonly consumed in zaria, nigeria. *Int J Mod Biol Med* 1:82-88
- Moore SJ, Mayer MJ, Biedendieck R, Deery E, Warren MJ (2014) Towards a cell factory for vitamin B₁₂ production in *Bacillus megaterium*: bypassing of the cobalamin riboswitch control elements. *New Biotechnol* 31:553-561
- Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li L, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinet ML (2009) The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21:3326-3338
- Nahvi A, Barrick JE, Breaker RR (2004) Coenzyme B₁₂ riboswitches are widespread genetic control elements in prokaryotes. *Nucleic Acids Res* 32:143-150
- Naylor R, Steinfeld H, Falcon W, Galloway J, Smil V, Bradford E, Alder J, Mooney H (2005) Losing the links between livestock and land. *Science* 310:1621-1622
- Nevo Y, Nelson N (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res* 1763:609-620
- Nexø E, Hansen MR, Konradsen L (1988) Human salivary epidermal growth factor, haptocorrin and amylase before and after prolonged exercise. *Scand J Clin Lab Invest* 48:269-273
- Nielsen DS, Teniola OD, Ban-Koffi L, Owusu M, Andersson TS, Holzapfel WH (2007) The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 114:168-186
- Noël L, Chekri R, Millour S, Vastel C, Kadar A, Sirot V, Leblanc J-C, Guérin T (2012) Li, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se and Mo levels in foodstuffs from the Second French TDS. *Food Chem* 132:1502-1513

- Ogimoto M, Uematsu Y, Kabashima J, Suzuki K, Ito K (2006) Survey on the quality of commercial Nigari (crude magnesium chloride [sea water]). *J Food Hyg Soc Jpn* 47:296-301
- Okonwu K, Mensah S, Akonye L (2017) Phytochemical Profile of *Telfairia occidentalis* Leaf Grown in Soilless and Soil Media using HPLC. *J Agric Stud* 5:20
- Ortigue-Marty I, Micol D, Prache S, Dozias D, Girard CL (2005) Nutritional value of meat: the influence of nutrition and physical activity on vitamin B₁₂ concentrations in ruminant tissues. *Reprod Nutr Dev* 45:453-467
- Ortigue-Marty I, Thomas E, Prévéraud D, Girard CL, Bauchart D, Durand D, Peyron A (2006) Influence of maturation and cooking treatments on the nutritional value of bovine meats: Water losses and vitamin B₁₂. *Meat Sci* 73:451-458
- Osborn AE (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant cell* 8:1821-1831
- Papalexandratou Z, Falony G, Romanens E, Jimenez JC, Amores F, Daniel HM, De Vuyst L (2011) Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional Ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl Environ Microbiol* 77:7698-7714
- Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, De Vuyst L (2013) *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiol* 35:73-85
- Passos FML, Passos FJV (1985) Descrição e classificação de bactérias acéticas isoladas da fermentação do cacau, com base em uma análise numérica. *Rev Microbiol* 16:290-298
- Patrick S, McDowell A (2012) Order XIII Propionibacteriales ord. nov. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H, Trujillo ME, Ken-ichiro S, Ludwig W, Whitman WB (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Actinobacteria*, vol 5 Springer, New York, pp 1137-1300
- Perlman D (1959) Microbial synthesis of cobamides. *Adv Appl Microbiol* 1:87-122
- Piao Y, Kiatpapan P, Yamashita M, Murooka Y (2004a) Effects of expression of hemA and hemB genes on production of porphyrin in *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol* 70:7561-7566
- Piao Y, Yamashita M, Kawarachi N, Asegawa R, Ono H, Murooka Y (2004b) Production of vitamin B₁₂ in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. *J Biosci Bioeng* 98:167-173
- Piveteau P (1999) Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: a review. *Lait* 79:23-41
- Piwowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Bzducha-Wróbel A, Synowiec A (2018) Research on the ability of propionic acid and vitamin B₁₂ biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82. *Anton Leeuw* 111:921-932
- Postma M, Speksnijder DC, Jaarsma ADC, Verheij TJM, Wagenaar JA, Dewulf J (2016) Opinions of veterinarians on antimicrobial use in farm animals in Flanders and the Netherlands. *Vet Rec* 179:68

- Pusztai A, Clarke EMW, King TP, Stewart JC (1979) Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): Chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J Sci Food Agric* 30:843-848
- Quasie O, Zhang Y-M, Zhang H-J, Luo J, Kong L-Y (2016) Four new steroid saponins with highly oxidized side chains from the leaves of *Vernonia amygdalina*. *Phytochem Lett* 15:16-20
- Quesada-Chanto A, Schmid-Meyer AC, Schroeder AG, Fuchter A, Carvalho-Jonas MF, Koehntopp PI, Jonas R (1998) Comparison of methods for determination of vitamin B₁₂ in microbial material. *Biotechnol Tech* 12:75-77
- Quesnel VC (1965) Agents inducing the death of cacao seeds during fermentation. *J Sci Food Agric* 16:441-447
- Rao SS, Washington DR (1964) Influence of cobalt on *Propionibacterium freudenreichii*. *Nature* 202:212
- Reichert N, Rubach K (1990) Determination of vitamin B₁₂ in foods containing vitamin additions by a competitive protein-binding assay (CPBA) and an ELISA. *Dtsch Lebensm-Rundsch* 86:307-310
- Rickes EL, Brink NG, Koniuszy FR, Wood TR, Folkers K (1948) Crystalline vitamin B₁₂. *Science* 107:396-397
- Rickman JC, Barrett DM, Bruhn CM (2007) Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J Sci Food Agric* 87:930-944
- Ripari V, Gänzle MG, Berardi E (2016) Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *Int J Food Microbiol* 232:35-42
- Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS (2003) Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. *The J Biol Chem* 278:41148-41159
- Roessner CA, Huang K-x, Warren MJ, Raux E, Scott AI (2002) Isolation and characterization of 14 additional genes specifying the anaerobic biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂) in *Propionibacterium freudenreichii* (*P. shermanii*). *Microbiol* 148:1845-1853
- Santos F, Vera JL, Lamosa P, De Valdez GF, De Vos WM, Santos H, Sesma F, Hugenholtz J (2007) Pseudovitamin B₁₂ is the corrinoid produced by *Lactobacillus reuteri* CRL1098 under anaerobic conditions. *FEBS Lett* 581:4865-4870
- Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Vancanneyt M, De Vuyst L, Vandamme P, Huys G (2008) Taxonomic structure and stability of the bacterial community in Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 74:2414-2423
- Schneider Z, Stroiński A (1987) *Comprehensive B₁₂: Chemistry, biochemistry, nutrition, ecology, medicine.* Walter de Gruyter, Berlin
- Schneider Z, Trojanowska K, Jaszewski B, Nowak t (1995) Cobalt binding by *Propionibacterium arabinosum*. *Lait* 75:379-389
- Schulte KE, Rücker G, Backe W (1970) Polyacetylene aus *Pimpinella*-Arten. *Arch Pharm* 303:912-919
- Selva Kumar LS, Thakur MS (2011) Competitive immunoassay for analysis of vitamin B₁₂. *Anal Biochem* 418:238-246
- Shoolingin-Jordan PM (1998) The biosynthesis of vitamin B₁₂: assembly of the tetrapyrrole ring system. In: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT (eds) *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins.* WILEY-VCH, Weinheim, pp 101-118

- Shurtleff W, Aoyagi A (1985) Das Tofu-Buch. Nahrung für alle, 2. Aufl. edn. Ahorn Verlag, Oberbrunn
- Sievers M, Sellmer S, Teuber M (1992) *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in Central Europe. *Syst Appl Microbiol* 15:386-392
- Sievers M, Swings J (2005) Genus 1. *Acetobacter*. In: Brenner DJ, Garrity GM, Krieg NR, Staley JT (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. vol 2: The Proteobacteria, 2 edn. Springer, New York, pp 41-81
- Silva LR, Cleenwerck I, Rivas R, Swings J, Trujillo ME, Willems A, Velazquez E (2006) *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:21-24
- Singh DK, Rao AS, Singh R, Jambunathan R (1988) Amino acid composition of storage proteins of a promising chickpea (*Cicer arietinum* L) cultivar. *J Sci Food Agric* 43:373-379
- Smith EL (1948) Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. *Nature* 161:638
- Smith KA, Paterson JE (1999) Mangan und Cobalt. In: Alloway B (ed) *Schwermetalle in Böden*, vol 2. Springer Berlin Heidelberg, pp 241-263
- Souci SW, Fachmann W, Kraut H (2008) Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen vol 7., revidierte und ergänzte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Stabler SP, Allen RH (2004) Vitamin B₁₂ deficiency as a worldwide problem. *Annu Rev Nutr* 24:299–326
- Stangl GI, Schwarz FJ, Muller H, Kirchgessner M (2000) Evaluation of the cobalt requirement of beef cattle based on vitamin B₁₂, folate, homocysteine and methylmalonic acid. *Br J Nutr* 84:645-653
- Strohecker R, Henning HM (1963) Vitamin-Bestimmungen Erprobte Methoden. vol 1. Verlag Chemie, Weinheim
- Stupperich E, Nexø E (1991) Effect of the cobalt-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B₁₂ binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. *Eur J Biochem* 199:299-303
- Sun J, Chen P (2012) Ultra high-performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry analysis of African mango (*Irvingia gabonensis*) seeds, extract, and related dietary supplements. *J Agr Food Chem* 60:8703-8709
- Sybesma W, Starrenburg M, Tijsseling L, Hoefnagel MHN, Hugenholtz J (2003) Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:4542-4548
- Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant physiology*. 5. international edn. Sinauer Associates, Sunderland
- Tanioka Y, Takenaka S, Furusho T, Yabuta Y, Nakano Y, Watanabe F (2012) Characterization of vitamin B₁₂-related compounds isolated from edible portions of abalone. *Vitamins* 86:390-394 (in Japanese)
- Tanioka Y, Takenaka S, Furusho T, Yabuta Y, Nakano Y, Watanabe F (2014) Identification of vitamin B₁₂ and pseudovitamin B₁₂ from various edible shellfish using liquid chromatography–electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Fisheries Sci* 80:1065-1071
- Taranto MP, Vera JL, Hugenholtz J, De Valdez GF, Sesma F (2003) *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J Bacteriol* 185:5643-5647

- Taylor R, McKenzie R (1966) The association of trace elements with manganese minerals in Australian soils. *Soil Res* 4:29-39
- Thierry A, Deutsch S-M, Falentin H, Dalmaso M, Cousin FJ, Jan G (2011) New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int J Food Microbiol* 149:19–27
- Thierry A, Maillard MB (2002) Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by *Propionibacterium freudenreichii*. *Lait* 82:17-32
- Tiffany M, Fellner V, Spears J (2006) Influence of cobalt concentration on vitamin B production and fermentation of mixed ruminal microorganisms grown in continuous culture flow-through fermentors. *J Anim Sci* 84:635-640
- Tyree RW, Clausen EC, Gaddy JL (1991) The production of propionic acid from sugars by fermentation through lactic acid as an intermediate. *J Chem Technol Biot* 50:157-166
- USDA (2019) Folate content in micrograms per 100 g, All Foods; USDA Food Composition Databases. Release 28 Agricultural Research Service
- van Dusseldorp M, Schneede J, Refsum H, Ueland PM, Thomas CM, de Boer E, van Staveren WA (1999) Risk of persistent cobalamin deficiency in adolescents fed a macrobiotic diet in early life. *Am J Clin Nutr* 69:664-671
- Vanham D, Comero S, Gawlik BM, Bidoglio G (2018) The water footprint of different diets within European sub-national geographical entities. *Nat Sust* 1:518-525
- Veer W, Edelhausen J, Wijmenga H, Lens J (1951) Vitamin B₁₂: I. The relation between vitamins B₁₂ and B_{12b}. *Biochim et Biophys Acta* 6:225-228
- Verma S, Quiroz-Ruiz A (2006) Critical values for six Dixon tests for outliers in normal samples up to sizes 100, and applications in science and engineering. *Revista Mexicana de Ciencias Geologicas* 23:133-161
- Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe.
- Vogelmann SA, Seitter M, Singer U, Brandt MJ, Hertel C (2009) Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Int J Food Microbiol* 130:205-212
- Voigt J, Biehl B, Heinrichs H, Kamaruddin S, Marsoner GG, Hugi A (1994) In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chem* 49:173-180
- Vyas D, McGeough EJ, Mohammed R, McGinn SM, McAllister TA, Beauchemin KA (2014) Effects of *Propionibacterium* strains on ruminal fermentation, nutrient digestibility and methane emissions in beef cattle fed a corn grain finishing diet. *Animal* 8:1807-1815
- Waldmann A, Koschizke JW, Leitzmann C, Hahn A (2003) Dietary intakes and lifestyle factors of a vegan population in Germany: results from the German Vegan Study. *Eur J Clin Nutr* 57:947
- Waldmann A, Koschizke JW, Leitzmann C, Hahn A (2007) Homocysteine and cobalamin status in German vegans. *Public Health Nutr* 7:467-472
- Wang HL, Cavins JF (1988) Yield and amino acid composition of fractions obtained during tofu production. *Cereal Chem* 66

- Wang J, Song H, Wu X, Zhang S, Gao X, Li F, Zhu X, Chen Q (2018) Steroidal saponins from *Vernonia amygdalina* Del. and their biological activity. *Molecules* 23:579
- Wang N, Hatcher DW, Tyler RT, Toews R, Gawalko EJ (2010) Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Res Int* 43:589-594
- Weißenborn A, Bakhiya N, Demuth I, Ehlers A, Ewald M, Niemann B, Richter K, Trefflich I, Ziegenhagen R, Hirsch-Ernst KI, Lampen A (2018) Höchstmengen für Vitamine und Mineralstoffe in Nahrungsergänzungsmitteln. *J Verbrauch Lebensm*
- Whitehead DC (2000) Micronutrient cations: iron, manganese, zinc, copper and cobalt. In: *Nutrient elements in grassland: soil-plant-animal relationships* CAB International, Wallingford, pp 220-254
- Wold S, Sjöström M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr Intell Lab* 58:109-130
- Wright JR, Lawton K (1954) Cobalt investigations on some Nova-Scotia soils. *Soil Sci* 77:95-105
- Wu W, Williams WP, Kunkel ME, Acton JC, Huang Y, Wardlaw FB, Grimes LW (1996) Amino acid availability and availability-corrected amino acid score of red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agr Food Chem* 44:1296-1301
- Ye K, Shijo M, Miyano K, Shimizu K (1999) Metabolic pathway of *Propionibacterium* growing with oxygen: enzymes, ¹³C NMR analysis, and its application for vitamin B₁₂ production with periodic fermentation. *Biotechnol Prog* 15:201-207
- Yi S, Seth EC, Men YJ, Stabler SP, Allen RH, Alvarez-Cohen L, Taga ME (2012) Versatility in corrinoid salvaging and remodeling pathways supports corrinoid-dependent metabolism in *Dehalococcoides mccartyi*. *Appl Environ Microbiol* 78:7745-7752
- Young VR, Pellett PL (1994) Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am J Clin Nutr* 59:1203S-1212S
- Zarkadas CG, Gagnon C, Poysa V, Khanizadeh S, Cober ER, Chang V, Gleddie S (2007) Protein quality and identification of the storage protein subunits of tofu and null soybean genotypes, using amino acid analysis, one- and two-dimensional gel electrophoresis, and tandem mass spectrometry. *Food Res Int* 40:111-128
- Zelazny E, Vert G (2015) Regulation of iron uptake by IRT1: endocytosis pulls the trigger. *Mol Plant* 8:977-979
- Zhang Y, Rodionov DA, Gelfand MS, Gladyshev VN (2009) Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B₁₂ utilization. *BMC Genomics* 10
- Zhu X (2013) Vitamin B₁₂ production during tofu fermentation by *Lactobacillus reuteri* and *Propionibacterium freudenreichii*. Dissertation, Universität Hamburg

6 Anhang

6.1 Formeln

6.1.1 Berechnung der Wiederfindungsrate

$$\text{Wiederfindungsrate [\%]} = \frac{G_{erm}}{G_{Soll}} \times 100$$

G_{erm} :	ermittelter Gehalt
G_{Soll} :	theoretischer Gehalt
100:	Faktor zur Prozentangabe

6.1.2 Ausreißertest nach Dean Dixon

$$PG = \frac{|x_a - x_b|}{|x_{max} - x_{min}|}$$

PG :	Prüfgröße
x_a :	Messwert unter Ausreißer Verdacht
x_b :	nächstgelegener Messwert zu x_a
x_{max} :	höchster Messwert
x_{min} :	niedrigster Messwert

6.1.3 Test auf Normalverteilung nach David

$$PG = \frac{R}{s}$$

PG :	Prüfgröße
R :	Spannweite
s :	Standardabweichung

Anschließend wurde die Prüfgröße mit dem Tabellenwert für kritische Grenzen des Quotienten R/s (Hedderich 2018) verglichen und im Fall von Tabellenwert für das untere Quantil $< PG <$ Tabellenwert für das obere Quantil von einer Normalverteilung der Stichprobe ausgegangen.

6.1.4 Vergleich zweier Varianzen (F-Test):

$$PG = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ mit } df_1 = n_1 - 1 \text{ und } df_2 = n_2 - 1$$

PG :	Prüfgröße
s_1^2	Varianz der Stichprobe 1
s_2^2 :	Varianz der Stichprobe 2
df_1 :	Freiheitsgrad der Stichprobe 1
df_2 :	Freiheitsgrad der Stichprobe 2
n_1 :	Stichprobenumfang 1
n_2 :	Stichprobenumfang 2

Anschließend wurde die Prüfgröße mit dem Tabellenwert ($F_{df_1, df_2; 1-\frac{\alpha}{2}}$) (Hedderich 2018) verglichen und im Fall von $PG <$ Tabellenwert von homogenen Varianzen ausgegangen.

6.1.5 Vergleich der Mittelwerte (t-Tests)

$$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Q_x :	Summe der Abweichungsquadrate
x_i	Messwerte der Stichprobe
\bar{x} :	Mittelwert von n Messwerten

für unabhängige Stichproben homogener Varianz

$$PG = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \cdot \left(\frac{Q_{x1} + Q_{x2}}{n_1 + n_2 - 2}\right)}} \quad \text{mit } df = n_1 + n_2 - 2$$

PG :	Prüfgröße
\bar{x}_1	Mittelwert der Stichprobe 1
\bar{x}_2 :	Mittelwert der Stichprobe 2
FG :	Freiheitsgrade
n_1 :	Stichprobenumfang 1
n_2 :	Stichprobenumfang 2
Q_{x1} :	Summe der Abweichungsquadrate der Stichprobe 1
Q_{x2} :	Summe der Abweichungsquadrate der Stichprobe 2

für abhängige Stichproben

$$PG = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{Q_d}{n \cdot (n-1)}}} \quad \text{mit } df = n - 1 \text{ und } d_i = x_i - y_i$$

PG: Prüfgröße

\bar{d} Mittelwert der Paardifferenzen d_i

x_i, y_i : Messwerte der paarweise angeordneten Messreihen

df : Freiheitsgrade

n : Anzahl der Messwertpaare

Q_d : Summe der Abweichungsquadrate der Paardifferenzen

Anschließend wurde die Prüfgröße mit dem Tabellenwert (Hedderich 2018) verglichen und im Fall von $PG > \text{Tabellenwert} (t_{df;1-\frac{\alpha}{2}})$ von einem Unterschied zwischen den untersuchten Messreihen ausgegangen.

6.2 Ergänzende Daten zur Modelberechnung:

Tabelle 15: Kenndaten zu den ANOVAs

Vitamin B ₁₂	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	16	290046,0	18127,9			
Constant	1	284622,0	284622,0			
Total corrected	15	5423,8	361,6			19,015
Regression	5	4238,8	847,8	7,154	0,004	29,116
Residual	10	1185,0	118,5			10,886
Lack of Fit (Fehlanpassung)	2	225,0	112,5	0,938	0,431	10,607
Pure error (Reiner Fehler)	8	960,0	120,0			10,955

Extrakt-Ausbeute	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	32	98616,7	3081,8			
Constant	1	93506,5	93506,5			
Total corrected	31	5110,2	164,8			12,839
Regression	5	4945,4	989,1	155,995	0	31,450
Residual	26	164,9	6,3			2,518
Lack of Fit (Fehlanpassung)	2	13,9	7,0	1,106	0,347	2,638
Pure error (Reiner Fehler)	24	150,9	6,3			2,508

6.3 Ergänzende Daten zur Suche orthologer Proteine

Tabelle 16: Liste der mittels BlastKOALA gefundenen orthologen Biosyntheseproteine nach Roessner et al. (2002) und der Vitamin-B₁₂-abhängigen Enzyme nach Kräutler und Ostermann (2003).

Protein	<i>Acetobacter pasteurianus</i> ssp. <i>ascendens</i> LMG1590	<i>Acetobacter pasteurianus</i> ssp. <i>pasteurianus</i> SRCM 101468
HemB	+	+
HemC	+	+
HemD	+	+
CobA	+	+
CobI	+	+
CobG	+	+
CobJ	-	-
CobM	+	+
CobF	-	-
CobK	+	+
CobL	+	+
CobH	+	+
CobB	+	+
CobNST	+	+
CobO	+	+
CobQ	+	-
CobC	+	+
CobD	+	+
CobP	+	+
CobV	+	+
CobU	+	+
EutB+C	+	+
MetE	+	+
MetH	+	+
B ₁₂ -abhängige Ribonucleotidreduktase	+	+

6.4 Auflistung der verwendeten Chemikalien und Gefahrenstoffe nach GHS (Gefahrensymbole, H- und P-Sätze)

Tabelle 17: Verwendete Chemikalien mit Sicherheitshinweisen

Chemikalie	Hersteller	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
α-Amylase	Sigma Aldrich	08	334	261-342+311
Agarose	Merck	-	-	-
Ameisensäure	Merck	02, 05, 06	226-302-314-331- EUH071	210-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338-403- 233
Betain	Merck	-	-	-
Cobalt(II)-chlorid	Merck	07, 08, 09	302-317-334-341- 350i-360F-400-410	201-273-280- 302+352-304+340- 342+311
Cyanocobalamin	Sigma Aldrich	-	-	-
Dikaliumhydrogen- phosphat	Roth	-	-	-
Essigsäure	Roth	02, 05	226-314	280- 301+330+ 331- 307+310- 305+351+338
Ethanol	Roth	02, 07	225-319	210-240- 305+351+338- 403+233
Folsäure	Acros	-	-	-
Fruktose	Merck	-	-	-
Galaktose	Merck	-	-	-
Glukose	Roth	-	-	-
Glycerin	Fluka	-	-	-
Hefeextrakt	Roth	-	-	-
Glucose	Roth	-	-	-
Kaliumcyanid	Merck	06, 09	300+310+330-410- EUH032	273-280-302+352- 304+340-309+310
Kaliumdihydrogen- phosphat	Merck	-	-	-
Kaliumhexa- cyanoferrat-(II)- Trihydrat	Roth	-	412	273

Fortsetzung der Tabelle 17

Chemikalie	Hersteller	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Riboflavin	Roth	-	-	-
<i>Lactobacilli</i> Bouillon AOAC	Becton Dickinson	-	-	-
Malzextrakt Agar Nr.2	VWR International	-	-	-
Mannitol	Merck	-	-	-
Metaphosphorsäure	Roth	05	314	280-305+351+338- 310
Methanol	VWR	02, 06, 08	225-331-311-301- 370	210-233-280- 302+352-304+340- 308+310-403+235 280-305+351+338
Milchsäure	Roth	05	315-318	
MRS Bouillon	Roth			
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck	-	-	-
Natriumascorbat	Sigma Aldrich	-	-	-
Natriumchlorid	Roth	-	-	-
Natriumdihydrogen- phosphat	Merck	-	-	-
Natriumhydroxid	Roth	05	290-314	280-301+330+331- 305+351+338- 308+310
Natriumlactat (50 %ig)	Merck	-	-	-
Pankreatin	Merck	07, 08	315-317-319-334- 335	280-302+352- 304+341-342+311- 305+351+338
Pepsin	Sigma Aldrich	07, 08	315-319-335-334	261-280-284- 302+352- 305+351+338- 342+311
Polysorbat 80	Sigma Aldrich	-	-	-
Propionsäure	Roth	02, 05, 07	226-314-335	210-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310
Riboflavin	Roth	-	-	-
Salpetersäure	Merck	03, 05, 06	272-290-330-314- 318-EUH071	221-280- 301+330+331
Salzsäure	Merck	05, 07	290-314-335	260-305+351+338- 303+361+353- 304+340+310- 309+311-501

Fortsetzung der Tabelle 17

Chemikalie	Hersteller	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Schwefelsäure	Roth	05	290-314	280-301+330+331-305+351+338-308+310
Sojapepton	Merck	-	-	-
Vitamin-B9-Testbouillon	Becton Dickinson	-	-	-
Vitamin-B12-Testbouillon	Merck	-	-	-
Zinkulfat-Heptahydrat	Roth	05,07,09	302-318-400-410	273-280-305+351+338-313

Quelle: IFA, GESTIS-Stoffdatenbank, <http://gestis.itrust.de/>, letzter Zugriff: 26.6.2019

6.5 Proben

Tabelle 18: Verwendetes Probenmaterial

Probenbezeichnung	Bezugsquelle
Adzukibohne	Davert GmbH, Ascheberg, Deutschland
Alfalfa	Rapunzel Naturkost GmbH, Legau, Deutschland
Anis	Hartkorn Gewürzmühlen GmbH, Koblenz, Deutschland
Aubergine	Einzelhandel
Avocado	Einzelhandel
Bambussprossen	Einzelhandel
Bitterblätter (Lieferant 1)	Key Formation Ltd., Vereinigtes Königreich
Bitterblätter (Lieferant 2)	Importeur Asia Express Food, Kampen, Niederlande (Ursprungsland: Ghana)
Blaumohnsamen	Bohlsener Mühle GmbH & Co. KG, Bohlsen, Deutschland
Blumenkohl	Einzelhandel
Blumenkohlblätter	Einzelhandel
Buchweizen	Bohlsener Mühle GmbH & Co. KG, Bohlsen, Deutschland
Buschmangokerne	Fola Foods B.V., Niederlande
Dattel	Einzelhandel
Dillspitzen	Ostmann Gewürze GmbH, Osnabrück, Deutschland
Erdbeeren	Einzelhandel
Gartenbohne	Davert GmbH, Ascheberg, Deutschland

Fortsetzung der Tabelle 18

Probenbezeichnung	Bezugsquelle
Gartenerbse	Bohlsener Mühle GmbH & Co. KG, Bohlsen, Deutschland
Gemüsefenchel	Einzelhandel
Haselnusskerne	Einzelhandel
Haselnusschalen	Einzelhandel
Honigmelone	Einzelhandel
Kakaonibs (fermentiert)	Barry Callebaut, Lebbeke, Belgien
Kakaonibs (unfermentiert)	Barry Callebaut, Lebbeke, Belgien
Kakaotesta	Forastero Bean – ACCR Indonesia Cofe and Cocoa Research Center, Jember East Java
Kichererbse	Horst Bode Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
Knollensellerie	Einzelhandel
Knollensellerieblätter	Einzelhandel
Koriander (gemahlen)	Kräutermühle GmbH, Kölleda, Deutschland
Kressesamen	Rapunzel Naturkost GmbH, Legau, Deutschland
Kreuzkümmel	Hartkorn Gewürzmühlen GmbH, Koblenz, Deutschland
Kümmel	Ostmann Gewürze GmbH, Osnabrück, Deutschland
Kürbiskerne	Bohlsener Mühle GmbH & Co. KG, Bohlsen, Deutschland
Leinmehl	Peters Ölmühle, Ballrechten, Deutschland
Leinsamen	Bohlsener Mühle GmbH & Co. KG, Bohlsen, Deutschland
Liebstöckel (gemahlen)	Kräutermühle GmbH, Kölleda, Deutschland
Linse	Horst Bode Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
Mangold (Stiel)	Einzelhandel
Mangoldblätter	Einzelhandel
Melonensamen	Halleluyah Fame Co. Ltd., Ashaiman, Ghana
Mungbohne	Davert GmbH, Ascheberg, Deutschland
Okara	TOFUTOWN.com GmbH, Wiesbaum, Deutschland
Okra	F. Sheriff Import, Amsterdam, Niederlande
Paprika	Kräutermühle GmbH, Kölleda, Deutschland
Paranüsse	Rapunzel Naturkost GmbH, Legau, Deutschland

Fortsetzung der Tabelle 18

Probenbezeichnung	Bezugsquelle
Petersilie	Kräutermühle GmbH, Kölleda, Deutschland
Pfeffer schwarz (gemahlen)	Kräutermühle GmbH, Kölleda, Deutschland
Quinoa (rot)	Alnatura GmbH, Bickenbach, Deutschland
Reis	Horst Bode Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
Reis (fein gemahlen)	Horst Bode Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
Reis (grob gemahlen)	Horst Bode Import-Export GmbH, Hamburg, Deutschland
Rillenkürbis (Samenschale)	Universität Hamburg, Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Loki-Schmidt-Haus
Rillenkürbis (trocken)	Universität Hamburg, Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Herbarium Hamburgense
Rillenkürbisblätter (Lieferant 1)	Key Formation Ltd., Vereinigtes Königreich
Rillenkürbisblätter (Lieferant 2)	Importeur Asia Express Food, Kampen, Niederlande (Ursprungsland: Nigeria)
Rillenkürbissamen	Universität Hamburg, Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie, Loki-Schmidt-Haus
Rispenhirse	Bohlsener Mühle GmbH & Co. KG, Bohlsen, Deutschland
Rohkakao "Crusty layer"	Lagerhalter, Hamburg
Rohkakao (Probentiefe: 1,5-2,5 m)	Lagerhalter, Hamburg
Rote Beete	Einzelhandel
Rotkohl	Einzelhandel
Sojabohne (geschält)	AG Bisping, Universität Hamburg
Sojabohne (ungeschält)	AG Bisping, Universität Hamburg
Staudensellerie	Einzelhandel
Staudensellerieblätter	Einzelhandel
Süßkartoffel	Einzelhandel
Süßlupinenmehl	Govinda Natur GmbH, Neuhofen, Deutschland
Tofusorte 1	Tofutown.com GmbH, Wiesbaum, Deutschland
Tofusorte 2	Berief Feinkost GmbH, Beckum, Deutschland
Weißkohl	Einzelhandel
Zucchini	Einzelhandel
Zuckererbse	Einzelhandel

6.6 Geräte

Tabelle 19: Verwendete Geräte mit Kenndaten

Gerätebezeichnung	Kenndaten
Anaerobentopf GasPak	BBL, GasPak Anaerobic Systems, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius BP 211 D, Maximalgewicht: 210 g, Genauigkeit: 0,01 mg (80 g), 0,1 mg (210 g), Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Tuttnauer 5075 ELV, Tuttnauer, Breda, Niederlande Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer, Breda, Niederlande
Brutschränke	Heareus Typ B5060, Heareus, Hanau; Deutschland Heraeus Typ B5050, Heareus, Hanau; Deutschland
Dispenser	Dispensette® III Easy Calibration 1 – 10 mL, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Fermenter	Labfors 2 mit Doppelmantelglasgefäß (Füllvolumen 1,2 L), Infors, Bottmingen, Schweiz Schlauchpumpe, Watson-Marlow 520 U/R, Watson-Marlow, Wilmington, MA, USA Techfors-S, Infors, mit Edelstahl-Doppelmantelgefäß (Füllvolumen 30 L) Bottmingen, Schweiz Dampferzeuger 21.200.10, PTS Marquardt, Pulheim, Deutschland
Gefriertruhe	Liebherr Premium GTP 4726 (-28 °C), Liebherr-International, Biberach an der Riß, Deutschland
Grobwaage	Kern PB 4000-2, Maximalgewicht: 4,1 kg, Genauigkeit: 0,01 g, Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland
HPLC	Anlage 1 Entgaser: ERC 3512 Erma, Tokyo, Japan Pumpe: L-6200, Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland Autosampler: AS-2000A, Merck Hitachi Säulenofen: L-7350, LaChrom, Merck RI-Detektor: L-7490, LaChrom, Merck Anlage 2 Entgaser: HPLC Degasser 2004 VWR, Darmstadt, Deutschland Pumpe: L-7100, LaChrom Merck Hitachi Autosampler: L-7250, LaChrom Merck Hitachi Interface: D-7000, LaChrom, Merck DAD-Detektor: L-7455, LaChrom, Merck Anlage 3 Termo Scientific System: Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland Massenspektrometer: Bruker maXis 3G QTOF, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland

Gerätebezeichnung	Kenndaten
ICP-MS	Agilent Technologies 7700 Series ICP-MS , Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland ASX-500 Series ICP-MS Autosampler, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Kühlschränke	Bosch automatic HEW 1403019 (4 °C), Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland Liebherr KO 3120 Economy (4 °C), Liebherr-International, Biberach an der Riß, Deutschland
Kolbenhubpipetten	10 – 100 µL; 100 – 1000 µL, Pipetman Classic, Gilson Inc, Middleton, USA
Kolbenhubpipette (mehrkanal)	5 – 100 µL; 15 – 300 µL, Xplorer® plus, 8-Kanal, variabel, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lyophilie (Gefriertrocknungsanlage)	Lyophilie: Alpha 1-4, Gefriertrocknungsanlage, Martin Christ, Osterode am Harz, Deutschland Vakuumpumpe: RZ 2.5, Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Magnetrührgerät	Heidolph MR 3001, Typ MR 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axiostar plus 1169-151, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer	ELx808, BioTek Instruments, Winooski, USA
Mühle	Ultra-Zentrifugalmühle ZM 100, Retsch, Haan, Germany
pH-Meter	Mettler Toledo Five Easy plus, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz
Rotationsschüttler	Stuart rotator SB3, Staffordshire, United Kingdom
Rotationsverdampfer	Verdampfer: Hei-Vap Advantage G3, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland Vakuumpumpe: PC 511NT CVC 3000, Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Schüttelwasserbad	Gyrotory Water Bath Shaker, Model G 76, New Brunswick Scientific, Edison (N.J.), USA
Spülmaschine	Miele Professional G7883 Miele, Gütersloh, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus Typ HS 12, Heraeus, Hanau, Deutschland
Stomacher	Stomacher Lab-Blender 400, Seward Laboratory, London, Großbritannien
Trockenschrank	Heraeus Instruments Typ T6120, Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallbad	Elma S 30 H, Elma GmbH & Co. KG, Singen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q ^{plus} Ultra pur Water System, Millipore SA, Molsheim, Frankreich
Wasserbad	Köttermann Typ 3042, Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, Deutschland

Fortsetzung der Tabelle 19

Gerätebezeichnung	Kenndaten
Zählkammer	Helber, Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Varifuge R3.OR, Heraeus, Hanau, Deutschland Eppendorf Mini Spin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Biofuge pico, Heraeus, Hanau, Deutschland

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mir bei der Verwirklichung meiner Promotion geholfen haben.

Allem voran möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping danken, der mir das spannende, anwendungsnahe Thema und die Infrastruktur seiner Abteilung für die Durchführung der Promotion zur Verfügung gestellt hat. Ich bin froh, dass ich an seinem Wissen, seiner Erfahrung und seinem Forschergeist teilhaben durfte und bedanke mich für seine Unterstützung, die mir in der Zeit der Promotion zugekommen ist.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Markus Fischer für die Übernahme des Zweitgutachtens und die großzügig zur Verfügung gestellten Messgeräte.

Besonders danken möchte ich zudem Herrn PD Dr. Zhu Xuan, der mein Interesse an der Vitaminforschung geweckt hat. Ebenso möchte ich David Schütz danken. Er hat mich in die Methodik der Strukturbestimmung eingewiesen und stand mir dabei immer mit Rat und Tat zur Seite.

Zudem möchte ich Frau Marina Creydt und Frau Bernadett Richter für die tatkräftige Unterstützung bei der Analytik der Schwermetalle und die gute Zusammenarbeit danken.

Desweiteren bedanke ich mich bei meinen Kollegen Corina Noll, Nicole Illas, Matthieu Nourrisson sowie Claudia und Dominik Bahmann, die entscheidend an der Entstehung der Arbeit mitgewirkt haben. Ebenso möchte ich meinen Studenten Benjamin Klein, Valentina Häusser, Stefan Kreidt, Jonas Klein, Helge Muschiol, Oliver Wagner, Agatha Segieda und Hanna Balster für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die tolle gemeinsame Zeit bedanken. Jeder von euch hat seinen speziellen Beitrag dazu geleistet, mich in meiner Promotion voranzubringen.

Ein persönliches und besonders großes Dankeschön geht an meine Familie und Freunde. Ihr wisst, dass ich ohne euch diesen Weg nicht hätte gehen können. Ich bin froh, dass ihr stets an mich geglaubt habt und ich mich jederzeit auf euch verlassen kann –

Danke!

8 Eidesstattliche Versicherung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Datum, Unterschrift