

**Grundlegende Untersuchungen zur mikrobiellen
Synthese von Vitamin B₁₂ in symbiotischen pflanzlichen
Systemen am Beispiel der *Frankia*.**

**Entwicklung neuartiger pflanzlicher Extrakte mit hohem
essentiellen Vitamin B₁₂-Gehalt**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Chem. Olga Aleksandrovna Kysil

geboren am 1. Juni 1982, in Kiew

Hannover 2014

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Dr. Ing. Ralf Günter Berger

Tag der Promotion: 10. Dezember 2013

Basenka, Ninel, Irinka, Nadenka und Njusha in grenzenloser Liebe gewidmet

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 1. Januar 2010 bis 31. Dezember 2011 am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper und in Kooperation mit der Firma Teutopharma GmbH, im Rahmen des Forschungsprojektes “Untersuchung der Synthese pflanzlicher Wirkstoffe in symbiotischen Vegetationssystemen“, durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper sowie Frau Helga Pandalis und Herrn Dr. Georgios Pandalis für die Bereitstellung des interessanten Themas, die wissenschaftliche Betreuung der durchgeführten Arbeiten und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. Ing. Ralf Günther Berger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Prof. Dr. Ursula Rinas danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bei der mündlichen Prüfung.

Herrn Dr. Beutel danke ich für das kompetente wissenschaftliche Engagement beim Zusammenstellen dieser Arbeit und das Korrekturlesen.

Ich danke dem gesamten Team des Instituts für Technische Chemie für die lehrreiche gemeinsame Zeit, die mich sehr geprägt hat und kaum zu vergessen ist.

Der Firma Teutopharma GmbH möchte ich an dieser Stelle nochmals danken für den unerschöpflichen Ideenreichtum. Ich wünsche Ihnen weiterhin viel Erfolg und viele fruchtbare Ideen bei der Etablierung eines der innovativsten phytopharmakologischen Unternehmen im deutschsprachigen Raum.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Ninel Kysil, meiner Schwester Nadenka Kysil und meiner Tochter Renata. Ohne Eure Liebe, Eure Wärme und grenzenlosen Unterstützung, wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Herrn Dr. Jan Wriedt danke ich insbesondere für die richtigen, ermutigenden Worte und moralische Unterstützung.

Kurzfassung

Vitamin B₁₂ stellt eine Gruppe aktiver Cobalamin-Formen dar, die ausschließlich mikrobiell synthetisiert werden können. Tierische Produkte weisen einen hohen Gehalt an aktivem Vitamin B₁₂ auf, dagegen in mikrobiell fermentierten pflanzlichen Produkten liegt das Vitamin nur in Spurenkonzentrationen vor. Mit Cobalaminen angereicherte, symbiotische, pflanzliche Nahrungsmittel, wie Algen, enthalten einen hohen Gehalt an inaktiven Cobalaminen, darunter auch Vitamin B₁₂-Analoge, die beim fortgeschrittenen Vitamin B₁₂-Mangel heimtückisch sein können. Aufgrund der modernen vegetarischen und veganen Ernährung nahm das Interesse zum natürlich vorkommenden pflanzlichen Vitamin B₁₂ in den letzten Jahrzehnten zu. Das kommerziell erhältliche Vitamin B₁₂ ist das Cyanocobalamin, das die stabilste Form der aktiven Cobalamine darstellt. Dieses wird durch mikrobielle Fermentation und anschließende Derivatisierung mit dem stark toxischen Kaliumcyanid hergestellt. Im industriellen Maßstab werden für die Vitamin B₁₂-Herstellung Mikroorganismen verwendet, die in der Regel der Gattung *Pseudomonas*, *Methanobacteria*, *Propionibacteria*, oder *Bacillus* angehören.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier unterschiedliche Vitamin B₁₂-Nachweismethoden (MBA, ELISA und RP-HPLC nach vorheriger Probenaufreinigung mittels SPE sowie IAC-SPE) mit einander verglichen und auf ihre Anwendbarkeit auf pflanzlichen Matrices geprüft. Eine Standard-Methode zur Extraktion und Aufkonzentrierung des Vitamin B₁₂ aus pflanzlichen Extrakten mittels IAC-SPE, gefolgt von seiner Quantifizierung mittels RP-HPLC, wurde etabliert.

Sanddorn und sein Symbiont *Frankia alni* wurden als Model für mikrobielle Vitamin B₁₂-Synthese im symbiotischen Vegetationssystem verwendet. Das in vitro-Wachstum der *Frankia* sowie ihre Vitamin B₁₂-Synthese in Abhängigkeit der Kobalt- und der 5,6-Dimethylbenzimidazol-Konzentration wurde untersucht. Der mittlere Vitamin B₁₂-Gehalt im Sanddorn wurde bestimmt.

Im Anschluss wurde der Vitamin B₁₂-Gehalt in urheimischen europäischen Pflanzen, wie Weißkohl, Sanddorn und Giersch, nach malolaktischer Fermentation sowie Fermentation mittels *Bacillus megaterium*, bestimmt. Eine neue Methode zur Anreicherung von Vitamin B₁₂ im Weißkohl nach der Fermentation mit *Bacillus megaterium* und in Anwesenheit der *Spirulina platensis*, die einen hohen Gehalt an nicht aktiven Cobalamin-Formen enthält, wurde erzielt. Die Erhöhung des Vitamin B₁₂-Gehaltes konnte im verdünnten Sanddornsafte nach der Fermentation mit *Bacillus megaterium* und unter Zusatz von 5,6-Dimethyl-benzimidazol erzielt werden.

Stichworte: Vitamin B₁₂, 5,6-Dimethylbenzimidazol, *Frankia alni*

Abstract

Vitamin B₁₂ composes a group of active forms of cobalamin, which are synthesized by microbiological fermentation alone. Due to the symbiosis a high amount of active vitamin B₁₂ occurs in animal products, in contrast some microbiological fermented plant foods bear only trace amounts of vitamin B₁₂. Nutritional symbiotic plant products enriched with cobalamins, e.g. algae, contain a high amount of inactive cobalamin, beneath inactive analogues of vitamin B₁₂, which can be malicious at the sophisticated stage of vitamin B₁₂ deficit. In the last decades much more attention has been paid to the natural vitamin B₁₂ of plant origin, due to the modern vegetarian and vegan nutrition. The cyanocobalamin presents the most stable form of active cobalamins and is usually the commercially available form of vitamin B₁₂, which has been generated by microbiological fermentation, followed by a derivatization by a highly toxic potassium cyanide. Those microorganisms of the genera *Pseudomonas*, *Methanobacteria*, *Propionibacteria*, or *Bacillus* are widely used for the synthesis of vitamin B₁₂ in industrial scale.

In the present thesis four different vitamin B₁₂ assay methods (MBA, ELISA, and RP-HPLC after the purification of the samples via SPE and IAC—SPE) were compared in respect of their applicability to the plant matrices. A standard method for the extraction and concentration of cyanocobalamin of plant origin was established by IAC-SPE, followed by his quantification via RP-HPLC.

Sea buckthorn and its symbiont *Frankia alni* was used as a model for a symbiotic plant system and its microbial vitamin B₁₂ synthesis. The effect of the different concentrations of cobalt ions and 5,6-dimethylbenzimidazole on the bacterial growth as well as production of vitamin B₁₂ of *in vitro* culture of *Frankia* was investigated. The average content of active vitamin B₁₂ in the sea buckthorn was estimated.

In conclusion the vitamin B₁₂ content was estimated in classical european plants (white cabbage, sea buckthorn, ground elder) after malolactic fermentation and fermentation with *Bacillus megaterium*. A new method for enrichment of vitamin B₁₂ in white cabbage was obtained after fermentation with *Bacillus megaterium* and in presence of *Spirulina platensis*, which has a high content of not active cobalamin forms. An increase of content of vitamin B₁₂ could be obtained in the diluted juice of sea buckthorn after the fermentation with *Bacillus megaterium* in presence of 5,6-dimethylbenzimidazole.

Keywords: Vitamin B₁₂, 5,6-dimethylbenzimidazole, *Frankia alni*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Cobalamine und Vitamin B₁₂	4
2.1.1 Chemische Struktur des Vitamin B ₁₂ und seiner Analoga.....	4
2.1.2 Spaltung und Absorption von Vitamin B ₁₂ im menschlichen Organismus und sein Vorkommen in Nahrungsmitteln.....	5
2.1.3 Industrielle Herstellung von Vitamin B ₁₂	7
2.2 Sanddorn	9
2.3 <i>Frankia</i> sp.	12
2.3.1 Die Rolle des Kobalts bei mikrobieller Stickstofffixierung und Symbiose der Knöllchenbakterien.....	15
3 Experimenteller Teil	19
3.1 Analytische Methoden zum Nachweis von Vitamin B₁₂	19
3.1.1 Mikrobiologische und immunologische Nachweis von Vitamin B ₁₂	20
3.1.1.1 Der mikrobiologische Nachweis.....	20
3.1.1.2 Enzymimmunoassay.....	23
3.1.2 Der Nachweis von Vitamin B ₁₂ mittels RP-HPLC.....	26
3.1.2.1 Festphasenextraktion (SPE).....	27
3.1.2.2 Immunoaffinitätschromatographische Festphasenextraktion (IAC-SPE).....	34
3.1.3 Diskussion.....	37
3.2 Mikrobielle Produktion von Vitamin B₁₂ in <i>Frankia alni</i>	40
3.2.1 Isolierung der <i>Frankia</i> sp., Einfluss unterschiedlicher biotischer Faktoren auf deren Wachstum und Cobalamin-Produktion.....	40

3.2.1.1 Isolierung der <i>Frankia sp.</i> aus den Wurzelknollen des Sanddorns.....	40
3.2.1.2 Kobalt-Gehalt des Bodens und in der Sanddorn-Pflanze.....	45
3.2.1.3 Auswirkungen der Kobaltkonzantration und der Schüttelgeschwindigkeit auf das Wachstum der <i>Frankia</i>	46
3.2.1.4 Die Cobalamin-Produktion in <i>Frankia</i> in Abhängigkeit von der Kobalt- und Dimethylbenzimidazol-Konzentration	49
3.2.1.5 Einfluss des Vitamin B ₁₂ auf das Wachstum der <i>Frankia sp.</i>	53
3.2.1.6 Der Vitamin B ₁₂ -Gehalt in Sanddorn.....	56
3.2.2 Diskussion	57
3.3 Vitamin B₁₂-Produktion bei mikrobieller Fermentation pflanzlicher Feststoffe ..	62
3.3.1 Vitamin B₁₂-Gehalt in fermentierten pflanzlichen Lebensmitteln.....	63
3.3.1.1 Mikrobielle Vergärung von Weißkohl mittels <i>B. megaterium</i> und ausgewählter malolaktischer Starterkulturen	63
3.3.2 Vitamin B ₁₂ -Produktion in mikrobiell fermentierten pflanzlichen Feststoffen unter Zusatz von <i>Spirulina platensis</i>	65
3.3.2.1 Vitamin B ₁₂ -Produktion bei mikrobieller Fermentation des Weißkohls mit <i>Spirulina platensis</i> Mikroalgen	65
3.3.2.2 Einfluss des <i>Spirulina</i> -Extraktes auf das Wachstum von <i>Frankia alni</i> im flüssigen Medium und ihre Vitamin B ₁₂ -Produktion.....	67
3.3.2.3 Vitamin B ₁₂ -Produktion bei der Fermentation von Giersch und Sanddorn-Saft mit <i>B. megaterium</i> unter Zusatz von DMI	69
3.3.3 Diskussion	71
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	73
5 Anhang	80
5.1 Nachweis von Vitamin B₁₂	80
5.1.1 Extraktion von Cyanocobalamin aus pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln.....	80
5.1.2 Extraktion des intrazellulären Cyanocobalamins aus <i>Frankia sp.</i>	81
5.1.3 Herstellung der für die Extraktion verwendeten Lösungen und Puffer.....	81
5.1.3.1 Der Acetat-Puffer	81
5.1.3.2 Die 1 % KCN-Lösung.....	81

5.1.4 Nachweis von Cyanocobalamin mittels RP-HPLC	82
5.1.4.1 Aufreinigung von Cyanocobalamin mittels IAC-SPE	82
5.1.4.2 RP-HPLC-Methode zur Detektion des Cyanocobalamins nach der IAC-SPE-Extraktion	83
5.1.4.3 HPLC-Methode nach der SPE-Aufreinigung.....	84
5.1.5 Der mikrobiologische Nachweis von Vitamin B ₁₂ nach AOAC 952.20	85
5.1.6 Enzymimmunoassay von Vitamin B ₁₂ (ELISA)	90
5.2 Verwendete Medien	91
5.2.1 MRS-Medium, Stammhaltungsmedium für <i>L. lactis</i>	91
5.2.2 Isoliermedien für <i>Frankia sp.</i>	94
5.2.2.1 BAP-Agarmedium	94
5.2.2.2 Stickstoffarmes BAP-Agarmedium	95
5.2.2.3 FM-Agarmedium	95
5.2.2.4 QMod-Agarmedium	96
5.2.2.5 DPM-Agarmedium.....	97
5.2.2.6 Nalidixinsäure-haltige Medien.....	97
5.2.2.7 Cycloheximid (Antimycotikum)-haltige Medien.....	98
5.2.2.8 Isolierungstechniken	98
5.2.3 Stammhaltungsmedium für <i>Frankia sp.</i>	99
5.2.3.1 DPM Medium	99
5.3 Kobalt-Nachweis	100
5.4 Mikrobielle Vergärung.....	101
5.4.1 Vergärung von <i>Spirulina</i> mit <i>B. megaterium</i>	102
5.5 Metabolismus von <i>Frankia sp.</i>.....	103
5.6 Geräte	105
5.7 Materialien	107
5.8 Chemikalien	109
6 Literaturverzeichnis	111

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Chemische Struktur von Vitamin B ₁₂	4
Abb. 2-2: Die pH-Abhängigkeit der Symbiose zwischen Sanddorn und <i>Frankia</i>	10
Abb. 2-3: Die Beeren eines wildwachsenden Sanddorns auf der ostfriesischen Insel Norderney.	11
Abb. 2-4: Beziehungen zwischen den Pflanzengattungen und den drei <i>Frankia</i> -Clustergruppen 16S rRNA und die grundlegenden Mechanismen der Etablierung der Symbiose.	13
Abb. 2-5: Wurzelknöllchen von <i>Casuarina</i>	13
Abb. 2-6: Typische <i>in vitro</i> Morphologie der <i>Frankia alni</i>	15
Abb. 2-7: Die Struktur des Enzymkomplexes Nitrogenase aus der <i>Azotobacter vinelandii</i>	17
Abb. 3-1: Die Wiederfindung von Cyanocobalamin mittels mikrobiologischen Nachweises nach AOAC 952.20 in jeweils mit 1 µg/100 mL Cyanocobalamin versetzten Rinderfleisch- und Sanddornbeeren-Extrakt im Vergleich zu einer mit 1 µg/100 mL Cyanocobalamin versetzten wässrigen Lösung (Standard).	21
Abb. 3-2: Gegenüberstellung des Wachstumsverhaltens des <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> in Gegenwart von Vitamin C, Quercetin und Chinasäure neben Cyanocobalamin im Kulturmedium.	22
Abb. 3-3: Standard-Extinktionskurve des Immunolab Vitamin B ₁₂ Tests.	24
Abb. 3-4: Wiederfindung von Vitamin B ₁₂ mittels des Immunolab Vitamin B ₁₂ -Tests in reiner wässriger Cyanocobalamin- Lösung, im Fleisch- und Sanddornbeeren-Extrakt.	25
Abb. 3-5: RP-HPLC-Chromatogramm einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung nach der SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und einem methanolischen Stufengradient mit aufsteigender Polarität zur Elution.	28
Abb. 3-6: RP-HPLC-Chromatogramm einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung nach der SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und methanolischem polaren Stufengradienten zur Elution.	29
Abb. 3-7: RP-HPLC-Chromatogramm des mit 0,065 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes nach einer SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und einem Stufengradienten mit steigender Polarität zur Elution.	31
Abb. 3-8: RP-HPLC-Chromatogramm des mit 0,5 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes nach einer SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und einer ACN-haltigen Elution.	33

- Abb. 3-9:** RP-HPLC-Chromatogramm von 100 mL einer 8,5 ng/mL Cyanocobalamin-Lösung nach einer IAC-SPE-Aufreinigung. 35
- Abb. 3-10:** RP-HPLC-Chromatogramm der 100 mL eines mit 0,85 µg Vitamin B₁₂ versetzten Sanddornbeeren-Extraktes nach einer IAC-SPE-Aufreinigung. 36
- Abb. 3-11:** RP-HPLC-Chromatogramme der 100 mL eines mit 0,85 µg Vitamin B₁₂ versetzten Rindfleisch-Extraktes nach einer IAC-SPE-Aufreinigung. 36
- Abb. 3-12:** Morphologie der Sanddorn-Wurzelknöllchen. 42
- Abb. 3-13:** *Frankia*-Kolonien aus der Sanddorn-Wurzelknolle (Sorte Frugana) nach 5-wöchiger Inkubation im Dunkeln bei 28 °C auf dem FM-Agarmedium. 43
- Abb. 3-14:** *Frankia alni* isoliert aus den Sanddorn-Wurzelknöllchen der Kultursorten Frugana, Leikora und aus einer wildlebenden Pflanze. 43
- Abb. 3-15:** Bakterien-Kolonien auf dem FM-Agarmedium mit Cycloheximid isoliert aus den Wurzelknollen unterschiedlicher Sanddorn-Sorten und wildwachsendem Sanddorn. 44
- Abb. 3-16:** Verteilung des Kobalts in der Sanddorn-Pflanze. 46
- Abb. 3-17:** *Frankia sp.* nach vierwöchiger Inkubation in 50 mL DPM-Medium und in einem 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 30 °C. 47
- Abb. 3-18:** Abhängigkeit der Biotrockenmasse der *Frankia sp.* von der Rührgeschwindigkeit und der Konzentration des Kobalt(II)-chlorids im DPM-Suspensionsmedium nach vierwöchiger Inkubation bei 30 °C. 48
- Abb. 3-19:** Kobaltverbrauch durch *Frankia sp.* unter stationären Bedingungen und in einer Schüttelkolbenkultur bei 120 rpm. 48
- Abb. 3-20:** Biotrockenmasse der *Frankia sp.* im DPM-Medium nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit von dem Kobaltverbrauch. 49
- Abb. 3-21:** Einfluss der Co(II)-Konzentration auf den Vitamin B₁₂-Gehalt in *Frankia sp.* nach vierwöchiger Inkubation bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium. 50
- Abb. 3-22:** Einfluss der DMI-Konzentration auf den Vitamin B₁₂-Gehalt in *Frankia sp.* nach vierwöchiger Inkubation bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium mit 2.500 µg/L CoCl₂ · 6 H₂O. 51
- Abb. 3-23:** Cobalamin-Gehalt im Medienüberstand der *Frankia sp.* nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium und unterschiedlichen Kobalt(II)-Konzentrationen. 52
- Abb. 3-24:** Cyanocobalamin-Gehalt im Medienüberstand der *Frankia sp.* nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium mit

2.500 $\mu\text{g/L}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und unterschiedlichen DMI-Konzentrationen.	52
Abb. 3-25: Biotrockenmasse der lyophilisierten <i>Frankia sp.</i> nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium mit 2.500 $\mu\text{g/L}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und unterschiedlichen DMI-Konzentrationen.	53
Abb. 3-26: Biotrockenmasse der <i>Frankia sp.</i> in Abhängigkeit von der Kobalt- und Vitamin B ₁₂ -Konzentration im DPM-Medium nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm.	54
Abb. 3-27: Vitamin B ₁₂ -Konzentrationen in <i>Frankia sp.</i> und im Medienüberstand nach vierwöchiger Kultivierung im DPM-Medium mit Cyanocobalamin-Supplementierung bei 30 °C und 120 rpm.	54
Abb. 3-28: <i>Frankia alni</i> nach 2-wöchiger Kultivierung in DPM-Medium mit 0,5 % (w/v) <i>Spirulina platensis</i> -Extrakt.	67
Abb. 5-1: Beispiel einer Cyanocobalamin-Kalibrationsgerade für <i>L. lactis</i> nach 24 h Inkubation bei 37 °C.	90
Abb. 5-2: Kalibrationsgerade des photometrischen Kobalt-Nachweises.	100
Abb. 5-3: Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus der <i>Frankia</i>	103
Abb. 5-4: Pyruvat-Metabolismus der <i>Frankia</i>	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Vitamin B ₁₂ -Gehalt in einigen Lebensmitteln des täglichen Bedarfs.	7
Tabelle 3-1: Wiederfindung des Cyanocobalamins in Fleisch- und Sanddornbeeren-Proben mittels des Immunolab Vitamin B ₁₂ -Tests.	25
Tabelle 3-2: Arbeits- und Elutionsschritte der SPE-Aufreinigung einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung auf der Strata C18-E SPE-Kartusche und einem methanolischen Stufengradient mit aufsteigender Polarität zur Elution.	27
Tabelle 3-3: Arbeits- und Elutionsschritte der SPE-Aufreinigung einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung auf einer Strata C18-E SPE-Kartusche mit methanolischem polaren Stufengradienten zur Elution.	29
Tabelle 3-4: Arbeits- und Elutionsschritte der Festphasenextraktion eines mit 0,065 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes unter Verwendung einer Strata C18-E SPE-Kartusche und einem Stufengradienten mit steigender Polarität zur Elution.	31
Tabelle 3-5: Arbeits- und Elutionsschritte der Festphasenextraktion eines mit 0,5 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes unter Verwendung einer Strata C18-E SPE-Kartusche und einem Acetonitrilhaltigen Stufengradienten zur Elution.	32
Tabelle 3-6: Ergebnisse der Kobaltbestimmung in der Boden-, Wurzel- und Wurzelknollenprobe des Sanddorns.	45
Tabelle 3-7: Vitamin B ₁₂ -Gehalt im wilden und kultivierten Sanddorn.	56
Tabelle 3-8: Vitamin B ₁₂ -Gehalt in malolaktisch und mit <i>B. megaterium</i> fermentierten Weißkohl im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Sauerkraut.	64
Tabelle 3-9: Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)-Konzentration im mit <i>Spirulina platensis</i> vergorenen Weißkohl.	66
Tabelle 3-10: Biotrockenmasse von <i>Frankia sp.</i> im DPM-Suspensionsmedium mit 5.000 µg/L DMI und 2.500 µg/L CoCl ₂ •6 H ₂ O, Vitamin B ₁₂ -Gehalt in <i>Frankia sp.</i> und Anzahl der Kolonien im DPM-Suspensionsmedium mit und ohne <i>Spirulina</i> -Supplementierung.	68
Tabelle 3-11: Anfangs- und Endwerte für pH, Glukose- und Laktat-Konzentrationen und Vitamin B ₁₂ -Endkonzentrationen nach 7-tägiger Inkubation der mit <i>B. megaterium</i> fermentierten Giersch und des Sanddorn-Saftes.	70
Tabelle 5-1: Gradientbedingungen für die RP-HPLC-Methode mit der Kinetex 2,6 u C18-Säule.	84

Tabelle 5-2: Gradientbedingungen für die RP-HPLC-Methode mit der Gemini-NX C18-Säule von Phenomenex.	85
Tabelle 5-3: Flüssigmedium nach AOAC.	86
Tabelle 5-4: Medien-Zusammensetzung für die Cyanobalamin-Kalibrationsreihe des MBA mit Doppelbestimmung.....	88
Tabelle 5-5: Zusammensetzung der Testmedien für den MBA.	89
Tabelle 5-6: Zusammensetzung des MRS-Mediums, das Stammhaltungsmedium für <i>L. lactis</i>	91
Tabelle 5-7: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung für das MRS-Medium.....	92
Tabelle 5-8: Zusammensetzung des BAP-Agarmediums.	94
Tabelle 5-9: Zusammensetzung der Spurenelementlösung des BAP-Mediums.	94
Tabelle 5-10: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung des BAP-Mediums.	94
Tabelle 5-11: Zusammensetzung der Puffer-Lösung des BAP-Mediums.	95
Tabelle 5-12: Zusammensetzung des FM -Agarmediums.	95
Tabelle 5-13: Zusammensetzung des QMod-Agarmediums.	96
Tabelle 5-14: Zusammensetzung der Spurenelement-Lösung des QMod-Mediums.	96
Tabelle 5-15: Zusammensetzung des DPM-Agarmediums.	97
Tabelle 5-16: Zusammensetzung der Eisen-EDTA-Lösung des DPM-Mediums.	97
Tabelle 5-17: Zusammensetzung der Hoagland's-Spurenelementlösung des DPM-Mediums.	97
Tabelle 5-18: Zusammensetzung des DPM-Mediums für <i>Frankia sp.</i>	99
Tabelle 5-19: Zusammensetzung der Eisen-EDTA-Lösung des DPM-Mediums.	99
Tabelle 5-20: Zusammensetzung der Spurenelementlösung des DPM-Mediums.	99
Tabelle 5-21: Zusammensetzung des MRS-Mediums für milchsäure Bakterien.	101
Tabelle 5-22: Zusammensetzung des Nutrient Agar für das <i>B. megaterium</i>	102

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (m/v)	Massenprozent
[4Fe-4S]-Cluster	4-Eisen-4-Schwefel-Cluster
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
16S rRNA	16 Svedberg ribosomale Ribonukleinsäure
Å	Ångström
AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Abb.	Abbildung
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (AOAC International)
BBM	Brush Border Membrane
CE	Kapillarelektrophorese
cm	Zentimeter
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNS für Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FeMo-Cofaktor	Eisen-Molybdän-Cofaktor
g	Gramm
h	Stunde
ha	Hektar
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
IAC-SPE	Immunoaffinitätschromatographische Festphasenextraktion
ICP-AES	Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IF	Intrinsic Factor
kg	Kilogramm
L	Liter
m	Meter
M	Mol
m ²	Quadratmeter
m ³	Kubikmeter
MBA	Microbiological Assay (Mikrobiologische Nachweis)
mg	Milligramm
MgATP	Magnesium-Adenosintriphosphat
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter

n. d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
o. g.	Oben genannte
OD	Optische Dichte
OES	optische Emissionsspektrometrie
pg	Pikogramm
ppb	Parts per billion
ppm	Parts per million
rel. AU	relative Absorptionseinheit
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
s	Sekunde
SPE	Festphasenextraktion
t	Tonne
u. a.	Unter anderem
UV/Vis	ultraviolettes/sichtbares Licht
vgl.	Vergleiche
Z/mL	Zellen pro Milliliter
σ^2	Varianz

1 Einleitung und Zielsetzung

Cobalamine bilden eine metallorganische Verbindungsklasse und weisen eine hochkomplexe chemische Struktur mit einem chelatierten Kobalt als Zentralatom auf. Der wichtigste Vertreter der Cobalamine, ist das für den menschlichen Organismus essentielle Vitamin B₁₂. Dieses generiert als Co-Enzym im Stoffwechsel höherer Organismen bislang zwei bekannte enzymatische Reaktionen: die Methionin-Synthetase und Methylmalonyl-CoA-Mutase. Diese sind u. a. für die Funktion des Zentralnervensystems, der Zellteilung und der Hämatopoese notwendig. Ein Vitamin B₁₂-Mangel kann zu Schädigungen des Nervensystems und Störungen der Zellteilungs- und Blutbildungsfunktionen führen, in besonders schweren Fällen tritt perniziöse Anämie auf. Zu pharmazeutischen Zwecken wird das künstliche und stabile Cyanocobalamin als Vitamin B₁₂ eingesetzt. Im menschlichen Organismus wird es anschließend in die biologisch aktiven Co-Enzymformen, Adenosyl- und Methylcobalamin, umgewandelt. Aufgrund ihrer ausschließlich mikrobiellen Synthese kommen Cobalamine nur in tierischen Lebensmitteln, vor allem in Fleischprodukten, in ausreichenden Mengen vor. Dabei sollen laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. mindestens 3 µg/Tag Vitamin B₁₂ mit der Nahrung aufgenommen werden. Dabei werden nur die essentiellen und biologisch aktiven Formen der Cobalamine als Vitamin B₁₂ bezeichnet, darunter auch das künstliche Cyanocobalamin. Einem erhöhtem Risiko des Vitamin B₁₂- Mangels sind insbesondere Veganer, Vegetarier sowie Patienten mit Magen-Darm-Fehlfunktion, wie die älteren Bevölkerungsgruppen, ausgesetzt.

Im Zuge moderner Ernährungsgewohnheiten finden unterschiedliche Formen des vegetarischen Lebensstils immer mehr Einzug in das heutige Alltagsleben ein, sodass auch das Verbraucherinteresse und die Nachfrage nach natürlichen pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln mit hohem Vitamin B₁₂-Gehalt in den letzten Jahren stark angestiegen sind.

Einige in symbiotischen Systemen mit Bakterien lebende Pflanzen, aber auch mikrobiell vergorene pflanzliche Lebensmittel, wie Sauerkraut, können Spurenkonzentrationen an essentiellen Cobalamin-Formen aufweisen. Im asiatischen Raum werden traditionell spezielle Algen, wie *Spirulina* als eine Cobalamin-Quelle

verwendet, dieser Trend setzt sich zunehmend auch in Europa fort. Zwar weisen diese mit Cyanobakterien in Symbiose assoziierten Mikroalgen einen hohen Cobalamin-Gehalt auf, jedoch machen die biologisch aktiven Vitamin B₁₂-Formen nur einen geringen Bruchteil des Gesamtgehaltes aus. Dabei kann ein Überschuss an Vitamin B₁₂-Analoga mit den Vitamin B₁₂-Formen um die Resorption konkurrieren und bei bestehendem Vitamin B₁₂-Mangel die Symptome manifestieren.

In den 90er Jahren entwickelte das mittelständische Unternehmen Teutopharma GmbH ein auf Sanddornbeeren basiertes, patentrechtlich geschütztes Präparat, dessen Höhe an natürlichem Vitamin B₁₂-Gehalt vergleichbar mit dem Vitamin B₁₂-Gehalt in der Schweineleber war ^[75]. Es wurde vermutet, dass die Symbiose des Sanddorns mit den Knöllchenbakterien *Frankia alni* zu einer Anreicherung des Vitamin B₁₂ in den Beeren der Pflanze führt. Im Zuge regelmäßiger Qualitätskontrollen konnten jahrelang konstant hohe Vitamin B₁₂-Konzentrationen in den Sanddorngranulaten nachgewiesen werden. Diese Qualitätskontrollen erfolgten dabei mittels eines Enzymimmunoassays für Vitamin B₁₂ (ELISA), einer in der Lebensmittelanalytik weitverbreiteten standardisierten Vitamin B₁₂-Nachweismethode für tierische Produkte und Vitaminzubereitungen. Seit 2006 wurden jedoch systematische Verringerungen der Vitamin B₁₂-Konzentration in den Sanddornbeeren festgestellt, sodass der Vertrieb der Präparate eingestellt wurde. Eine Supplementierung der Sanddorngranulate mit dem künstlichen Cyanocobalamin war mit der urheimischen und naturverbundenen Unternehmensphilosophie der Teutopharma GmbH nicht vereinbar ^[76]. 2009 wurde in enger Zusammenarbeit der Teutopharma GmbH mit dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover ein Forschungsprojekt zur Untersuchung der Wirkstoffsynthese in pflanzlichen symbiotischen Vegetationssystemen ins Leben gerufen.

Im Zuge des Forschungsprojektes war das Ziel dieser Forschungsarbeit die Entwicklung einer innovativen Methodik der Vitamin B₁₂-Anreicherung in pflanzlichen Produkten mit dem Ziel diese zukünftig für die Produktion Cobalaminhaltiger pflanzlicher Nahrungsergänzungsmittel einzusetzen. Hierzu sollte in erster Linie ein verlässliches, ökonomisches und schnelles Verfahren zur selektiven analytischen Quantifizierung des Vitamin B₁₂ in pflanzlichen Extrakten etabliert werden, das zur routinierten Qualitätskontrolle geeignet ist. Desweiteren sollte der Vitamin B₁₂-Gehalt im Sanddorn unterschiedlicher Herkunft bestimmt und mit den

Cobalamin-Mengen, die der Symbiont *Frankia in vitro* produziert, verglichen werden. Dabei soll insbesondere überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Cobalamin-Produktion, dem Wachstum des Bakteriums und dem Kobalt-Angebot besteht. Es sollte untersucht werden, ob in Gegenwart des α -Liganden des Vitamin B₁₂, dem 5,6-Dimethylbenzimidazol, die Synthese und damit Zunahme des Vitamin B₁₂-Gehaltes in *Frankia* beeinflusst werden kann. Der Einfluss des Vitamin B₁₂ auf das mikrobielle Wachstum der *Frankia* sollte untersucht werden.

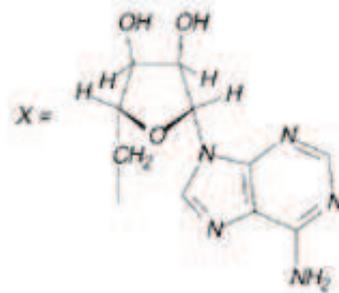
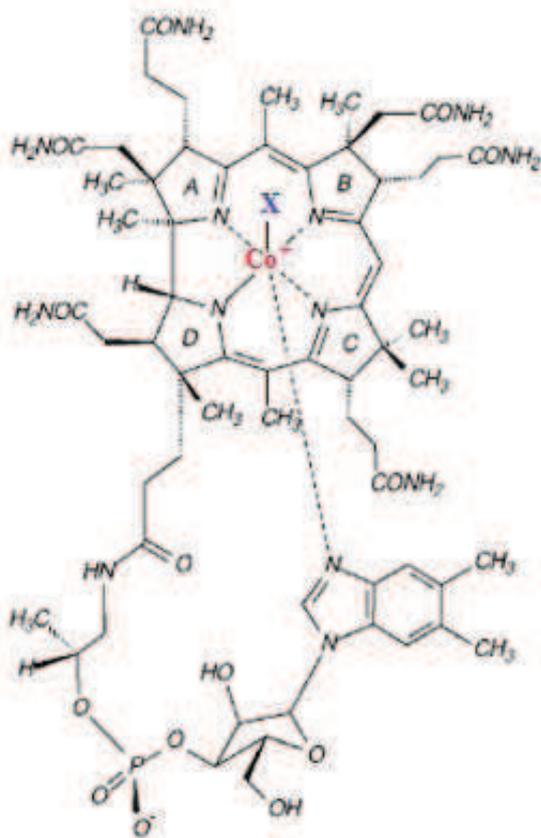
Anschließend sollten Methoden zur Anreicherung von Vitamin B₁₂ in europäischen pflanzlichen Lebensmitteln, wie Weißkohl, Giersch und Sanddorn, infolge mikrobieller Fermentation erarbeitet werden. Hierzu sollten die o.g. Pflanzen sowohl malolaktisch als auch mittels *Bacillus megaterium* fermentiert werden. Der Einfluss von *Spirulina platensis*, einer Cobalamin-reichen Mikroalge, als auch der Zusatz von 5,6-Dimethylbenzimidazol auf den Vitamin B₁₂-Gehalt der fermentierten Pflanzen sollten untersucht werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Cobalamine und Vitamin B₁₂

2.1.1 Chemische Struktur des Vitamin B₁₂ und seiner Analoga

Cobalamine bilden eine Gruppe wasserlöslicher B-Vitamine, deren wichtigster Vertreter das Vitamin B₁₂ ist. Dabei nimmt Vitamin B₁₂ als metallorganische Komplexverbindung in der Reihe der B-Vitamine aufgrund seiner chemischen Struktur (siehe Abb. 2-1) und seiner ausschließlich mikrobiellen Synthese eine Sonderstellung ein.



5'-Deoxyadenosylcobalamin
= Adenosylcobalamin
(AdoCbl, Coenzym B₁₂)

X = CH₃

Methylcobalamin
(MeCbl)

X = OH

Hydroxocobalamin

X = CN

Cyanocobalamin
(CNCbl, Vitamin B₁₂)

Abb. 2-1: Chemische Struktur von Vitamin B₁₂ [10].

Die Struktur des Vitamin B₁₂ lässt sich in folgende drei Ebenen unterteilen:

- das planare Corrin-Ringsystem mit vier Stickstoff-Liganden, die das zentrale Kobaltatom umgeben,
- der untere α -Ligand mit dem 5,6-Dimethylbenzimidazol, und
- der für die Cobalamine namensgebende und austauschbare obere β -Ligand.

Die essentiellen, d. h. für den menschlichen Organismus lebensnotwendigen und entsprechend als Vitamin B₁₂ verwertbare Formen der Cobalamine, liegen in Lebensmitteln meist als Methyl- und Adenosylcobalamin vor. Das in der Pharmazie als Vitamin B₁₂ erhältliche Cyanocobalamin ist ein stabiles Industrieprodukt, das infolge der Derivatisierung der mikrobiell synthetisierten Cobalamine, nach einer Aufarbeitung mit Cyanid, entsteht und eine höhere Stabilität gegenüber Licht, Sauerstoff und Temperatur aufweist als die oben genannten, natürlich vorkommenden Vitamin B₁₂-Formen. Das planare heterocyclische Corrin-Ringsystem des Vitamin B₁₂ ist mit dem aromatischen Porphyrin-Ringsystem des Hämoglobins und dem Chlorin-Ringsystem des Chlorophylls verwandt, wobei hier die Methin-Brückenbindung zwischen den Pyrroleinheiten A und D fehlt. Der untere α -Ligand ist insbesondere für die Resorption des Vitamin B₁₂ im menschlichen Organismus wichtig. Fehlt die Nucleobase 5,6-Dimethylbenzimidazol oder ist diese durch einen anderen Liganden ersetzt, so spricht man von einem Pseudo-Vitamin B₁₂ oder von Vitamin B₁₂-Analoga. Diese sind nicht essentiell und können bei vorhandenem Vitamin B₁₂-Mangel das Vitamin B₁₂ imitieren, seine Resorption blockieren und damit die Symptome eines Vitamin B₁₂-Mangels manifestieren.

2.1.2 Spaltung und Absorption von Vitamin B₁₂ im menschlichen Organismus und sein Vorkommen in Nahrungsmitteln

In der Nahrung liegt das Vitamin B₁₂ meist in einer an Proteine gebundenen Form vor. Damit wird das instabile Vitamin zum Einen vor Zersetzungen geschützt und zum Anderen liegt es in einer aufnahmefähigen Form vor^[1].

Nach der Aufnahme des Vitamin B₁₂ mit der Nahrung gelangt das Vitamin zunächst in proteingebundener Form in den Magen, wo es durch Magensäure und Proteasen von den Proteinen abgespalten und an ein Transportprotein, den R-Faktor gebunden

wird. Im Zwölffingerdarm erfolgt anschließend unter basischen Bedingungen eine teilweise Abspaltung des Vitamin B₁₂ von dem R-Faktor. Das Vitamin wird anschließend im oberen Teil des Dünndarms von dem Intrinsic Factor (IF) gebunden. Das IF wird von den Drüsenzellen der Magenschleimhaut, den Parietalzellen, sekretiert. Damit ist durch die Vitamin B₁₂-IF-Komplexierung das Vitamin vor dem bakteriellen und enzymatischen Abbau geschützt und kann anschließend im unteren Teil des Dünndarms durch die sich im Dünndarm befindlichen, spezifischen Rezeptoren der Brush Border Membran (BBM), absorbiert werden. Das Vitamin B₁₂, das nun an das Transportprotein Transcobalamin gebunden wird, wird anschließend in das Blutplasma transportiert ^[1].

Vitamin B₁₂ gehört zu den wenigen Vitaminen, das von dem Körper nicht sofort vollständig verbraucht und ausgeschieden wird, sondern über längere Zeit gespeichert werden kann. Dabei werden bis zu 60 % der Gesamtmenge an Vitamin B₁₂ in der Leber und 40 % in den Muskeln gespeichert ^[1].

Das Vitamin B₁₂ wird mikrobiell auch im menschlichen Dickdarm synthetisiert, dort kann es jedoch nicht resorbiert werden. Das Vitamin B₁₂ muss daher regelmäßig mit der Nahrung aufgenommen werden. Eine interessante, jedoch weniger appetitliche Studie wurde 1962 Callender et al. durchgeführt, in der den an Vitamin B₁₂-Mangel leidenden Testpersonen wässrige Extrakte ihrer 24 h-Stuhlproben verabreicht wurden, wobei die Mangelsymptome nach kurzer Zeit zurückgingen bis zur vollständigen Heilung der Patienten ^[2]. Mit dieser extravaganten Studie konnte erstmals bewiesen werden, dass im menschlichen Dickdarm Vitamin B₁₂ in für den Menschen ausreichenden Mengen synthetisiert wird, an dieser Stelle jedoch nicht resorbiert werden kann und daher vollständig ausgeschieden wird.

Vitamin B₁₂ kommt in hohen Konzentrationen nur in tierischen Lebensmitteln, wie Fleisch, Leber, Fisch, Milch und Käse vor ^[3]. Milchsauer vergorene pflanzliche Nahrungsmittel, wie Sauerkraut, weisen dagegen nur geringe Vitamin B₁₂-Konzentrationen auf (vgl. Tabelle 2-1). In Mikroalgen konnten hohe Cobalamin-Konzentrationen gemessen werden. So konnte in *Spirulina* mittels mikrobiologischen Nachweises ein Gehalt von 50 – 200 µg/100 g Vitamin B₁₂ nachgewiesen werden ^[4]. Die Wahl der geeigneten Analytik-Methode ist bei der Vitamin B₁₂-Analyse von besonderer Wichtigkeit. So konnte mittels Radioassay unter Verwendung des IF

gezeigt werden, dass bis zu 80 % des mit dem mikrobiologischen Nachweis bestimmten Vitamin B₁₂-Gehalts zu der Gruppe der Vitamin B₁₂-Analoge gehören und damit nicht essentiell ist^[4].

Tabelle 2-1: Vitamin B₁₂-Gehalt in einigen Lebensmitteln des täglichen Bedarfs (Angaben der GDE 2005).

Lebensmittel	Vitamin B ₁₂ [µg/100 g]
Rinderleber (gegart)	67
Hering	11
Lachs	6
Rinderfleisch	4
Käse (Emmentaler 45 % i. Tr.)	2
Speisequark	0,8
Kuhmilch (3,5 % Fett)	0,4
Sauerkraut	0,2

Der menschliche Organismus braucht nach Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung 3 µg/Tag Vitamin B₁₂, wobei ältere Personen, sowie Vegetarier, Veganer und Alkoholiker einem erhöhten Risiko des Vitamin B₁₂-Mangels ausgesetzt sind^[5]. Vitamin B₁₂ ist an zahlreichen Stoffwechsel- und Zellteilungsvorgängen beteiligt, ebenso wie bei der Bildung von Erythrozyten. Die häufigsten Symptome eines Vitamin B₁₂-Mangels sind Müdigkeit, Unwohlsein, Magen-Darmstörungen, Veränderungen des Blutbilds und Schädigungen des Nervensystems^[6]. In besonders schweren Fällen kann es zu lebensgefährlicher perniziöser Anämie führen^[6].

2.1.3 Industrielle Herstellung von Vitamin B₁₂

Nach elfjähriger Arbeit gelang schließlich 1971 den Arbeitsgruppen von Albert Eschenmoser und Robert B. Woodward die Totalsynthese von Vitamin B₁₂^[13,14]. Diese revolutionäre präparative Meisterleistung ist jedoch aufgrund zahlreicher Synthesestufen für die industrielle Cobalamin-Herstellung technisch und ökonomisch nicht umsetzbar. Daher sind die biotechnologischen Verfahren zur Vitamin B₁₂-

Herstellung vom großen industriellen Interesse. Weltweit werden jährlich bis zu 12 t Vitamin B₁₂ (Preis: 30.000 €/kg) produziert ^[15].

Zu Beginn der siebziger Jahre wurden biotechnologische Verfahren zur Cobalamin-Herstellung mittels des Bakteriums *Pseudomonas denitrificans* entwickelt ^[7,8]. Mit den modernen Verfahren lassen sich 5–7 g/L Vitamin B₁₂ nach einer 50–140 h Fermentation in einem 120 m³-Bioreaktor mit dem Bakterium *P. denitrificans* herstellen ^[11]. Es sind jedoch auch weitere mikrobielle Methoden zur Vitamin B₁₂-Herstellung erarbeitet worden, die sich ebenfalls für einen großtechnischen Ansatz eignen, wie beispielsweise mittels anaeroben Bakterien *Propionibacterium shermanii* und *Propionibacterium freudenreichii* ^[9,10]. Nach dem Verfahren der DSM N.V. (Heerlen, Niederlande) lassen sich vorzugsweise mit Hilfe von *P. shermanii* und *P. freudenreichii* über 0,1 % (Gew./Gew.) Vitamin B₁₂, bezogen auf den Trockensubstanzgehalt der Zusammensetzung, herstellen ^[16]. BASF AG verwendet zur biotechnologischen Vitamin B₁₂-Produktion das gentechnisch modifizierte aerobe Bakterium *Bacillus megaterium* ^[17].

Bei der Aufarbeitung des mikrobiell hergestellten Vitamin B₁₂ werden die entstandenen lichtempfindlichen Cobalaminverbindungen (z.B. Methyl- und Hydroxycobalamin) durch anschließende Cyanidierung in das stabile Cyanocobalamin derivatisiert, und durch anschließende Extraktionsverfahren in organischen Lösemitteln weiter aufgereinigt ^[18]. Aufgrund der steigenden Verbrauchernachfrage nach pflanzlichen Nahrungsergänzungsmitteln, im Zuge einer vegetarischen oder veganen Diät, reagiert auch der Markt und damit auch die Forschung mit der Entwicklung pflanzlicher Produkte mit hohem natürlichem Vitamin B₁₂-Gehalt. So lassen sich insbesondere im asiatischen Raum zahlreiche Algen- und Sojaprodukte, wie Tempeh, die vermeidlich mit natürlichem Vitamin B₁₂ angereichert sind, finden. Jedoch ist der auf den Etiketten angegebene hohe Vitamin B₁₂-Gehalt in den meisten Fällen falsch, und zeigt neben dem biologisch aktiven Vitamin B₁₂ auch einen hohen Gehalt an Vitamin B₁₂-Analoga, die mangels der Sensitivität der verwendeten Cobalamin-Analytikmethode als essentiell nachgewiesen werden ^[12]. Das mittelständische niedersächsische Pharmaunternehmen Teutopharma GmbH hatte Anfang der 90er Jahre ein einzigartiges und damit auch marktführendes pflanzliches Vitamin B₁₂-haltiges Präparat auf der Basis des

Sanddorn-Extrakt entwickelt ^[75]. Dieses Sanddorn-Extrakt enthielt natürliches Vitamin B₁₂, das durch die Symbiose des Sanddorns mit Knöllchenbakterien bedingt war. Aufgrund des stetig abnehmenden Vitamin B₁₂-Gehaltes in Sanddorn-Beeren wurden jedoch 2010 die Produktion und der Vertrieb dieses Sanddorn-Präparats eingestellt ^[76].

2.2 Sanddorn

Sanddorn (*Hippophae rhamnoides* L.) ist ein laubabwerfender diözischer Strauch, der zu der Familie der *Elaeagnaceae* (Ölweidengewächse) gehört ^[19]. Der Strauch kann 2-4 m hoch wachsen. Er kommt weitverbreitet sowohl in westeuropäischen Ländern, wie Deutschland, Frankreich, England und Finnland als auch im osteuropäischen und asiatischen Raum wie China, Nepal, Pakistan, Indien und Russland, Ukraine, und Rumänien vor ^[20, 21]. Der wildwachsende Sanddorn wächst als Pionierpflanze vorwiegend auf den gut durchlüfteten kalkhaltigen Sand- und Kiesböden der Küstenregionen, wie beispielsweise auf den Weiß- und Graudünen der Nordseeküste. Er kann aber auch offene Landflächen besiedeln, wie Flussbänke, verlassenes Agrarland und Vorwälder, oder steinige Landschaften, wie Gebirgslagen und Hänge ^[22]. Es ist eine äußerst robuste Pflanze, die extremen Wetterbedingungen standhalten kann. So kann der Sanddorn Temperaturen von – 43 – 40 °C und Dürren mit jährlichem Niederschlag von 400-600 mm widerstehen ^[23, 24]. Wie alle *Elaeagnaceae*-Spezies ist Sanddorn vorwiegend mit stickstofffixierenden Knöllchenbakterien, den *Frankia*-Aktinomyceten, in Symbiose assoziiert. Diese siedeln sich an den Wurzeln der Pflanze an, unter Bildung von typischen Verdickungen und Knoten an den Wurzeln der Wirtspflanze. Der Symbiont *Frankia* ermöglicht der Wirtspflanze das Gedeihen auf nährstoff- und vor allem stickstoffarmen Böden. Die Symbiose ist pH-abhängig (siehe Abb. 2-2). Eine natürliche Entwicklung der Pflanze ist deshalb nur in schwach alkalischen bis neutralen Böden gegeben. In sauren Böden können Nematoden zunehmend die vom Symbionten ausgebildeten Knöllchen verzehren und damit die Symbiose zerstören, was eine drastische Reduzierung der Stickstoff- und Phosphataufnahme durch die Wirtspflanze zur Folge hat und damit zum anschließenden Absterben des Sanddorns führt ^[25].

Der Sanddorn bildet ein breites Wurzelsystem aus mit einer Länge von 6 bis 10 m, das bis zu 30 cm unter der Erdoberfläche liegt und bis zu 3 m lange senkrechte Ankerwurzeln ausbildet. So kann sich die Pflanze über sein Wurzelsystem verbreiten, indem die waagerechten Wurzeln aufwärtsstehende Senker mit Ablegern der Mutterpflanze bilden ^[22]. Die Verbreitung der Pflanze kann auch endozoochor durch die Vögel stattfinden, die die saftigen und fleischigen Beeren verzehren und durch die Ausscheidung der Samen an einer anderen Stelle für die Verbreitung der Pflanze sorgen ^[25].

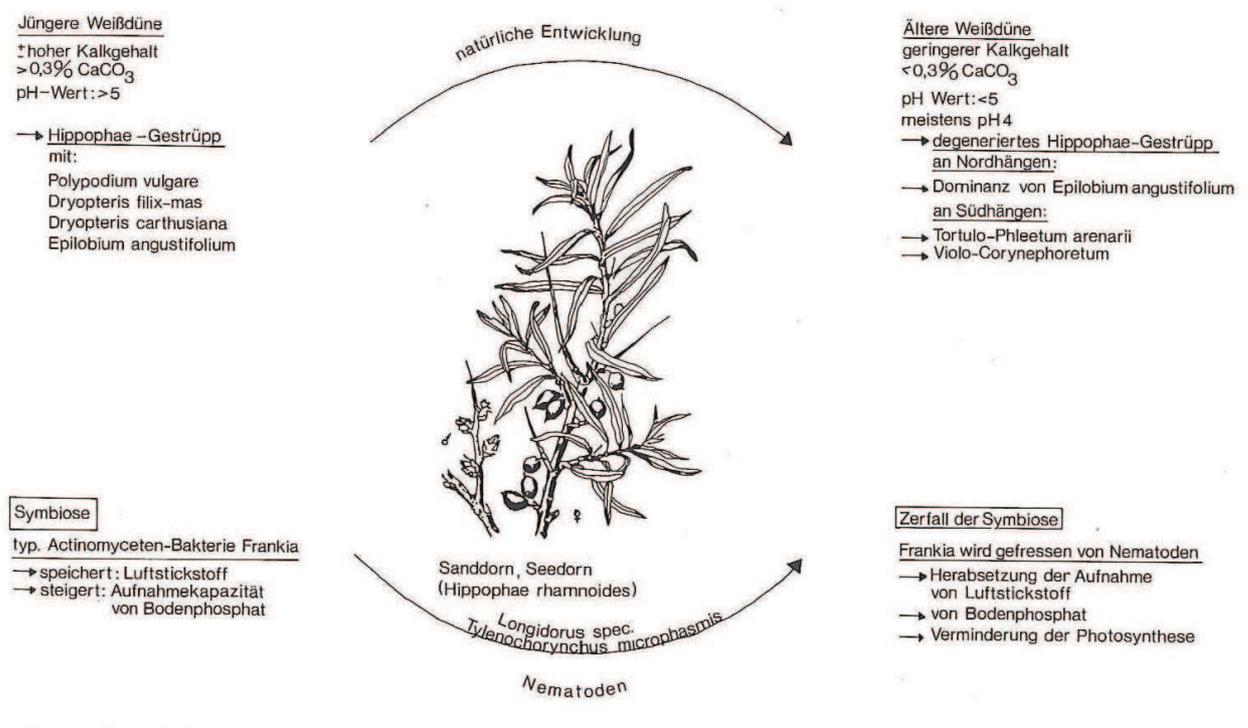


Abb. 2-2: Die pH-Abhängigkeit der Symbiose zwischen Sanddorn und *Frankia* ^[25].

Der Sanddorn ist eine zweihäusige oder diözische Pflanze, so gibt es eine männliche und eine weibliche fruchttragende Pflanze. Die Blüten der weiblichen Pflanze werden in der Regel vom Wind mit den Pollen der männlichen Pflanze bestäubt. Diese Eigenschaft wird auch beim landwirtschaftlichen Sanddornanbau berücksichtigt. Laut Sächsischem Landesamt für Umwelt wird der lichtliebende Sanddorn in Reihenabständen von 4-4,5 m angebaut ^[26]. In Russland dagegen wird der Sanddorn in Reihenabständen von 2-2,5 m angebaut ^[27]. Dabei wird eine Arbeitsgassenbreite von 2,5 m für die weitverbreitete maschinelle Ernte beibehalten ^[26]. Der Anteil männlicher Pflanzen beträgt eine Reihe männlicher Pflanzen

auf acht Reihen fruchttragender weiblicher Pflanzen. Die weibliche Pflanze trägt jährlich Beeren, wobei die Beerenbildung erst auf zweijährigen Pflanzen stattfindet ^[28]. Die Früchte sind in der Regel erbsengroße, ovale Beeren mit hohem Öl- und Saftgehalt (siehe Abb. 2-3).

Der Sanddorn ist für seinen hohen Gehalt an Fruchtsäuren und Vitamin C bekannt. Dabei variiert der Vitamin C-Gehalt in Abhängigkeit von der Spezies und geographischer Lage sowie den Wetterbedingungen und physiologischer Beschaffenheit der Pflanze. In der europäischen Subspezies *ramnoides* konnte ein maximaler Vitamin C-Gehalt von 360 mg/100 g Beeren ^[29, 30] gefunden werden, während in chinesischer Subspezies *sinensis* bis zu 2.500 mg/100 g Beeren Vitamin C enthalten sein kann ^[31]. Der pH-Wert des Saftes liegt nah bei 2,5, was dem niedrigsten pH-Wert der gewöhnlichen europäischen Tafelbeeren-Säfte entspricht ^[32]. Der Carotenoid-Gehalt beträgt je nach Sorte 16-28 mg/100 g Beeren und trägt gleichzeitig zu der charakteristischen gelben bis orangeroten Farbe der Früchte bei ^[24]. Im Sanddorn sind viele weitere für den Menschen lebenswichtige Nährstoffe, wie Fettsäuren und Flavonoide, enthalten sowie die fettlöslichen Vitamine A und E. Neben dem hohen Vitamin C-Gehalt sind auch weitere wasserlösliche Vitamine der B-Reihe, darunter auch Vitamin B₁₂ ^[33], enthalten.



Abb. 2-3: Die Beeren eines wildwachsenden Sanddorns auf der ostfriesischen Insel Norderney.

In Abhängigkeit von der Sorte können von ausgewachsenen Pflanzen mit maschineller Ernte bis zu 6.243 kg/ha Beeren geerntet werden ^[26] (entspricht 0,62 kg/m²). Bei der in China weitverbreiteten Varietät *Hippophae rhamnoides ssp. sinensis*, wird der Ernteertrag mit 450-600 kg/ha angegeben ^[34], wobei die Ernte bei dieser Subspezies alle zwei Jahre erfolgt. Je nach Sorte können die Beeren jährlich bis alle 3 Jahre geerntet werden. Dabei ist die Schnitterntetechnik sowohl laut russischen Quellen ^[27] als auch laut sächsischem Landesamt ^[26] wichtig für die Triebleistung der fruchttragenden Äste. Bei der Verwendung phosphat- und kaliumhaltiger Düngemittel konnten eine Verbesserung der Beerenqualität sowie eine Erhöhung der Ernte und der Beerengröße erzielt werden ^[35]. Düngung mit Stickstoff kann dagegen negative Auswirkungen auf die Knöllchenbildung durch *Frankia*-Symbionten haben ^[36].

Der Sanddorn hat eine sehr große wirtschaftliche Bedeutung, wobei die Pflanze neben landwirtschaftlicher Nutzung auch zum Uferschutz angebaut wird. Wegen seiner prächtigen orangeroten Beeren wird es auch als Zierpflanze im Gartenbau verwendet. Die Beeren und Blätter werden weitverbreitet u.a. auch für pharmazeutische und kosmetische Zwecke genutzt.

2.3 *Frankia* sp.

Frankia sp. ist ein stickstofffixierendes, in Symbiose assoziiertes Bakterium, das zu der Ordnung der Actinomycetales gehört. Es besiedelt das Wurzelsystem der meistens verholzten Arten der dikotylen Gattungen wie *Alnus*, *Elaeagnus*, *Hippophaë*, *Casuarina*, *Myrica* u.a.m. ^[37, 38].

Anhand der Sequenzanalyse konnten die *Frankia*-Stämme in drei Haupt-Clustergruppen aufgeteilt werden ^[39]. Die 24 Pflanzengattungen, die mit *Frankia* Symbiose eingehen können, lassen sich in acht Familien aufteilen, die in Abb. 2-4 schematisch dargestellt sind.

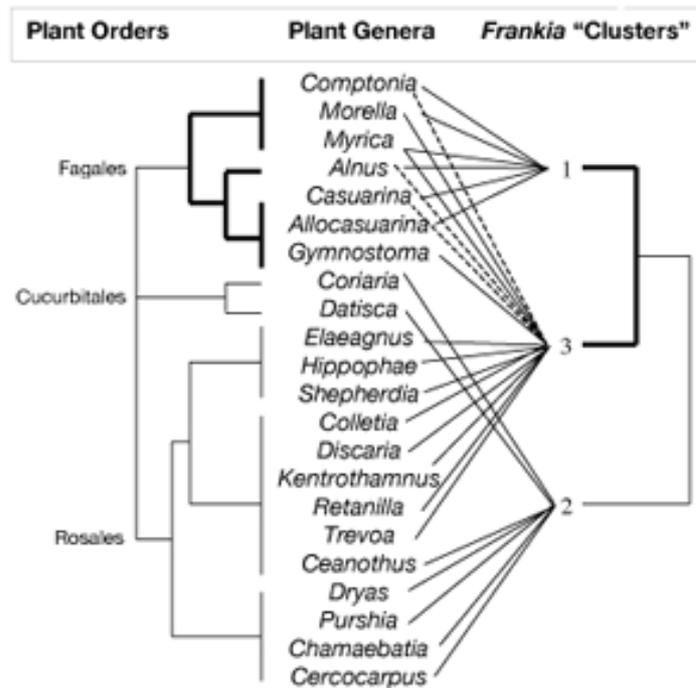


Abb. 2-4: Beziehungen zwischen den Pflanzengattungen und den drei *Frankia*-Clustergruppen 16S rRNA und die grundlegenden Mechanismen der Etablierung der Symbiose. Fette Linie - Infizierung der Wurzelhaare der Wirtspflanze. Dünne Linie - interzelluläre Durchdringung. Schräge Linie - natürliche Symbiose möglich. Unterbrochene Linie - Symbiose nur unter Laborbedingungen möglich ^[39].

Das Bakterium bildet knöllchenartige Auswucherungen an den Wurzeln der Wirtspflanze (siehe Abb. 2-5).

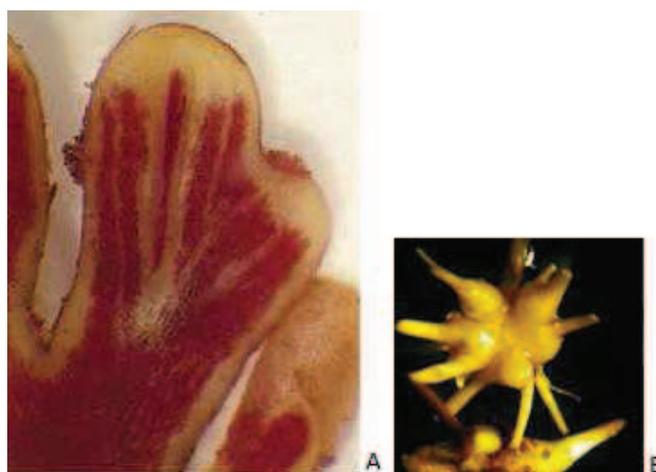


Abb. 2-5: Wurzelknöllchen von *Casuarina*. A-Im Querschnitt ^[40]. B-Wurzelknöllchen, ca. 1 cm Durchmesser ^[41].

Aufgrund der myzelartigen Morphologie der *Frankia* gingen die Wissenschaftler lange davon aus, dass es sich um einen Pilz handeln muss. Die erste Beschreibung

der Wurzelknöllchen geht auf Meyen (1829) ^[42] zurück, wobei er die Auswucherungen an den Wurzeln der Wirtspflanze als parasitöse Pflanzen bezeichnete, die sich an den Wurzeln der Schwarzerle *Alnus glutinosa* ansiedeln. 1866 untersuchte der russische Wissenschaftler Woronin ^[43] die Morphologie der Wurzelknöllchen und machte die Annahme, dass es sich um einen Pilz ebenfalls parasitischer Natur handeln muss.

1887 wurde von Brunchorst ^[44] zu Ehren seines Professors Albert B. Frank der neue Name *Frankia subtilis* vorgeschlagen, wobei er ebenfalls der Ansicht war, dass es sich hierbei um einen Pilz handelt.

Erst 1895 wurde von Hiltner ^[45] die symbiotische Beziehung zwischen der Wirtspflanze und den Wurzelknöllchen über die Stickstofffixierung experimentell am Beispiel der Erle beschrieben.

Mittels Elektronenmikroskopie konnte schließlich 1964 die prokariotische Zellstruktur des Mikroorganismus in *Alnus glutinosa* und damit sein bakterieller Charakter nachgewiesen werden ^[46]. Damit wurde die fast einhundertjährige Diskussion über die Klassifizierung des filamentösen Mikroorganismus *Frankia* abgeschlossen.

Es dauerte mehrere Jahrzehnte bis letztendlich 1978 der Arbeitsgruppe Torrey et al. eine erfolgreiche Isolierung des *Frankia*-Stammes aus der Farnmyrte *Comptonia peregrina* gelang ^[47].

Dieses Isolat zeigte nicht nur die Fähigkeit außerhalb der Wirtspflanze leben zu können, sondern konnte wiederholt das Wurzelsystem infizieren und eine Symbiose mit der Wirtspflanze eingehen ^[48]. Dennoch stellt die Isolierung und die Stammhaltung der *Frankia* bis heute eine wissenschaftliche Herausforderung dar. Die Schwierigkeit der Handhabung des Bakteriums liegt zum einen an seinem sehr langsamen Wachstum, was die Kontaminationsgefahr zusätzlich erhöht, und zum anderen in noch nicht vollständig geklärten Kultivierungsbedingungen, die sich je nach *Frankia*-Stamm stark voneinander unterscheiden.

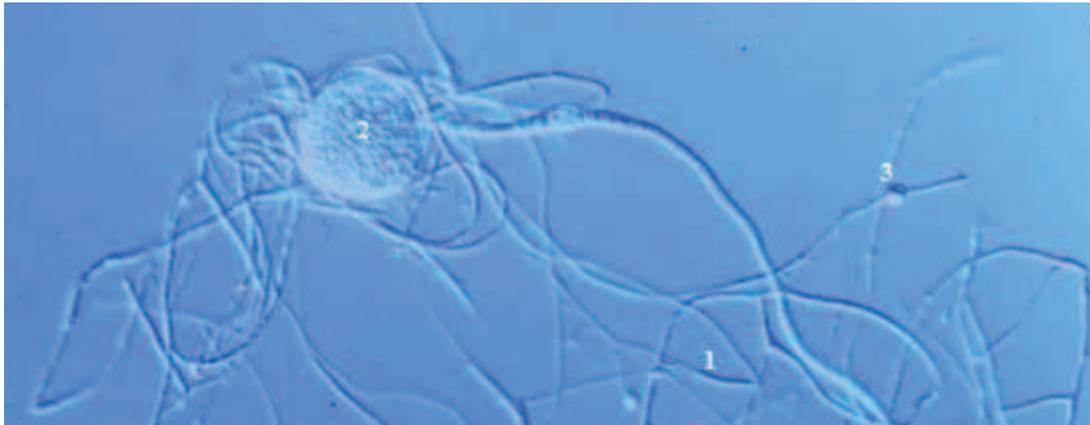


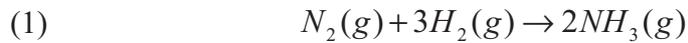
Abb. 2-6: Typische *in vitro* Morphologie der *Frankia alni*. Die Hyphae (1), das zentrale stickstofffixierende Vesikel (2) und Sporangium (3) ^[49].

Frankia weist drei verschiedene Zellarten auf (siehe Abb. 2-6), die sowohl in einer reinen Kultur als auch in Symbiose mit der Wirtspflanze auftreten. Das Bakterium bildet Hyphae, das ein filamentöses Myzel-artiges Geflecht bildet. In terminaler und interner Position bildet sich das Sporangium aus, das vor allem *in vitro* der Fortpflanzung des Bakteriums durch Sporen dient. Dagegen *in planta* kommt es nur sehr selten und nur in einigen bestimmten Pflanzenarten zur Ausbildung des Sporangiums ^[50]. Unter stickstoffarmen Bedingungen bilden sich sowohl *in planta* als auch *in vitro* die Vesikel aus. Diese sind für die Stickstofffixierung durch das Enzym Nitrogenase zuständig und weisen eine, im Vergleich zu Sporangium und Hyphae, dickwandige Struktur auf ^[38].

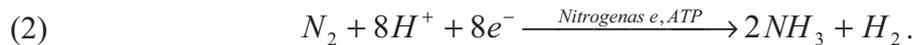
2.3.1 Die Rolle des Kobalts bei mikrobieller Stickstofffixierung und Symbiose der Knöllchenbakterien

Der Stickstoff stellt neben Sauerstoff und Kohlenstoff eines der lebensnotwendigsten Elemente in der Natur dar, und ist stets eines der Bausteine aller Proteine, Enzyme und der DNA. Obwohl es mit 78 Volumenprozent den Hauptbestandteil der Luft darstellt, ist es aufgrund seiner chemischen Trägheit für die meisten Lebewesen und Pflanzen nicht verfügbar. Die Boden-Konzentrationen löslicher, essentieller Formen von Stickstoff, wie Ammonium und Nitrat können schwanken. Dennoch gibt es eine bestimmte Gruppe der Prokaryoten, die in der Lage sind, den atmosphärischen Stickstoff in Form von Ammoniumverbindungen zu binden. Hierzu gehören die freilebenden Bakterien (z.B. Cyanobakterien) oder in Symbiose lebenden

Knöllchenbakterien (Aktinorrhiza, z. B. *Rhizobia* und *Frankia*). Die energetisch aufwändige, kinetisch gehemmte Reaktion des Stickstoffs mit Wasserstoff (1)



wird durch das Enzymsystem Nitrogenase katalysiert. Es wird folgende Modellreaktion angenommen (2):



Durch Nitrogenase werden auch folgende weitere Reaktionen katalysiert ^[51]:

- Komplexierung und Reduktion von N_2 , N_2O , N_3^- , Alkine, HCN sowie weitere Nitrile und Isonitrile,
- Reduktion von Protonen zum Wasserstoff,
- Hydrolyse von ATP.

Das Enzymsystem Nitrogenase stellt ein Komplex dar, dass u.a. aus den Eisen- und Molybdän-Eisen-Proteinen besteht. In der Abb. 2-7 ist der Nitrogenase-Komplex schematisch dargestellt.

Bei der Reduktion des Stickstoffs durch Nitrogenase findet eine Reihe von Elektronentransfer-Schritten statt. Die Reaktionsmechanismen der Stickstofffixierung unterscheiden sich dabei *in vitro* und *in vivo* in nur einem Reduktionsschritt voneinander. Dabei findet *in vivo* im ersten Schritt die Reduktion des Fe-Proteins durch die Elektronentransmitter Ferredoxine oder Flavodoxine statt, während *in vitro* die Dithionite als Elektronentransmitter fungieren. Im nächsten Schritt findet ein Elektronentransfer vom Fe- zum MoFe-Protein über MgATP statt. Dabei werden mindestens zwei MgATP-Moleküle hydrolysiert. Anschließend findet ein Elektronentransfer von der aktiven Seite des MoFe-Proteins zum Substrat, in diesem Falle zum Stickstoff, statt ^[53]. Es lässt sich folgende Reaktion in vereinfachter Form formulieren (3) ^[54]:



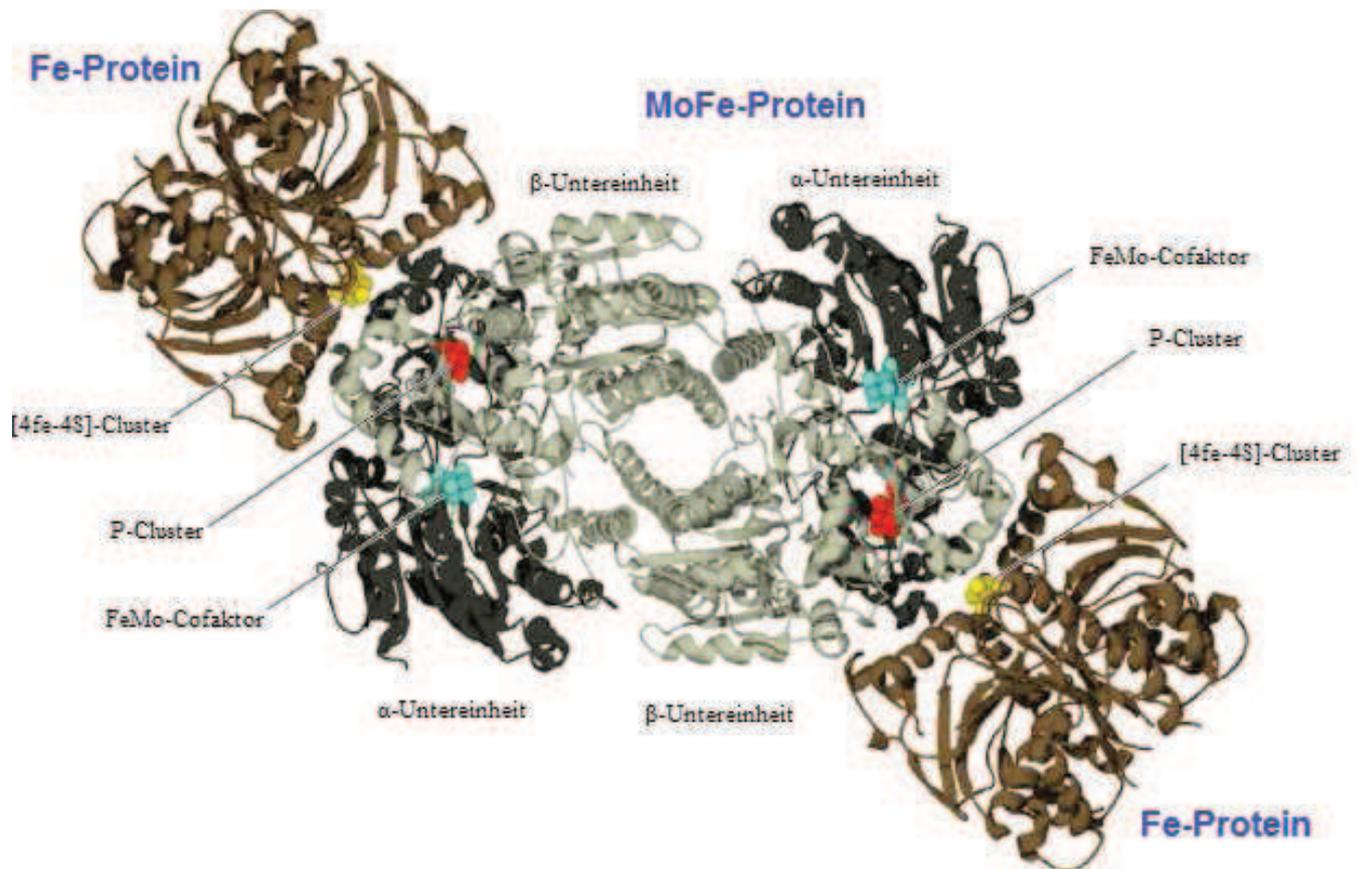


Abb. 2-7: Die Struktur des Enzymkomplexes Nitrogenase aus der *Azotobacter vinelandii* [52].

Es ist auch ein Eisen-Vanadium-Protein bekannt, das die gleichen Eigenschaften wie FeMo-Protein aufweist [55].

In Anwesenheit von Kobalt wird die Stickstofffixierung, und damit das Wachstum der mit *Rhizobia* Bakterien in Symbiose lebenden Lupine, erhöht. Dabei wird das Kobalt hauptsächlich an Wurzelknollen mit Kobaltmangel geleitet [52].

Im Phloem weist Kobalt eine sehr hohe Mobilität auf und kann so leicht aus den oberen Blättern in die Wurzelknöllchen [56] und in das Wurzelsystem gelangen [57]. In Lupinen dagegen kommt es zu einer hauptsächlichlichen Akkumulation des Kobalts in den Blättern der Pflanze. So weisen ältere Blätter höhere Kobaltkonzentrationen als junge Blätter auf [52].

Die Studien von Evans et al. haben gezeigt, dass das Kobalt als zentrales Atom der Cobalamine essentiell für das normale Wachstum der *Rhizobium*-Spezies ist [58-60]. Hier sind drei Cobalamin-abhängige Enzymsysteme bekannt:

1. **Methylmalonyl – CoA – Mutase** ist verantwortlich für die Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zum Succinyl-CoA. Dieser ist über den Succinyl-Propionyl-CoA-Weg indirekt mit der mikrobiellen Leghämoglobin-Synthese in den Wurzelknöllchen verbunden ^[61-65]. Leghämoglobin ist für die reversible Bindung des Sauerstoffs in N₂-fixierenden Knöllchenbakterien und damit für den Schutz des sauerstoffempfindlichen Nitrogenase-Enzym-Komplexes verantwortlich ^[66]. Somit korreliert der Kobaltmangel mit abnehmender Konzentration an Leghämoglobin in den Wurzelknöllchen ^[67-70].
2. **Ribonukleotid – Reduktase** reduziert das Ribonukleotid zu Desoxyribonukleotid und ist damit an der DNA-Synthese beteiligt ^[60, 71].
3. **Methionin – Synthetase** ist an der Methionin-Synthese beteiligt ^[72, 73]. Somit hemmt Kobaltmangel das Wachstum der Knöllchenbakterien durch das indirekte Hemmen der Proteinsynthese. Dabei ist das Bakterien-Wachstum der *Rhizobia meliloti* insbesondere auf die Methionin-Synthese angewiesen, wofür auch das meiste Kobalt verbraucht wird. In einem Kobalt-armen Medium mit hohen Methionin-Konzentrationen ist ein sehr gutes Wachstum der *R. meliloti* zu beobachten ^[73].

Der Cobalamin-Gehalt in Kobalt-armen Lupin-Wurzelknöllchen ist entsprechend niedriger als in kobaltangereicherten Wurzelknöllchen ^[56, 67, 69, 74]. Dabei werden weniger als 12 % des in den Wurzelknöllchen des Lupins enthaltenen Kobalts als Vitamin B₁₂ gebunden ^[74].

Die Studien von Dilworth et al. (1979) zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der Zellzahl der *Rhizobia* und der Cobalamin-Konzentration in den Wurzelknöllchen ^[74].

3 Experimenteller Teil

3.1 Analytische Methoden zum Nachweis von Vitamin B₁₂

Seit der Entdeckung des „antiperniziösen Faktors“^[77] und seiner anschließenden Isolierung im Jahre 1948^[78, 79] wurden unterschiedliche Analysemethoden zum Nachweis von Vitamin B₁₂ entwickelt. Aufgrund der zahlreichen Vitamin B₁₂-Analoge, die neben den essentiellen Formen der Cobalamine in Nahrungsmitteln vorliegen, stellte sich die Entwicklung einer hoch selektiven universellen Standard-Nachweismethode für die Quantifizierung der für den menschlichen Organismus essentiellen Cobalamin-Formen, als eine analytische Herausforderung dar. Mittlerweile lassen sich in der Literatur zahlreiche Protokolle und Vorschriften finden, die mittels präparativer und moderner instrumenteller Analytikmethoden einen quantitativen und qualitativen Nachweis von Vitamin B₁₂ erlauben.

Darum stellte sich zu Beginn dieser Arbeit die Entwicklung einer verlässlichen und schnellen Cobalamin-Analytikmethode für pflanzliche Matrices als der wichtigste, grundlegende Arbeitsschritt dar. Die Methode sollte dabei für die Serien- und Routineuntersuchungen geeignet sein und neben ihrer Selektivität gegenüber der für den Menschen essentiellen Cobalamin-Formen, auch die Anforderungen der Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Wiederfindung erfüllen.

Der mikrobiologische Nachweis (MBA) und der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sind die am häufigsten verwendeten Vitamin B₁₂-Nachweismethoden in der Lebensmittelanalytik. In diesem Kapitel sollen MBA und ELISA mit dem Nachweis von Cyanocobalamin mittels HPLC, nach einer vorherigen immunoaffinitätschromatographischen Probenaufarbeitung, verglichen werden. Hierbei wurden insbesondere die Selektivität, Kompatibilität und Wiederfindung der oben genannten Analytikmethoden bei Anwendung auf tierische und pflanzliche Matrices betrachtet.

3.1.1 Mikrobiologische und immunologische Nachweis von Vitamin B₁₂

3.1.1.1 Der mikrobiologische Nachweis

Der mikrobiologische Nachweis ist eine der ältesten Analytikmethoden zum Nachweis von Vitamin B₁₂ in Nahrungsmitteln und Körperflüssigkeiten. Anfang der 50er Jahre berichtete der amerikanische Wissenschaftler Ross zum ersten Mal über den Nachweis von Vitamin B₁₂ in Körperflüssigkeiten, bei dem *Euglena gracilis* als Testorganismus verwendet wurde^[80, 81]. Anschließend folgten weitere Publikationen, in denen auch *Lactobacillus leichmannii*^[82], *Lactobacillus lactis*^[83], *Ochromonas malhamensis*^[84] und ein Mutant des *Bacterium coli*^[85] jeweils als Testorganismen verwendet wurden. 1952 und 1960 wurde der mikrobiologische Nachweis durch die Organisation „Association of Official Analytical Chemists“ (kurz: AOAC) als offizielle Nachweismethode für Cobalamin eingeführt mit *Lactobacillus leichmannii* als Testorganismus^[86, 87].

Der gewöhnliche mikrobiologische Nachweis birgt viele Nachteile und Schwierigkeiten in sich. Neben dem hohen Arbeits- und Zeitaufwand erfordert der Test spezielle hochreine und sterile Apparatur. Bereits in den 50er Jahren berichteten zahlreiche Wissenschaftler über die Unspezifität dieser Methode gegenüber Cyanocobalamin^[88, 89] in Anwesenheit weiterer nicht essentieller Cobalamine und Antibiotika. Für klinische Tests ist der mikrobiologische Vitamin B₁₂-Nachweis nicht anwendbar, da schon Spuren an Antibiotika zu einer Wachstums-inhibierung des Testorganismus führen und damit die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen^[90]. In der Lebensmittelanalytik wird der MBA mit *Lactobacillus delbrueckii subsp. leichmannii* als Testorganismus, vor allem wegen seiner geringen Kosten als Routineuntersuchung für Vitamin B₁₂ eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der mikrobiologischen Nachweis nach AOAC 952.20 (Beschreibung der Extraktions- und Nachweismethode siehe Anhang Kapitel 5.1.1 und 5.1.5) auf seine Kompatibilität mit pflanzlichen Extrakten geprüft, wobei die Wiederfindung von Cyanocobalamin in Fleisch- und Beerenextraktproben verglichen wurde. Hierzu wurden die jeweils mit 1 µg/100 mL Cyanocobalamin

versetzten Rinderfleisch- und Beerenextrakte des Sanddorns verwendet. Die Abbildung 3-1 zeigt, dass mittels MBA in Cyanocobalamin-Standardlösungen und in Fleischextrakt eine Wiederfindung von 90 – 92 % erzielt werden kann. In Sanddornbeeren-Extrakten dagegen beträgt die Wiederfindung des Cyanocobalamins maximal 22 %.

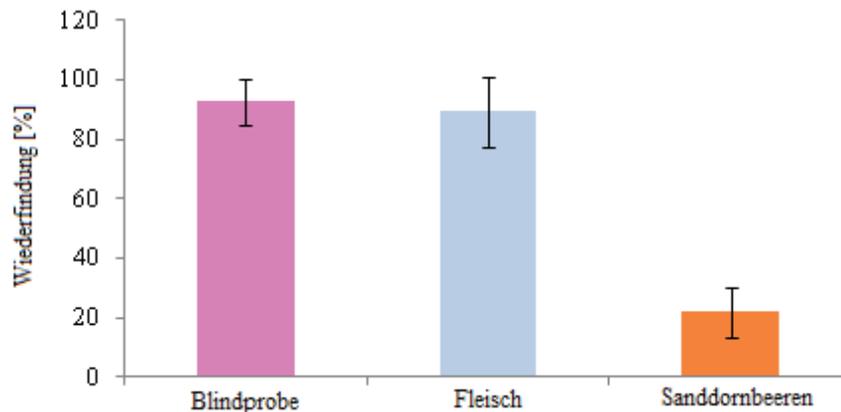


Abb. 3-1: Die Wiederfindung von Cyanocobalamin mittels mikrobiologischen Nachweises nach AOAC 952.20 in jeweils mit 1 µg/100 mL Cyanocobalamin versetzten Rinderfleisch- und Sanddornbeeren-Extrakt im Vergleich zu einer mit 1 µg/100 mL Cyanocobalamin versetzten wässrigen Lösung (Standard).

Bei der betrachteten Nachweismethode ist das Wachstum des Testorganismus in einem bestimmten Konzentrationsbereich des Vitamin B₁₂ proportional der Cobalamin-Konzentration der Kalibrations- bzw. Testlösung. Dementsprechend müssen einige in Sanddornbeeren enthaltene Komponenten wachstumshemmende Wirkung auf das Testorganismus *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* aufweisen und damit die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen.

Nun stellte sich die Frage, welche Komponenten der Sanddornbeere mit dem Cyanocobalamin interferieren oder das Wachstum des Testorganismus *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* auf andere Art beeinflussen können. Um diese Frage zu beantworten, wurde das Wachstumsverhalten des Testorganismus in Gegenwart einer reinen Cyanocobalamin-Standardlösung und unter Zusätzen einiger weitverbreitet vorkommender Komponenten der Sanddornbeere, gegenübergestellt.

Verwendet wurden hierzu jeweils mit einer definierten Konzentration von Cyanocobalamin versetzte Lösungen mit Quercetin, Vitamin C und Ascorbinsäure. Es wurde dabei von ihrem durchschnittlichen Gehalt in Sanddornbeeren ausgegangen. Dieser beträgt in der Regel 100-700 mg/100 g Vitamin C ^[121], 810-

2820 mg/100 g Chinasäure ^[122] sowie 50-100 mg/100 g Quercetin ^[123]. Ausgehend von einer Standard-Probenmasse von 10 g der Sanddornbeeren (vgl. Kapitel 5.1.1) wurden schließlich Testlösungen mit jeweils 40 pg/mL Cyanocobalamin und folgenden Konzentrationen o.g. Test-Substanzen für den MBA hergestellt:

- Vitamin C-Testlösung – 213,3 pg/mL Ascorbinsäure,
- Quercetin-Testlösung – 16 pg/mL Quercetin,
- Chinasäure-Testlösung – 0,8 ng/mL Chinasäure.

In Abbildung 3-2 ist das Wachstumsverhalten des *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* in jeweiligen Testlösungen im Vergleich zum Wachstum des Testorganismus in einer 40 pg/mL Vitamin B₁₂-Standardlösung nach 24 h Kultivierungszeit in Abhängigkeit von der Vitamin B₁₂-Konzentration gezeigt.

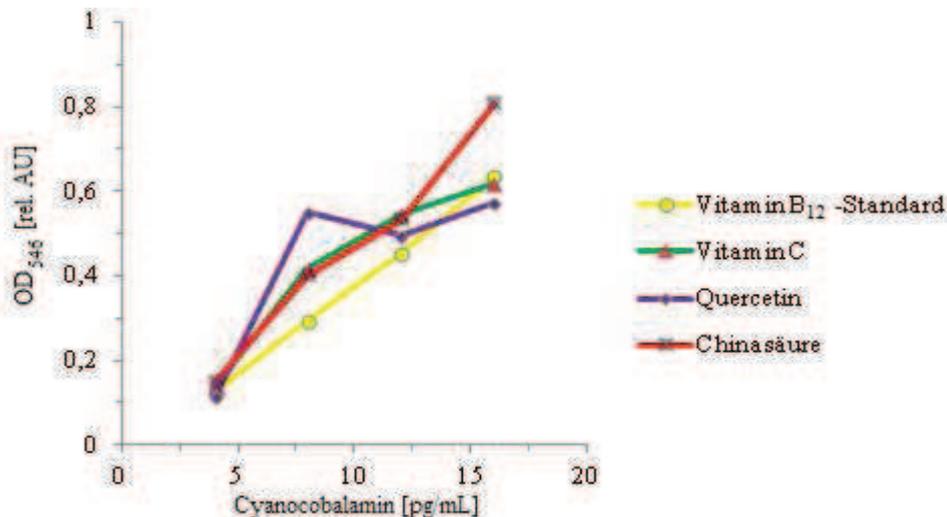


Abb. 3-2: Gegenüberstellung des Wachstumsverhaltens des *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* in Gegenwart von Vitamin C, Quercetin und Chinasäure neben Cyanocobalamin im Kulturmedium.

Es fällt auf, dass mit zunehmender Konzentration des Quercetins im Bereich von 3,2-6,4 pg/mL das Wachstum des Testorganismus *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* im Bereich der optischen Dichte von $OD_{546 \text{ nm}} = 0,5 \text{ rel. Au}$ konstant bleibt. Somit wirkt das Quercetin wachstumshemmend auf den Testorganismus. Die dabei resultierende durchschnittliche Abweichung der wiedergefundenen Vitamin B₁₂-Konzentration von der Konzentration der Standard-Lösung liegt bei 9,3 %. Bei 8 pg/mL Vitamin B₁₂ und 3,2 pg/mL Quercetin lag die Abweichung sogar bei 87,2 %.

Ein ganz anderes Verhalten lässt sich in Anwesenheit der Chinasäure beobachten, dabei wirkt diese wachstumsfördernd auf das Testorganismus. Hier ergibt sich eine durchschnittliche Abweichung von 25,4 %. Auch in Anwesenheit von Vitamin C lässt sich bei Konzentrationen von 42,6 pg/mL und 63,9 pg/mL Ascorbinsäure ein schnelleres Wachstum des Testorganismus beobachten, mit einer mittleren Abweichung der Wiederfindung von 24,9 %.

Sowohl in Anwesenheit von Quercetin und Vitamin C als auch der Chinasäure geht das lineare Wachstum des hier verwendeten Testorganismus *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* verloren. Obwohl die Testlösungen jeweils die gleiche Cyanocobalamin-Ausgangskonzentration von 40 pg/mL enthalten wie die Vitamin B₁₂-Standardlösung, unterscheiden sich die Wachstumskurven entscheidend voneinander. Damit lässt sich schlussfolgern, dass mit dem mikrobiologischen Nachweis unter Anwesenheit der o. g. Fruchtsäuren und Flavonoide in pflanzlichen Testlösungen falsche Vitamin B₁₂-Konzentrationen nachgewiesen werden. Damit ist diese Analytikmethode nur für Lebensmittel tierischen Ursprungs geeignet, für pflanzliche Matrices weist das MBA sehr geringe Selektivität und hohe Ungenauigkeit auf.

3.1.1.2 Enzymimmunoassay

Neben dem mikrobiologischen Nachweis kann die Konzentration von Vitamin B₁₂ auch immunologisch bestimmt werden. So wurde bis Anfang der 90er Jahre weitverbreitet das Isotopenverdünnungsassay verwendet ^[91, 92]. Das Messprinzip beruht auf einer Konkurrenzreaktion zwischen dem radioaktiv markierten Vitamin B₁₂ und dem nicht markierten Vitamin B₁₂ der Probe um die Bindungsstelle an ein natürliches Bindungsprotein. Diese Methode ist hochselektiv und kann Spurenkonzentrationen von Vitamin B₁₂ bis zu 1 pg/mL nachweisen ^[93]. Jedoch ist aufgrund der Radioaktivität der verwendeten Reagenzien eine spezielle Laborausstattung und auch speziell ausgebildetes Technikpersonal notwendig, was die Methode für Routineuntersuchungen unrentabel macht.

Anfang der 90er Jahre wurde erstmals eine neuartige immunologische Methode beschrieben, die auf dem Prinzip des ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) basiert ^[94]. Auch hier wird ein spezifischer Antikörper verwendet, um dessen

Bindungsstelle ein mit Peroxidase markiertes Vitamin B₁₂ (Enzymkonjugat) mit dem nicht markierten Vitamin B₁₂ der Probe bzw. Standard-Lösung konkurriert. Nicht gebundenes enzymmarkiertes Vitamin B₁₂ wird im anschließenden Waschschriff entfernt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch, wobei eine Farb-reaktion zwischen dem gebundenen Enzymkonjugat und einer Chromogenlösung abläuft, die mit einer Stopplösung gestoppt wird.

In dieser Arbeit wurde das gebrauchsfertige Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B₁₂ in Nahrungsmitteln der Firma Immunolab GmbH auf seine Kompatibilität mit dem Sanddornbeeren-Extrakt geprüft. Laut Hersteller beträgt die mittlere untere Nachweisgrenze des Tests 0,3 ng/mL Vitamin B₁₂ (bezogen auf die Standardkurve).

Da mit steigender Konzentration des Vitamin B₁₂ in der Probe bzw. Standardlösung immer weniger Enzymkonjugat an Vitamin B₁₂-spezifische Antikörper gebunden werden kann, ist die gemessene Extinktion umgekehrt proportional zur Vitamin B₁₂-Konzentration der Probe bzw. Standardlösung (siehe Abbildung 3-3, genaue Beschreibung der Testdurchführung siehe Anhang Kapitel 5.1.6).

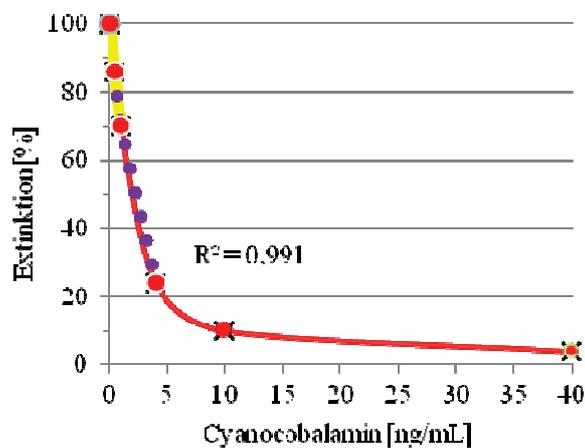


Abb. 3-3: Standard-Extinktionskurve des Immunolab Vitamin B₁₂ Tests. Es wurden die im Test enthaltenen fertigen Vitamin B₁₂-Standardlösungen in folgenden Konzentrationen verwendet: 0; 0,4; 1; 4; 10; 40 ng/mL. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm. Die rote unterbrochene Linie zeigt den für die Analyse relevanten Konzentrationsbereich.

Der Kurvenverlauf der Extinktion in der Abbildung 3-3 zeigt, dass schon bei einer Konzentration von 10 ng/mL Vitamin B₁₂ die Sättigung erreicht wird. Die Vitamin

B₁₂-Konzentration der Probe muss daher in einem Konzentrationsbereich von 0,4–4 ng/mL liegen, damit ist nur ein knapper Konzentrationsbereich umfasst.

Die Wiederfindung des Cyanocobalamins mittels Immunolab Vitamin B₁₂-Tests wurde in reinen wässrigen Vitamin B₁₂-Lösungen (Blindproben) sowie in den mit gleicher Cyanocobalamin-Konzentration wie die Blindproben versetzten Rinderfleisch- und Sanddornbeeren-Extrakten bestimmt. In der Tabelle 3-1 und Abbildung 3-4 sind die Wiederfindungsraten in den jeweiligen Extrakten wiedergegeben.

Tabelle 3-1: Wiederfindung des Cyanocobalamins in Fleisch- und Sanddornbeeren-Extrakten mittels des Immunolab Vitamin B₁₂-Tests.

Probe-Lösung	Wiederfindung [%]	Varianz σ^2
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	105,8 ± 0,9	0,43
Fleisch-Extrakt	97,5 ± 1,1	0,64
Sanddornbeeren-Extrakt	82,1 ± 10,8	78,5

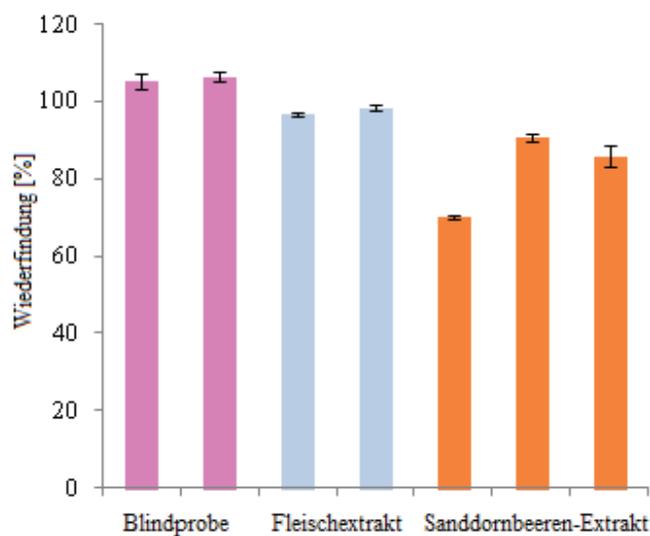


Abb. 3-4: Wiederfindung von Vitamin B₁₂ mittels des Immunolab Vitamin B₁₂-Tests in reiner wässriger Cyanocobalamin-Lösung, im Fleisch- und Sanddornbeeren-Extrakt.

Insbesondere aus Abbildung 3-4 geht deutlich hervor, dass mittels ELISA in reiner Cyanocobalamin-Probe als auch in Fleischproben Wiederfindungen von 97 – 100 % mit geringen Varianzen ($\sigma^2 < 1$) erzielbar sind, während in Sanddornbeeren-Extrakten der Test eine durchschnittliche Wiederfindung von 82 % mit einer sehr hohen Varianz aufweist. Damit ist auch diese Analytikmethode aufgrund seiner

mangelnden Genauigkeit nicht zur Bestimmung des Vitamin B₁₂-Gehaltes in pflanzlichen Matrices geeignet.

3.1.2 Der Nachweis von Vitamin B₁₂ mittels RP-HPLC

In der Literatur lassen sich zahlreiche Publikationen zur Vitamin B₁₂-Bestimmung mittels RP-HPLC mit UV/Vis-Detektion finden ^[95-100]. Zur Lebensmittelqualitätskontrolle hatte die UV/Vis-Detektion jedoch in Proben ohne künstliche Cyanocobalamin-Supplementierung mangelnde Sensitivität gezeigt. Mittels der Fluoreszenz-Detektion wurde versucht die Empfindlichkeit der Messung zu erhöhen ^[101]. Die Methode erfordert jedoch eine Derivatisierung des nicht natürlich fluoreszierenden Vitamin B₁₂ ^[102], die neben mühseliger Aufarbeitung der Probe auch einen Verlust an Vitamin B₁₂ und damit eine Verfälschung des Ergebnisses mit sich bringt. Es wurden andere Hybrid-Methoden, die auf RP-HPLC basieren, vorgeschlagen, die u.a. auf der spezifischen Detektion des Vitamins mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) ^[103], Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES) ^[104], Kapillarelektrophorese (CE) ^[105] und Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ^[106], beruhen. Diese Methoden erlauben zwar eine schnelle und spezifische Vitamin B₁₂-Bestimmung, weisen jedoch hohe Nachweisgrenzen zwischen 600 ng/g und 150 mg/g Vitamin B₁₂ auf und sind damit über dem typischen Vitamin B₁₂-Gehalt in Lebensmitteln, der gewöhnlich im Konzentrationsbereich zwischen 3-20 ng/g liegt. Die oft komplexe und in ihrer Zusammensetzung variierende Matrix der zu untersuchenden Lebensmittel macht die Bestimmung des nur in Spuren enthaltenen Vitamin B₁₂ besonders schwierig. Eine vorherige chromatographische Aufreinigung der Proben minimiert nicht nur die Matrixeffekte, sondern ermöglicht gleichzeitig durch eine Volumenminderung auch eine Aufkonzentrierung des Vitamin B₁₂ und damit eine Intensivierung seiner Detektion. Prinzipiell wechselwirken Cobalamine am besten mit C8- und C18-Materialien. In der Literatur lassen sich unterschiedliche Ansätze für eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) des Vitamin B₁₂ finden, wobei das Vitamin entweder mit reinem oder verdünntem Methanol von der C18-Säule eluiert wird ^[107-109]. Zwar stellt SPE eine elegante, schnelle und aufgrund der Wiederverwendbarkeit der SPE-Kartuschen auch kostengünstige Aufarbeitungsmethode dar, ist jedoch nicht für jede Probenmatrix geeignet, wie beispielweise für

Proben mit einem hohen Öl- und Fettgehalt oder komplexe Lebensmittelproben. Eine weitere kombinierte SPE-Methode für die Vitamin B₁₂-Aufreinigung stellt die Immunoaffinitätschromatographie dar, die auf einem immunologischen Erkennungsmechanismus beruht. In diesem Kapitel soll die klassische SPE-Aufreinigungsmethode mit der Immunoaffinitätschromatographie verglichen werden.

3.1.2.1 Festphasenextraktion (SPE)

Für eine Festphasenextraktion des Vitamin B₁₂ wurden 500 mg/6 mL große C18 SPE-Kartuschen (Strata C18-E, Phenomenex) verwendet. Um die Retention des Vitamin B₁₂ an diesem C18-Material zu testen, wurden 100 mL einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung auf die Kartuschen appliziert und anschließend mit einem methanolischen Stufengradient eluiert, wobei die Polarität des Eluenten fortwährend zunahm. In der Tabelle 3-2 sind die Fraktionen und Arbeits- bzw. Elutionsschritte tabellarisch wiedergegeben.

Tabelle 3-2: Arbeits- und Elutionsschritte der SPE-Aufreinigung einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung auf der Strata C18-E SPE-Kartusche und einem methanolischen Stufengradient mit aufsteigender Polarität zur Elution.

Fraktion	Volumen der verwendeten Lösung	Arbeitsschritt
Fraktion 1	100 mL Probe	Beladung
Fraktion 2	5 mL Wasser	Waschen
Fraktion 3	5 mL 100 % Methanol	Elution
Fraktion 4	5 mL Methanol/H ₂ O (4:1)	
Fraktion 5	5 mL Methanol/H ₂ O (3:2)	
Fraktion 6	5 mL Methanol/H ₂ O (2:3)	
Fraktion 7	5 mL Methanol/H ₂ O (1:4)	
Fraktion 8	5 mL Wasser	

Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend unter Verwendung einer klassischen RP-HPLC-Säule (Phenomenex C18, Methodenbeschreibung siehe Anhang Kapitel 5.1.4.3) chromatographisch untersucht. Die Abbildung 3-5 zeigt das Chromatogramm der einzelnen Fraktionen, aus dem hervorgeht, dass das Vitamin B₁₂ tatsächlich an der Strata C18-Kartusche retentiert wird. Sowohl nach dem Auftragen der Probe auf die Kartusche (Fraktion 1) als auch nach dem Waschschrift (Fraktion 2) kann kein Vitamin B₁₂ detektiert werden. Durch die Erniedrigung der

Polarität des Laufmittels lässt sich anschließend das Vitamin mit dem 100 %-igem Methanol eluieren (Fraktionen 3 und 4). In den nachfolgenden Fraktionen 5 bis 8 kann mit zunehmendem Wasseranteil und damit auch zunehmender Polarität des Eluenten kein Vitamin B₁₂ mehr detektiert werden. Auf diese Weise konnten jedoch nur 62,7 % des Cyanocobalamins wiedergefunden werden.

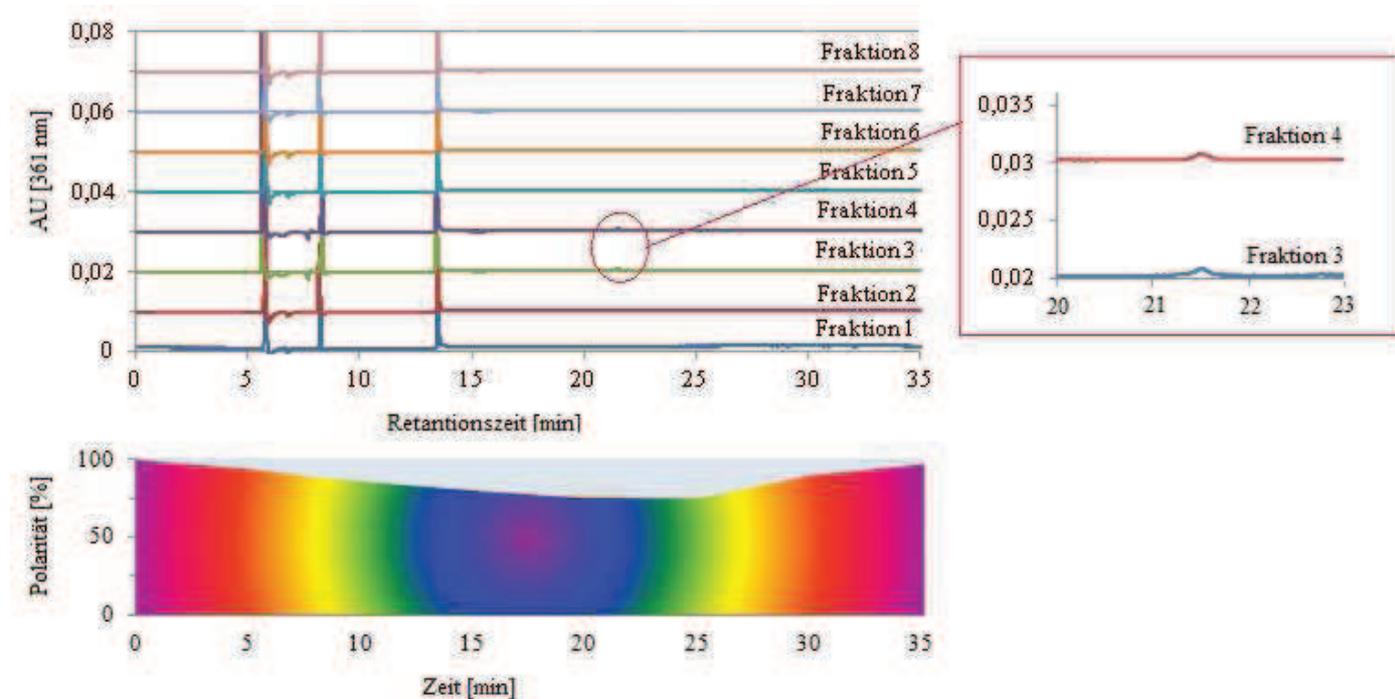


Abb. 3-5: RP-HPLC-Chromatogramm einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung nach der SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und einem methanolischen Stufengradient mit aufsteigender Polarität zur Elution. Das untere Flächendiagramm zeigt die Polarität des Elutionsgradienten der verwendeten RP-HPLC-Methode (Säule Phenomenex C18 Gemini-NX, 5 µm, 110 Å, 250 x 4,6 mm, Vorsäule: C18, Injektionsvolumen 100 µL, Wellenlänge 361 nm).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss der inversen Elution mit polaren Eluenten auf die Wiederfindungsrate von Vitamin B₁₂ untersucht. Hierbei wurde die Polarität des Eluenten durch Zusatz von Natriumdihydrogenphosphat erhöht. Die Tabelle 3-3 zeigt die Arbeits- und Elutionsschritte dieser Festphasenextraktion.

Die Abbildung 3-6 zeigt das RP-HPLC-Chromatogramm der SPE-Fractionen nach einer inversen Elution von Vitamin B₁₂ mit Stufengradienten (Methodenbeschreibung siehe Anhang Kapitel 5.1.4.3).

Tabelle 3-3: Arbeits- und Elutionsschritte der SPE-Aufreinigung einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung auf einer Strata C18-E SPE-Kartusche mit methanolischem polaren Stufengradienten zur Elution.

Fraktionen	Volumen der verwendeten Lösung	Arbeitsschritt
Fraktion 1	100 mL Probe	Beladung
Fraktion 2	5 mL 0,05 M NaH ₂ PO ₄	Waschen
Fraktion 3	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (1:4)	Elution
Fraktion 4	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (2:3)	
Fraktion 5	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (3:2)	
Fraktion 6	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (4:2)	
Fraktion 7	5 mL 100 % Methanol	

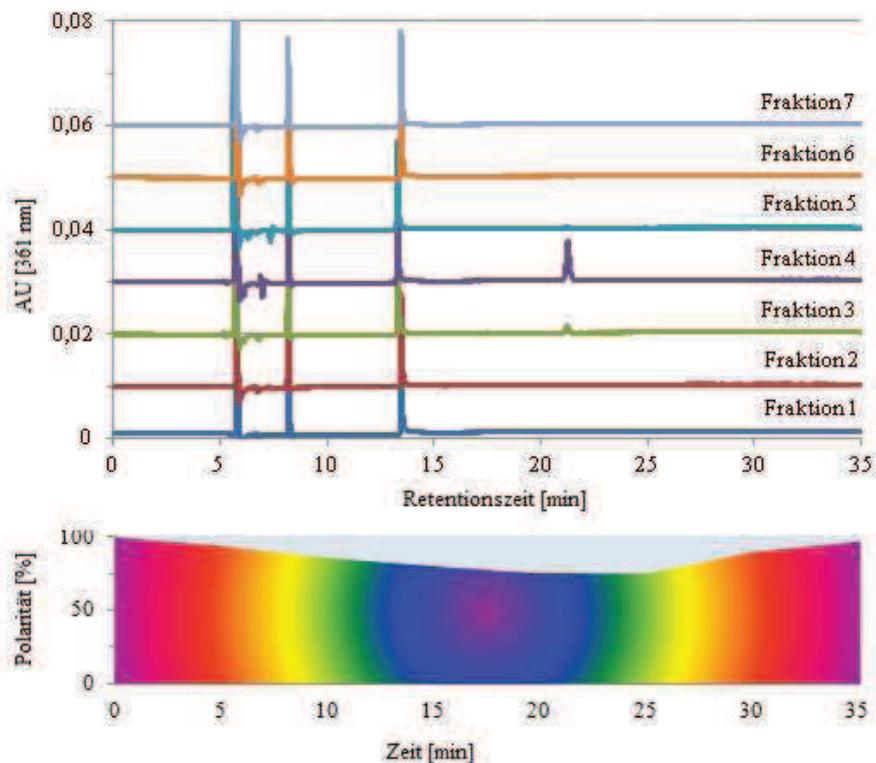


Abb. 3-6: RP-HPLC-Chromatogramm einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung nach der SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und methanolischem polaren Stufengradienten zur Elution. Das untere Flächendiagramm zeigt die Polarität des Elutionsgradienten der verwendeten RP-HPLC-Methode (Säule Phenomenex C18 Gemini-NX, 5 µm, 110 Å, 250 x 4,6 mm, Vorsäule: C18, Injektionsvolumen 100 µL, Wellenlänge 361 nm).

Auch hier ist aufgrund der starken Retention des Vitamins an der C18-Säule zunächst kein Signal messbar. Beim Eluieren der Säule mit polarer Hauptkomponente des Laufmittels und etwa 33 %-igem Anteil an Methanol kann nach 21,26 min ein schwaches Signal des Vitamin B₁₂ detektiert werden (Fraktion 3). Nach Elution mit 40 %-igem Methanol kann ein scharfer Peak von Cyanocobalamin

gemessen werden. Dabei wird das Vitamin nahezu vollständig von der Säule eluiert, sodass in Fraktion 5 nur noch ein schwacher Peak detektiert werden kann. Auf diese Weise lassen sich nach der SPE-Aufreinigung von 100 mL einer wässrigen 0,065 µg/mL Cyanocobalamin-Lösung 101,54 % des Vitamins wiederfinden.

In Lebensmitteln tierischer Herkunft liegen Cobalamine meistens in Spurenkonzentrationen von bis zu 70 µg/100 g vor (vgl. Kapitel 2.1.2, Tabelle 2-1). In pflanzlichen Lebensmitteln sind die Cobalamin-Konzentrationen weitaus geringer. Auch weisen pflanzliche Proben eine sehr komplexe Matrix mit hohem Gehalt sowohl an polaren als auch unpolaren Komponenten auf. Die oben beschriebene Elutionsmethode mit einem polaren Stufengradienten zeigt eine sehr gute Wiederfindung in einer wässrigen Vitamin B₁₂-Standardlösung. Der auf die SPE-Säule aufgetragene Cyanocobalamin kann jedoch mit dieser Elutionsmethode nicht in einem Schritt eluiert werden, sondern ist in unterschiedlichen Konzentrationen auf mehrere Fraktionen verteilt. Insbesondere bei niedrigen Cobalamin-Konzentrationen, wie sie in pflanzlichen Proben anzutreffen sind, wird die Wiederfindung bei realen Proben mit der oben beschriebenen Festphasenextraktion und dem zur Elution verwendeten polaren Stufengradient, eingeschränkt sein. Damit ist diese Extraktionsmethode aufgrund der Verteilung des eluierten Vitamin B₁₂ auf mehrere Fraktionen, trotz der sehr guten Wiederfindung des Vitamins in einer reinen wässrigen Cyanocobalamin-Lösung für reale Proben nicht geeignet.

Die Festphasenextraktion wurde im nächsten Schritt auf ihre Eignung zur Extraktion des Vitamin B₁₂ aus einer realen pflanzlichen Probe untersucht. Verwendet wurden hierzu 100 mL eines Sanddornbeeren-Extrakts aus 10 g Sanddornbeeren, der mit 0,065 µg/mL Cyanocobalamin versetzt wurde. Als Elutionsmethode wurde eine Kombination aus der in Tabelle 3-2 und 3-3 vorgestellten Methoden gewählt, wobei im ersten Elutionsschritt mit reinem Methanol und in den nachfolgenden Elutionsschritten die Polarität des Eluenten durch steigenden Volumenanteil an NaH₂PO₄-Lösung erhöht wurde. Das Ziel war hierbei möglichst viele unpolare Komponenten des Sanddornbeeren-Extrakts von der SPE-Säule zu eluieren und eine möglichst gute Trennung des eluierten Vitamin B₁₂ zu gewährleisten. In der Tabelle 3-4 sind die einzelnen Arbeits- und Elutionsschritte wiedergegeben.

Tabelle 3-4: Arbeits- und Elutionsschritte der Festphasenextraktion eines mit 0,065 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes unter Verwendung einer Strata C18-E SPE-Kartusche und einem Stufengradienten mit steigender Polarität zur Elution.

Fraktionen	Volumen der verwendeten Lösung	Arbeitsschritt
Fraktion 1	100 mL Probe	Beladen
Fraktion 2	5 mL 0,05 M NaH ₂ PO ₄	Waschen
Fraktion 3	5 mL 100 % Methanol	Elution
Fraktion 4	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (4:1)	
Fraktion 5	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (3:2)	
Fraktion 6	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (2:3)	
Fraktion 7	5 mL Methanol/0,05 M NaH ₂ PO ₄ (1:4)	

In der Abbildung 3-7 ist das RP-HPLC-Chromatogramm des mit Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes nach der SPE-Aufreinigung wiedergegeben.

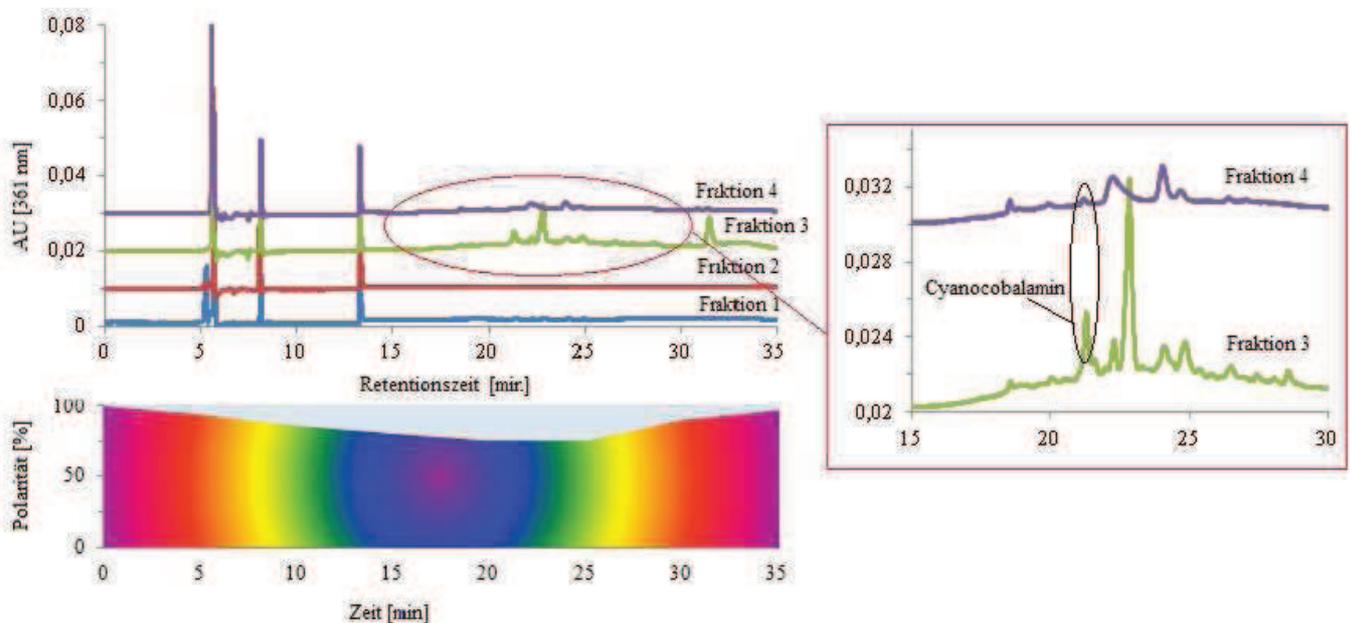


Abb. 3-7: RP-HPLC-Chromatogramm des mit 0,065 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes nach einer SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und einem Stufengradienten mit steigender Polarität zur Elution. Das untere Flächendiagramm zeigt die Polarität des Elutionsgradienten der verwendeten RP-HPLC-Methode (Säule Phenomenex C18 Gemini-NX, 5 µm, 110 Å, 250 x 4,6 mm, Vorsäule: C18, Injektionsvolumen 100 µL, Wellenlänge 361 nm).

Auch in diesem Falle konnte sowohl nach der Aufgabe der Probe, als auch nach dem Waschen der Säule kein Vitamin B₁₂ detektiert werden. Nach der methanolischen Elution dagegen konnte in der Fraktion 3 in der 21,33 min ein deutlicher Peak des Cyanocobalamins detektiert werden. Auffällig ist hierbei der Verlust der Basislinie

zwischen der 16. und der 35. Minute. Auch bei dem Cyanocobalamin-Peak nach 21,33 min handelt es sich um einen Doppel-Peak, was auf eine unzureichende Trennung schließen lässt. Allgemein zeigt sich bei der Verwendung der in der Tabelle 3-4 beschriebenen Elutionsmethode der Trend zur Detektion einer hohen Anzahl von unpolaren Komponenten. Auf diese Weise lassen sich keine präzisen quantitativen Aussagen über die Cobalaminkonzentration treffen.

Um die Anzahl der unpolaren Komponenten im RP-HPLC-Chromatogramm zu minimieren, musste die Elutionsmethode aus der Tabelle 3-4 ergänzt werden, mit dem Ziel die an der C18-SPE-Säule gebundenen unpolaren Komponenten durch die Elution mit einem unpolaren Lösemittel zu entfernen. Da das Vitamin B₁₂ sich gut in protischen polaren organischen Lösemitteln löst, wurde zur Entfernung der restlichen unpolaren Komponenten das Acetonitril gewählt. Um die Qualität der Elutionsmethode und der anschließenden Trennung besser abschätzen zu können wurde die Konzentration des zugesetzten Cyanocobalamins auf 0,5 µg/mL im Sanddornbeeren-Extrakt erhöht. In der Tabelle 3-5 sind die einzelnen durchgeführten Arbeits- und Elutionsschritte wiedergegeben.

Tabelle 3-5: Arbeits- und Elutionsschritte der Festphasenextraktion eines mit 0,5 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extraktes unter Verwendung einer Strata C18-E SPE-Kartusche und einem Acetonitril-haltigen Stufengradienten zur Elution.

Fraktionen	Volumen der verwendeten Lösung	Arbeitsschritt
Fraktion 1	100 mL Probe	Beladen
Fraktion 2	5 mL H ₂ O	Waschen
Fraktion 3	3 mL 100 % ACN	Elution
Fraktion 4	3 mL ACN/H ₂ O (4:1)	
Fraktion 5	3 mL ACN/H ₂ O/Methanol (6:3:1)	

Die Abbildung 3-8 zeigt das RP-HPLC-Chromatogramm des Sanddornbeeren-Extraktes nach der SPE-Aufreinigung und Acetonitril-haltiger Elution.

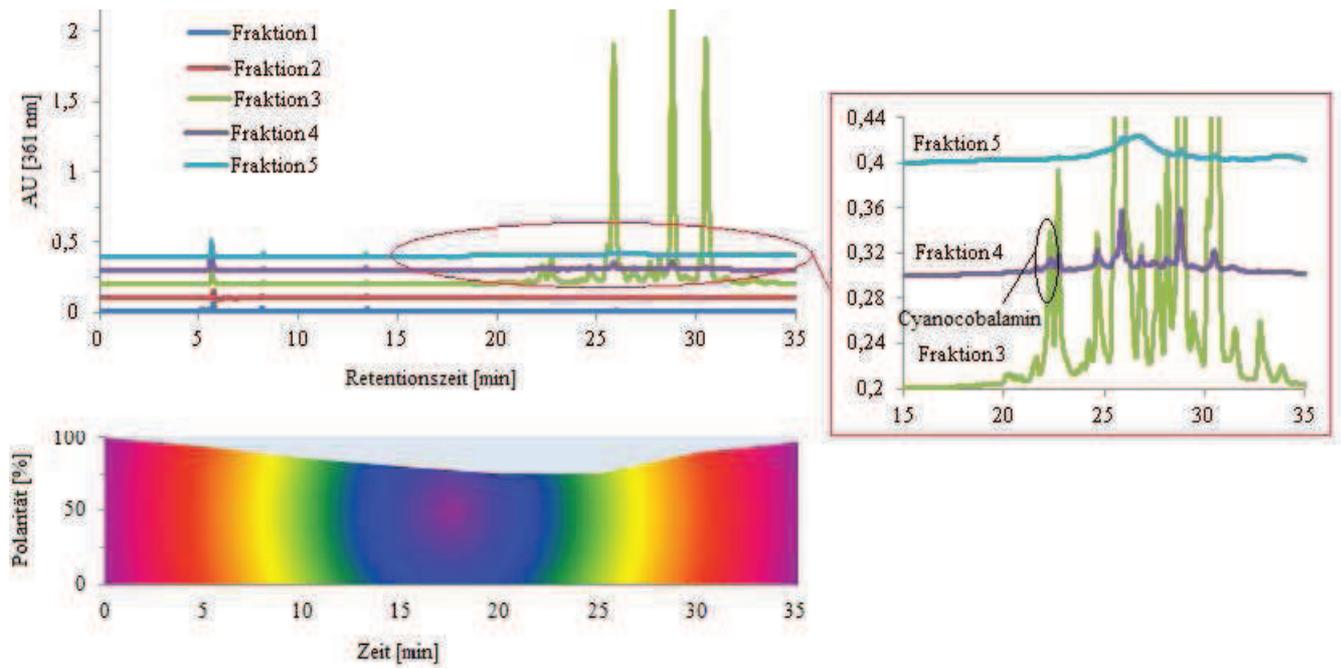


Abb. 3-8: RP-HPLC-Chromatogramm des mit 0,5 µg/mL Cyanocobalamin versetzten Sanddornbeeren-Extrakttes nach einer SPE-Aufreinigung mit Strata C18-E und einer ACN-haltigen Elution. Das untere Flächendiagramm zeigt die Polarität des Elutionsgradienten der verwendeten RP-HPLC-Methode (Säule Phenomenex C18 Gemini-NX, 5 µm, 110 Å, 250 x 4,6 mm, Vorsäule: C18, Injektionsvolumen 100 µL, Wellenlänge 361 nm).

Nach der oben beschriebenen Elutionsmethode nehmen die Intensität und die Anzahl der unpolaren Komponenten deutlich zu (vgl. Abbildungen 3-7 und 3-8). Nach 22,28 min kann das Cyanocobalamin detektiert werden. Es folgte jedoch dem Signal des Vitamins dicht ein Signal einer weniger polaren unbekanntes Komponente des Sanddornbeeren-Extrakttes, sodass es auch hier zur Ausbildung eines nicht quantifizierbaren Doppelpeaks kommt.

Damit ist die Festphasenextraktion des Vitamin B₁₂ aus Sanddornbeeren- und anderen pflanzlichen Extrakten wegen seines geringen Gehalts in pflanzlichen Lebensmitteln, der komplexen Matrix der Pflanzenextrakte und der mangelnden Spezifität der C18-Materialien gegenüber dem Cyanocobalamin, als eine Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsmethode, zur Probenvorbereitung für RP-HPLC-Analyse ungeeignet.

3.1.2.2 Immunoaffinitätschromatographische Festphasenextraktion (IAC-SPE)

Die immunoaffinitätschromatographische Festphasenextraktion (im Folgenden als IAC-SPE abgekürzt) basiert auf dem immunologischen Erkennungsmechanismus. Damit ermöglicht sie eine spezifische Extraktion mit hoher Selektivität, die auf der hohen Affinität des spezifischen Antikörpers gegenüber dem zu trennenden Stoff beruht. Es können hochspezifische Extraktionen von Substanzen erzielt werden, die nur in Spuren in pharmazeutischen, biologischen oder Nahrungsmittelproben vorhanden sind.

In dieser Arbeit wurden die EASI-EXTRACT® Vitamin B₁₂ IAC-SPE-Säulen von R-Biopharm AG auf ihre Selektivität und Wiederfindung gegenüber dem Vitamin B₁₂ geprüft. Die Säulen enthalten einen monoklonalen Antikörper, der eine hohe Selektivität und Affinität gegenüber dem Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂) aufweist. Der Antikörper ist kovalent an das mit Bromcyan aktivierte Agarosegel gebunden. Es können insgesamt 35 mL des Extraktes auf die Säule aufgetragen werden (Fraktion 1). Dabei soll laut Hersteller der Vitamin B₁₂-Gehalt der Probe, der auf die EASI-EXTRACT Säule aufgetragen wird, im Bereich von 0,01 – 0,5 µg liegen. Die maximale Bindungskapazität beträgt bei 1,0 µg Vitamin B₁₂. Nach dem Waschen der Säule mit 10 mL milliQ Wasser (Fraktion 3) wird das an der Säule retentierte Vitamin B₁₂ mit 5 mL Methanol, unter gelegentlichem Rückspülen und einer Flussrate von 1 Tropfen/s, eluiert (Fraktion 3). Nach dem Gefriertrocknen des Eluats wird dieses vor der RP-HPLC-Analyse in 500 µL Methanol wiederaufgenommen (genaue Extraktionsdurchführung und verwendete HPLC-Methode siehe Anhang, Kapitel 5.1.4.1 und 5.1.4.3). In der Abbildung 3-9 sind die RP-HPLC-Chromatogramme der Fraktionen 1–3 gezeigt, wobei insgesamt 100 mL einer 8,5 ng/mL Vitamin B₁₂-Lösung mittels IAC-SPE aufgereinigt wurden. Dabei kann auch hier eine sehr gute Retention des Vitamin B₁₂ auf der Säule erzielt werden, wie in den Chromatogrammen der ersten beiden Fraktionen zu sehen ist. In der Fraktion 3 ist nach 22,64 min ein scharfer Peak des Cyanocobalamins zu beobachten, wobei eine Wiederfindungsrate von $102,2 \pm 1,9$ % erzielt werden kann.

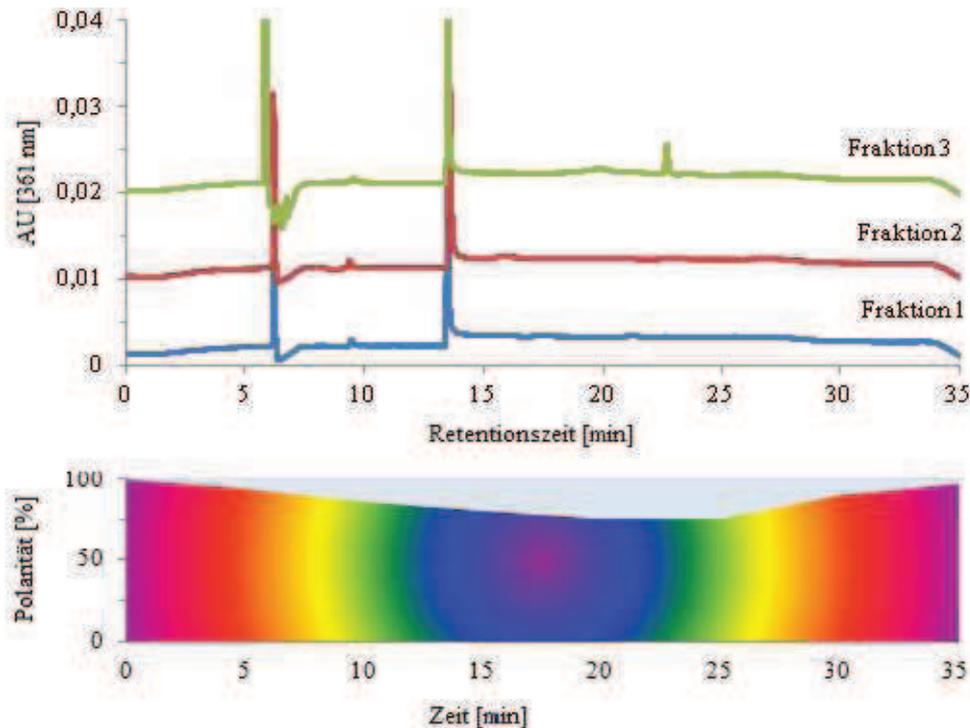


Abb. 3-9: RP-HPLC-Chromatogramm von 100 mL einer 8,5 ng/mL Cyanocobalamin-Lösung nach einer IAC-SPE-Aufreinigung. Das untere Flächendiagramm zeigt die Polarität des Elutionsgradienten der verwendeten RP-HPLC-Methode (Säule Phenomenex C18 Gemini-NX, 5 μm , 110 \AA , 250 x 4,6 mm, Vorsäule: C18, Injektionsvolumen 100 μL , Wellenlänge 361 nm).

Zur Überprüfung der Kompatibilität dieser Aufreinigungsmethode mit realen Extrakten, wurde die IAC-SPE jeweils auf einen mit einer bestimmten Menge Vitamin B₁₂ versetzten Sanddornbeeren- und Rindfleisch-Extrakt angewendet. Die Extrakte wurden jeweils aus 10 g Sanddornbeeren und 5 g frisches Rindfleisch hergestellt und mit insgesamt 0,85 μg Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) auf 100 mL Extrakt versetzt. Die Abbildungen 3-10 und 3-11 zeigen die RP-HPLC-Chromatogramme des Sanddornbeeren- und Fleisch-Extraktes nach der IAC-SPE-Aufreinigung.

Sowohl in Abb. 3-10 als auch in Abb. 3-11 ist zu erkennen, dass auch bei realen tierischen und pflanzlichen Extraktproben eine gute Retention des Vitamin B₁₂ an der Säule beobachtet werden kann. Weder in der Fraktion 1, nach dem Auftragen der Probe, noch nach dem Waschen der Säule mit milliQ Wasser (Fraktion 2) konnte Vitamin B₁₂ detektiert werden.

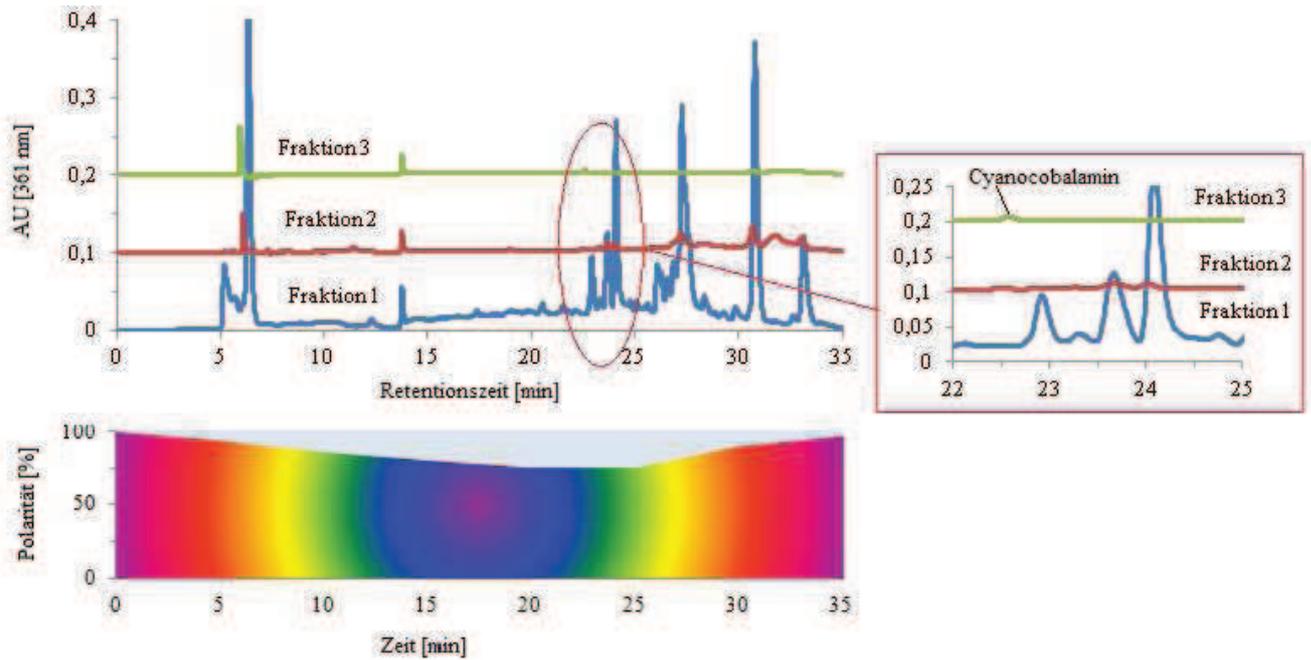


Abb. 3-10: RP-HPLC-Chromatogramm der 100 mL eines mit 0,85 μg Vitamin B₁₂ versetzten Sanddornbeeren-Extraktes nach einer IAC-SPE-Aufreinigung. Das Flächendiagramm zeigt die Polarität des Elutionsgradienten der verwendeten RP-HPLC-Methode (Säule Phenomenex C18 Gemini-NX, 5 μm , 110 Å , 250 x 4,6 mm, Vorsäule: C18, Injektionsvolumen 100 μL , Wellenlänge 361 nm).

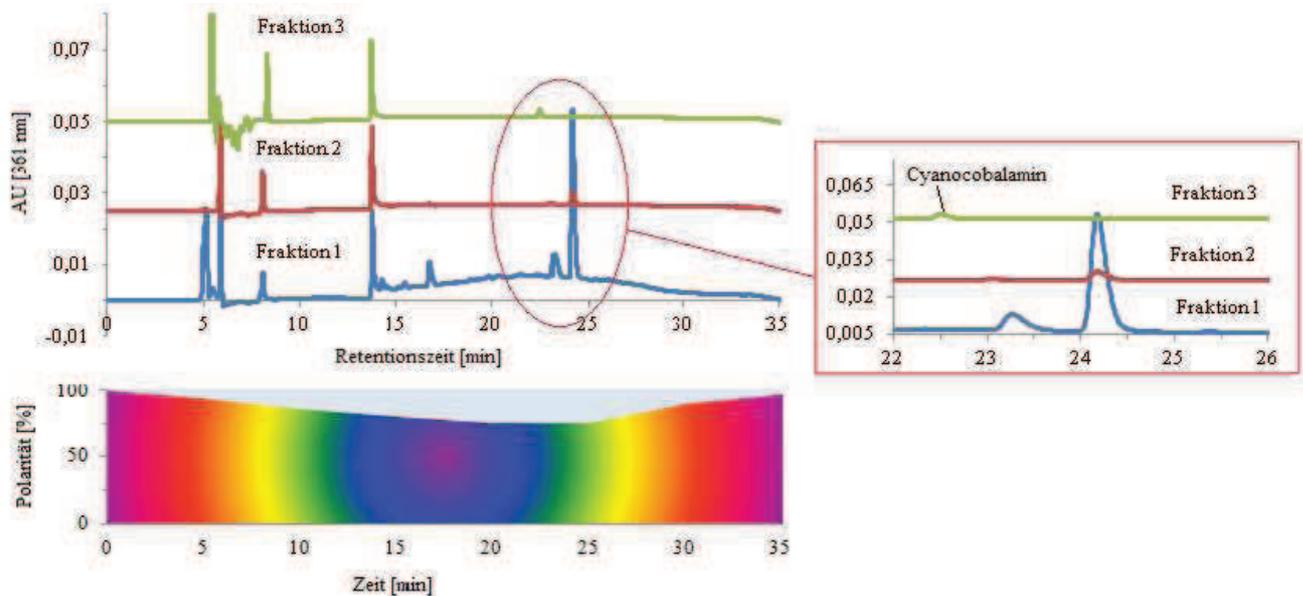


Abb. 3-11: RP-HPLC-Chromatogramme der 100 mL eines mit 0,85 μg Vitamin B₁₂ versetzten Rindfleisch-Extraktes nach einer IAC-SPE-Aufreinigung. Das Flächendiagramm zeigt die Polarität des Elutionsgradienten der verwendeten RP-HPLC-Methode (Säule Phenomenex C18 Gemini-NX, 5 μm , 110 Å , 250 x 4,6 mm, Vorsäule: C18, Injektionsvolumen 100 μL , Wellenlänge 361 nm).

Die Abbildungen 3-10 als auch 3-11 zeigen, dass nach der IAC-SPE eine sehr gute Trennung des Vitamin B₁₂ unter der Beibehaltung der Basislinie erzielt werden kann.

Im Sanddornbeeren-Extrakt lassen sich auf diese Weise $85,8 \pm 2,1$ % Cyanocobalamin wiederfinden, im Fleisch-Extrakt liegt die Wiederfindungsrate mit 87,14 % im vergleichbaren Bereich wie im Sanddornbeeren-Extrakt. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde die verwendete RP-HPLC-Analytikmethode durch den Ersatz der C18 HPLC-Säule von Phenomenex durch eine auf der Core-Shell Technologie basierende Kinetex C18-Säule (Phenomenex) weiter optimiert. Im Unterschied zu einer klassischen C18 HPLC-Säule mit porösen Siliciumdioxid-Kernen, besteht die Kinetex C18 HPLC-Säule aus festen Kernen des Siliciumdioxids, die mit einer porösen Kohlenwasserstoffschicht ummantelt sind (Core-Shell Technologie). Auf diese Weise werden höhere Bodenzahlen als bei vergleichbaren Säulen mit porösen Siliciumdioxid-Kernen erzielt und die Bandenverbreiterung minimiert. Somit konnten mit dieser HPLC-Methode die Nachweisgrenze von $0,25 \mu\text{g/mL}$ auf $0,17 \mu\text{g/mL}$ Cyanocobalamin, ebenso wie die Analysenzeit von 35 min auf 15 min erniedrigt werden (vgl. Anhang, Kapitel 5.1.4.2 und 5.1.4.3).

3.1.3 Diskussion

Die oben gezeigten Ergebnisse der Varianzen und der Wiederfindungsraten beschriebener Analytikmethoden für Vitamin B₁₂, weisen in Abhängigkeit von der Probenmatrix Unterschiede auf. So stellt der MBA die älteste biologische Analytikmethode für Cobalamin dar, die in tierischen Proben eine Wiederfindungsrate für Vitamin B₁₂ von über 90 % aufweist. In Proben pflanzlicher Herkunft dagegen liegt die Wiederfindung dagegen bei nur 22 % (vgl. Abbildungen 3-1 und 3-2). Dieses Ergebnis ist mit dem in der Abbildung 3-2 gezeigten Wachstumsverhalten des Testorganismus in Anwesenheit einiger pflanzlicher Naturstoffe erklärbar, die beispielsweise in den für diese Arbeit relevanten Sanddornbeeren vorkommen. Dabei fällt auf, dass insbesondere das lineare Wachstumsverhalten des Testorganismus durch das Einwirken der Flavonoide und der Ascorbinsäure verloren geht, und mit höherem Gehalt dieser Naturstoffe in der Testprobe verlangsamt wird. Damit korrelieren die erzielten Ergebnisse und Beobachtungen mit den Literaturangaben ^[88,89], gemäß denen die Methode zahlreiche Mängel in Genauigkeit und Spezifität gegenüber Vitamin B₁₂ in Anwesenheit weiterer Bestandteile der Testprobe aufweist. Diese Methode ist somit für pflanzliche

Matrizes mit hohem Fruchtsäure- und Flavonoid-Gehalt aufgrund der Wachstumsinhibierung des Testorganismus und daraus resultierender Ungenauigkeit in der Quantifizierung des Vitamin B₁₂, nicht geeignet.

Die photometrische Vitamin B₁₂-Bestimmung mittels ELISA ist eine relativ weit verbreitete Nachweismethode in der Lebensmittelanalytik, ist jedoch für Routineuntersuchungen kostenspielig und, aufgrund des engen verwendbaren Konzentrationsbereichs nur, für Testproben mit bereits bekannten Cobalamin-Konzentrationen, wie für Vitaminzubereitungen oder mit Vitamin B₁₂ supplementierte Lebensmittel, geeignet. Die Methode weist zwar deutlich bessere Wiederfindungsraten auf als der MBA, zeigt jedoch auch eine sehr hohe Varianz der Wiederfindungsrate in den für diese Arbeit relevanten Sanddorn-Proben. Mit dieser Methode lassen sich hohe Vitamin B₁₂-Wiederfindungsraten von 98 % und 106 %, mit geringen Varianzen sowohl in Fleisch-Proben als auch in reinen Vitamin B₁₂-Lösungen, erzielen. Dagegen konnten in der pflanzlichen Sanddorn-Probe nur 82 % Vitamin B₁₂ mit hohen Abweichungen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3-1 und Abb. 3-4). Auch dieses Ergebnis lässt sich auf die Korrelation des verwendeten Konjugats mit weiteren reduktionsfähigen Bestandteilen der Testprobe zurückführen, die die Bindung zwischen dem Konjugat und Vitamin B₁₂ der Probe beeinflussen. So berichtete bereits Reichert et al., dass Nebenbestandteile der Probe das Analyseergebnis stark beeinflussen können, wobei hohe Vitamin C-Konzentrationen in der Probe sogar höhere Vitamin B₁₂-Konzentrationen vortäuschen können ^[94]. Damit ist auch diese Analytikmethode für die in dieser Arbeit relevanten Sanddornbeeren sowie weitere pflanzliche Proben mit unbekanntem Vitamin B₁₂- und einem hohen Vitamin C-Gehalt ungeeignet.

Als Nächstes stellte sich als eleganteste und schnellste Lösung zur Serienbestimmung von Vitamin B₁₂ in pflanzlichen Proben, die RP-HPLC dar. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Testproben und der gleichzeitig nachzuweisenden Spurenkonzentrationen des essentiellen Cobalamins, musste eine geeignete Methodik zur Aufreinigung und -konzentrierung des Vitamins vor der RP-HPLC-Untersuchung gefunden werden. Hierzu wurden die hydrophobe (SPE) und die Affinitäts-Festphasenextraktion (IAC-SPE) getestet. Der Vitamin B₁₂-Gehalt in Lebensmitteln liegt in der Regel in Spurenkonzentrationen von 3-20 ng/g vor, daher

muss die SPE vor allem die in ihrer Konzentration dominierenden Haupt- und Nebenbestandteile der pflanzlichen Lebensmittel nicht retentieren, um eine effektive Aufkonzentrierung des Vitamin B₁₂ zu erzielen. Die verwendete unpolare C18-Kartusche wies zwar sehr gute Wechselwirkungen mit Vitamin B₁₂ auf, bei einer realen mit Vitamin B₁₂ supplementierten Sanddornbeeren-Probe jedoch ließ sich keine genügende Quantifizierung des Vitamins erzielen, wobei die Quantifizierung des Vitamin B₁₂ erschwert war. Es zeigte sich der Verlust der Basislinienstabilität des HPLC-Chromatogramms, bedingt durch die, nach der SPE-Aufreinigung in der Probe immer noch in großer Zahl vorhandener, unbekannter Bestandteile mit unpolaren Eigenschaften. Aufgrund der ungenügenden Trennung des Vitamin B₁₂-Signals von Störkomponenten der Probe kam es zur Bildung eines nicht quantifizierbaren Doppelpeaks. Sowohl durch Erhöhung als auch durch Erniedrigung der Eluenten-Polarität konnte weder eine Stabilisierung der Basislinie noch eine genügende Trennung des Vitamins erzielt werden. Damit ist eine rein physikalische Festphasenextraktion aufgrund der mangelnden Spezifität gegenüber dem Vitamin B₁₂ für pflanzliche Sanddornbeeren-Extrakte ungenügend und nicht anwendbar.

Als besonders spezifisch und präzise zeigte sich dagegen die auf Affinitäts-Wechselwirkungen beruhende Festphasenextraktion, die Immunoaffinitätschromatographie (IAC-SPE). Hierbei konnte, sowohl bei einer realen mit Vitamin B₁₂ supplementierten Sanddornbeeren-Probe, als auch bei einer Fleischprobe, eine sehr gute spezifische Retention des Cyanocobalamins auf der Säule erzielt werden (vgl. Abb. 3-10 und 3-11). Nach methanolischer Elution zeigen die Chromatogramme eine vollständige Trennung des Vitamin B₁₂ von den weiteren Bestandteilen der Probe unter gleichzeitiger Beibehaltung der stabilen Basislinie, was eine präzise Quantifizierung des Vitamins ermöglicht. Damit konnte eine Wiederfindung des Vitamin B₁₂ von 85 % in der pflanzlichen Sanddornbeeren-Probe und 87 % in der tierischen Fleischprobe erzielt werden. Die ca. 15 % Vitamin B₁₂-Verlust lassen sich vermutlich auf den hohen Öl- und Fettgehalt der Probe zurückführen, die die Bindung des Cyanocobalamin-spezifischen Antikörpers an das Vitamin beeinflussen.

Die IAC-SPE mit nachfolgender RP-HPLC-Untersuchung wurde für die Bestimmung der Vitamin B₁₂-Konzentration in pflanzlichen Proben als Standard-Analytikmethode gewählt und verwendet.

3.2 Mikrobielle Produktion von Vitamin B₁₂ in *Frankia alni*

1996 wurde dem Biologen Dr. Georgios Pandalis ein Patent für Sanddornkonzentrate und –extrakte erteilt, die das natürliche Vitamin B₁₂ enthielten ^[75]. Die Präsenz dieses Vitamins, das bis dahin in natürlicher Form hauptsächlich in tierischen Produkten nachgewiesen wurde, ist auf die Symbiose der Sanddorn-Pflanze mit dem Actinobakterium *Frankia alni* zurückzuführen. Im Zuge dieser Arbeit sollte der maximale Vitamin B₁₂-Gehalt, der in Sanddorn zu erwarten ist, bestimmt werden. Dazu musste die Frage geklärt werden, ob die Produktion des Vitamin B₁₂ im Symbionten durch die Einwirkung bestimmter physikalischer und chemischer Faktoren, gesteigert werden kann. Im Einklang mit der umweltbewussten urheimischen Philosophie von Teutopharma GmbH sollte auf gentechnische Manipulationen und Veränderungen des Symbionten oder der Pflanze verzichtet werden.

Im folgenden Kapitel ist gezeigt, unter welchen Bedingungen die Isolierung des Symbionten *Frankia alni* aus der Wurzelknolle des Sanddorns möglich ist. Desweiteren wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Konzentration einiger Strukturbausteine des Vitamin B₁₂, wie Kobalt und Dimethylbenzimidazol, und dem Wachstum des Symbionten und seiner Cobalamin-Produktion besteht. Es wurde auch der Einfluss weiterer physikalischer und chemischer Faktoren auf das Wachstum der *Frankia alni* untersucht.

3.2.1 Isolierung der *Frankia sp.*, Einfluss unterschiedlicher biotischer Faktoren auf deren Wachstum und Cobalamin-Produktion

3.2.1.1 Isolierung der *Frankia sp.* aus den Wurzelknollen des Sanddorns

Die Schwierigkeit der Isolierung von *Frankia alni* besteht hauptsächlich in dem äußerst langsamen Wachstum dieses Bakteriums. Dabei variiert die Wachstumsrate des Bakteriums in Abhängigkeit vom Stamm und von den Kultivierungsbedingungen oder –anforderungen. Der Erfolg der Isolierung von *Frankia alni* hängt sowohl von

dem zu isolierenden Stamm als auch von der Pflanze ab, aus der das Bakterium isoliert werden soll. So konnte in mehreren Fällen eine erfolgreiche Isolierung aus den Wirtspflanzen der Gattung *Alnus* erzielt werden und im kleineren Ausmaß aus *Myrica*, *Elaeagnus* und *Comptonia* ^[110, 111]. Neben dem langsamen Wachstum der *Frankia* sind auch solche Faktoren, wie eine Kontamination des Inokulums mit schnell wachsenden Bodenbakterien, inhibierende phenolische Komponenten aus der Wirtspflanze und schließlich der von Stamm zu Stamm variierende Nährstoffbedarf der *Frankia*, für den Erfolg der Isolierung von größter Wichtigkeit. Oft sind die isolierten Stämme auch nach längeren Inkubationszeiten nicht subkultivierbar. Für die Identifizierung des isolierten Stamms reichen für gewöhnlich mikroskopische Untersuchungen, wobei die Bakterien charakteristische morphologische Merkmale, wie Sporangien, Vesikel, verzweigte Hyphen und fehlendes Luftmycel aufweisen ^[111].

Zur Isolierung des Symbionten wurden Wurzelknollen eines wildwachsenden Sanddorns (Ufer des Mittellandkanals Hannover) und zwei Kulturpflanzen des Sanddorns der Sorte Frugana und Leikora (Sanddorn Storchennest GmbH, Ludwigslust) verwendet. Die Abbildungen 3-12 A und B zeigen die verwendeten Wurzelknollen der wildwachsenden und kultivierten Pflanze.

Nach dem Ernten der Wurzelknollen wurden diese zunächst in einem Polyethylen-Beutel auf einem feuchten Papiertuch bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Knöllchen wurden unter fließendem Wasser mit Spatel vollständig und vorsichtig von Sand und Bodenresten befreit. Anschließend wurden sie mehrere Male mit milliQ Wasser gespült und zur Desinfektion der Oberfläche jeweils 5 min in 2 % Natriumhypochlorit-Lösung unter Rühren inkubiert. Nach der Oberflächen-desinfektion wurden die einzelnen Knöllchen mehrere Male im sterilem milliQ Wasser gewaschen und die Oberfläche anschließend in sterilem Phosphat-Puffer (pH 6,8) neutralisiert. Die einzelnen Zipfel der Sanddorn-Wurzelknöllchen der wildwachsenden Pflanze und der Sorte Leikora und Frugana wurden in separaten sterilen Petrischalen mit sterilem Skalpell abgeschnitten und unter sterilen Bedingungen getrocknet. Anschließend wurden die Zipfel ebenfalls unter sterilen Bedingungen vorsichtig mit dem Skalpell geschält und mit einigen Tropfen Saline in sterilem Keramik-Mörser homogenisiert. Auf diese Weise hergestellte schlammige

Animpfkulturen der Knöllchenmasse des wildwachsenden Sanddorns und der Sorten Frugana und Leikora wurden jeweils in 1 mL Saline aufgenommen und anschließend mit der Reinigungsausstrich-Technik auf jeweils fünf Agar-Isoliermedien aufgetragen. Anschließend wurden die Agar-Platten bei 28 °C im Dunkeln inkubiert.

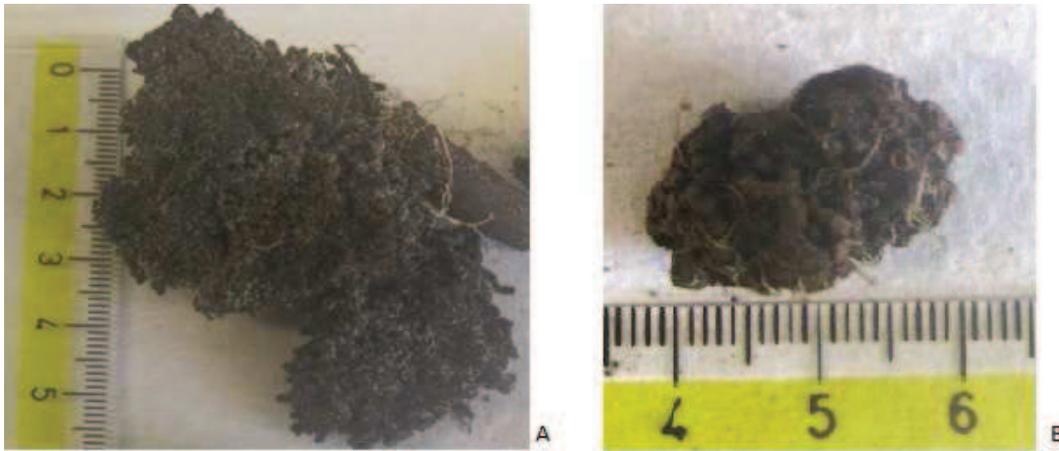


Abb. 3-12: Morphologie der Sanddorn-Wurzelknöllchen. **A** Wurzelknöllchen des wildwachsenden Sanddorns (Ufer des Mittelland-Kanals, Hannover). **B** Wurzelknöllchen des kultivierten Sanddorns der Sorte Frugana. (Sanddorn Storchennest GmbH, Ludwigslust).

Als Isoliermedien wurden das Glukose-haltige BAP-Medium nach Carú ^[112], Natriumpyruvat-haltige FM-Medium nach Benson ^[113] und das reichhaltige QMod-Medium nach Lalonde ^[114] auf der Basis des Hefeextrakts, Caseinpeptons und einer Lipid-Lösung, verwendet.

Wie erwartet konnten bereits nach wenigen Tagen sowohl auf dem reichhaltigen QMod- als auch auf dem Glukose-haltigen BAP-Agarmedium das Wachstum von schnell wachsenden Fremdbakterien beobachtet werden, sodass diese entsorgt werden mussten. Dagegen konnten auf dem Natriumpyruvat-haltigen FM-Medium in der 4.-5. Woche winzige weiße Bakterienkolonien beobachtet werden (siehe Abbildung 3-13). Diese weißen Bakterien-Kolonien wiesen ein typisches Wachstumsverhalten für *Frankia* auf, wobei diese in das Agarmedium hineingewachsen sind, ohne die für die Actinomycetales typische Ausbildung eines Luftmycels.



Abb. 3-13: *Frankia*-Kolonien aus der Sanddorn-Wurzelknolle (Sorte Frugana) nach 5-wöchiger Inkubation im Dunkeln bei 28 °C auf dem FM-Agarmedium.

Einzelne Kolonien wurden aus dem Agarmedium mit einem sterilen Spatel herausgeschnitten, in ca. 100 µL steriler Saline aufgenommen und mikroskopisch untersucht. In Abbildung 3-14 A-C sind die Lichtmikroskop-Aufnahmen der Bakterien, die die typischen morphologischen Strukturen der *Frankia alni* aufweisen, gezeigt. Auffällig sind die starke Verzweigung der langen Hyphen, sowie intercalare Sporangien.

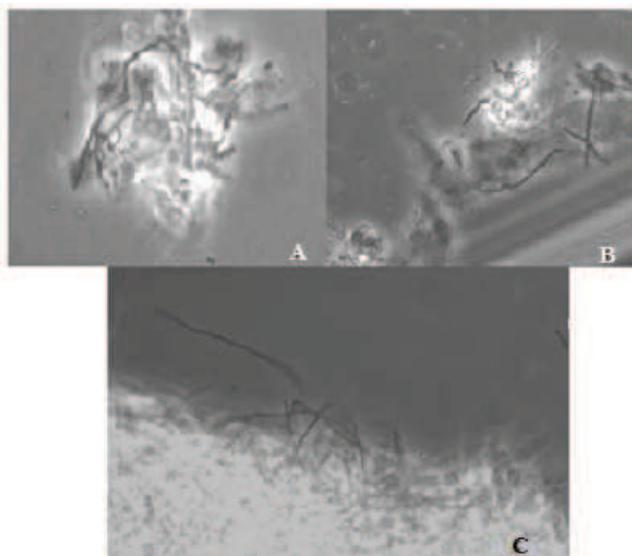


Abb. 3-14: *Frankia alni* isoliert aus den Sanddorn-Wurzelknöllchen der Kultursorten Frugana, Leikora und aus einer wildlebenden Pflanze. **A** Isolat aus der Wurzel des wildlebenden Sanddorns. **B** Isolat aus der Wurzel der Sorte Frugana. **C** Isolat aus der Wurzel der Sorte Leikora.

Zur Dekontamination wurden einzelne Bakterien-Kolonien ohne Verdünnung auf frische FM-Agarmedien mit jeweils geringen Gehalt an Nalidixinsäure und Cycloheximid ausplattiert, und anschließend bei 28 °C im Dunkeln inkubiert. In der

2. Woche konnte ein deutliches Wachstum der Bakterien beobachtet werden (siehe Abb. 3-15 A-C).

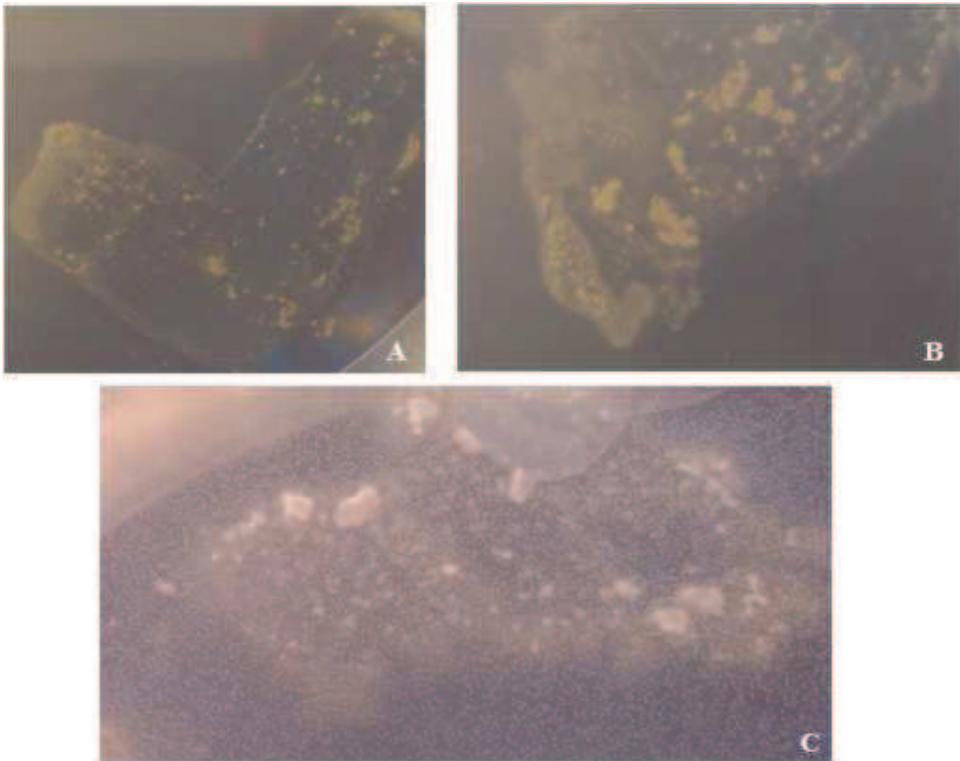


Abb. 3-15: Bakterien-Kolonien auf dem FM-Agarmedium mit Cycloheximid isoliert aus den Wurzelknollen unterschiedlicher Sanddorn-Sorten und wildwachsendem Sanddorn. **A** Isolat aus der Sorte Leikora. **B** Isolat aus dem freilebenden Sanddorn. **C** Isolat aus der Sorte Frugana.

Die einzelnen Kolonien wurden jeweils mit einem sterilen Skalpell abgestrichen und in etwas steriler Saline aufgenommen, anschließend unter dem Mikroskop untersucht. Die Kolonien waren noch zum Teil stark mit Fremdbakterien kontaminiert. Zur weiteren Dekontamination wurde jeweils ein Verdünnungsausstrich auf einem frischen Nalidixinsäure- und Cyclohexamin-haltigem FM-Medium durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Kolonien mit einem sterilen Skalpell abgestrichen und in 5 mL sterilem, deion. Wasser mit einem Glasmörser homogenisiert. Nach vier Wochen konnte ein schwaches Wachstum der einzelnen *Frankia*-Kolonien beobachtet werden. Der Verdünnungsausstrich wurde mit Inkubationszeiten von jeweils 4 Wochen insgesamt zweimal wiederholt, anschließend wurden die *Frankia*-Kolonien aus dem wildlebenden Sanddorn und den Sorten Frugana und Leikora jeweils in 10 mL flüssiges FM-Medium ohne Antibiotikum transferiert und in 15 mL halbgeöffneten Kultivier-Stabgläschen bei

28 °C stehend inkubiert. Bereits nach dem Transfer der Bakterien auf ein frisches Antibiotikum-haltiges FM-Agarmedium konnte ein immer schwächeres Wachstum der *Frankia* beobachtet werden, der sich in immer kleinerer Anzahl der ausgebildeten Kolonien und einem deutlich langsameren Bakterienwachstum äußerte. Im flüssigen Medium konnte auch nach einer Inkubationszeit von 3 Monaten kein Wachstum der *Frankia* erzielt werden. Somit konnten die aus dem wildlebenden und dem kultivierten Sanddorn isolierten Stämme der *Frankia* nicht erhalten werden.

3.2.1.2 Kobalt-Gehalt des Bodens und in der Sanddorn-Pflanze

Kobalt stellt das Zentralatom des Cobalamins und damit des Vitamin B₁₂ dar. Damit stellte sich zu Beginn dieser Arbeit die grundlegende Frage, wie viel Kobalt im Sanddorn und im Boden, in dem die Pflanze kultiviert wurde, enthalten ist und wie sich dieser in der Pflanze verteilt. Im Institut für Analytische Chemie Hannover wurde im Auftrag des Institutes für Technische Chemie Hannover der Kobalt-Gehalt im Boden-, in der Sanddornwurzel- und Sanddornwurzelknollen-Proben spektroskopisch untersucht (siehe Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Ergebnisse der Kobaltbestimmung in der Boden-, Wurzel- und Wurzelknollenprobe des Sanddorns.

Alle Proben stammen aus dem Sanddorn LTD, Klaipeda, Litauen. Die Proben wurden im Auftrag des Institutes für Technische Chemie (LUH) vom Institut für Analytische Chemie (LUH) spektroskopisch untersucht.

Probe	Mittlerer Kobalt-Gehalt	Testmethode
Wurzelknolle	26,79 ± 7,03 ppm	AAS
Wurzelknolle	32,30 ± 0,68 ppm	OES
Wurzel	105,1 ppb ≤ Co-Gehalt ≤ 291,5 ppb*	AAS
Boden	n. d., Co-Gehalt < 105,1 ppb**	AAS

* Kobaltgehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze.

** Kobaltgehalt nicht detektierbar. Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze von 105,1 ppb.

Aus den Ergebnissen in der Tabelle 3-6 geht hervor, dass der höchste Kobalt-Gehalt in der Sanddornwurzelknolle zu finden ist. Dagegen in der Wurzelprobe lag der Kobalt-Gehalt unterhalb der Bestimmungsgrenze, jedoch oberhalb der Nachweisgrenze im Bereich von 105,1 – 291,5 ppb. In der Bodenprobe konnte kein Kobalt

detektiert werden, sein Gehalt liegt unterhalb der Nachweisgrenze. Der Kobalt-Gehalt in Böden schwankt je nach Feuchtigkeitsgehalt und pH-Wert im Bereich von 0,05-300 ppm ^[125, 126]. Laut Literaturangaben enthalten Sanddornbeeren im Schnitt um die 9-10 ppb Kobalt ^[124] und damit einen um das Fünffache geringeren Gehalt als der Boden (ausgehend von 0,05 ppm Kobalt im Boden laut Literaturangaben). Somit kommt es zu einer Akkumulation des Kobalts in den Wurzelknollen des Sanddorns, wobei hier der Kobalt-Gehalt um Faktor 300 höher ist als im Boden. In der Abbildung 3-16 ist die Kobalt-Verteilung im Boden und Sanddorn schematisch dargestellt.

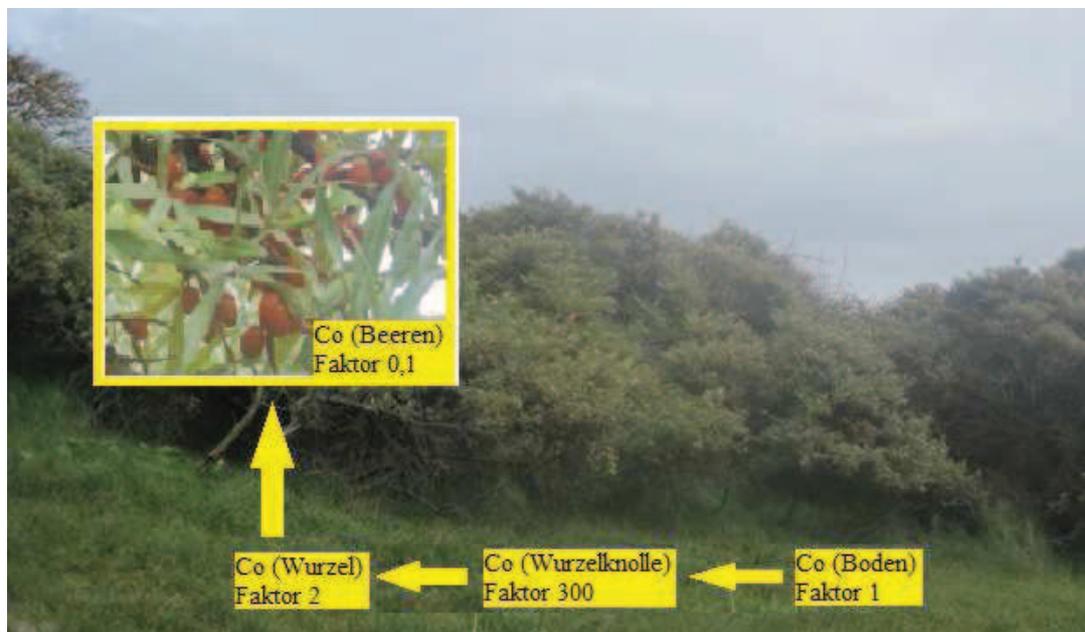


Abb. 3-16: Verteilung des Kobalts in der Sanddorn-Pflanze. Die berechneten Faktoren sind auf den Kobalt-Gehalt des Bodens bezogen (Foto: Sanddorn, Norderney).

3.2.1.3 Auswirkungen der Kobaltkonzentration und der Schüttelgeschwindigkeit auf das Wachstum der *Frankia*

Wie im Kapitel 3.2.1.1 gezeigt, konnte zwar ein *Frankia*-Stamm aus den Wurzelknöllchen des Sanddorns isoliert werden, der jedoch nach der erfolgten Dekontamination nicht weiter subkultiviert werden konnte. Deshalb wurde für weitere Untersuchungen ein von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) angeforderter Stamm der *Frankia* sp. (DSM No.: 44251, ArI3, isoliert aus *Alnus rubra*) verwendet. Eine Besonderheit der

Frankia ist ihr äußerst langsames Wachstum unter Bildung von kleinen aggregatförmigen Kolonien im Suspensionsmedium (siehe Abb. 3-17 A und B).



Abb. 3-17: *Frankia sp.* nach vierwöchiger Inkubation in 50 mL DPM-Medium und in einem 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 30 °C; **A** bei 80 rpm, **B** bei 120 rpm.

Aufgrund des langsamen Wachstums des Bakteriums stellte sich die Frage, ob die Schüttelgeschwindigkeit des Suspensionsmediums und damit verbundener Sauerstoff- und Stickstoffeintrag, sowie die Kobalt-Konzentration im Suspensionsmedium einen Einfluss auf das Wachstum der *Frankia sp.* haben. In Abb. 3-18 ist die Abhängigkeit der Biotrockenmasse der *Frankia sp.* von der Schüttelgeschwindigkeit und der Konzentration des Kobalt(II)-chlorids im DPM-Medium gezeigt.

Bedingt durch den höheren Sauerstoff- und Stickstoffeintrag aus der Luft verdreifacht sich die Biotrockenmasse der *Frankia* bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 rpm im Vergleich zu den stationären Bedingungen. Gleichzeitig lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, ob die Kobaltkonzentration im Kulturmedium eine signifikante Auswirkung auf das Wachstum des Bakteriums hat. Es lässt sich jedoch, wie aus der Abbildung Abb. 3-19 ersichtlich, ein nahezu vollständiger Kobaltverbrauch durch *Frankia sp.* sowohl unter stationären als auch bei erhöhten Sauerstoff- und Stickstoffeintrag durch Schütteln beobachten.

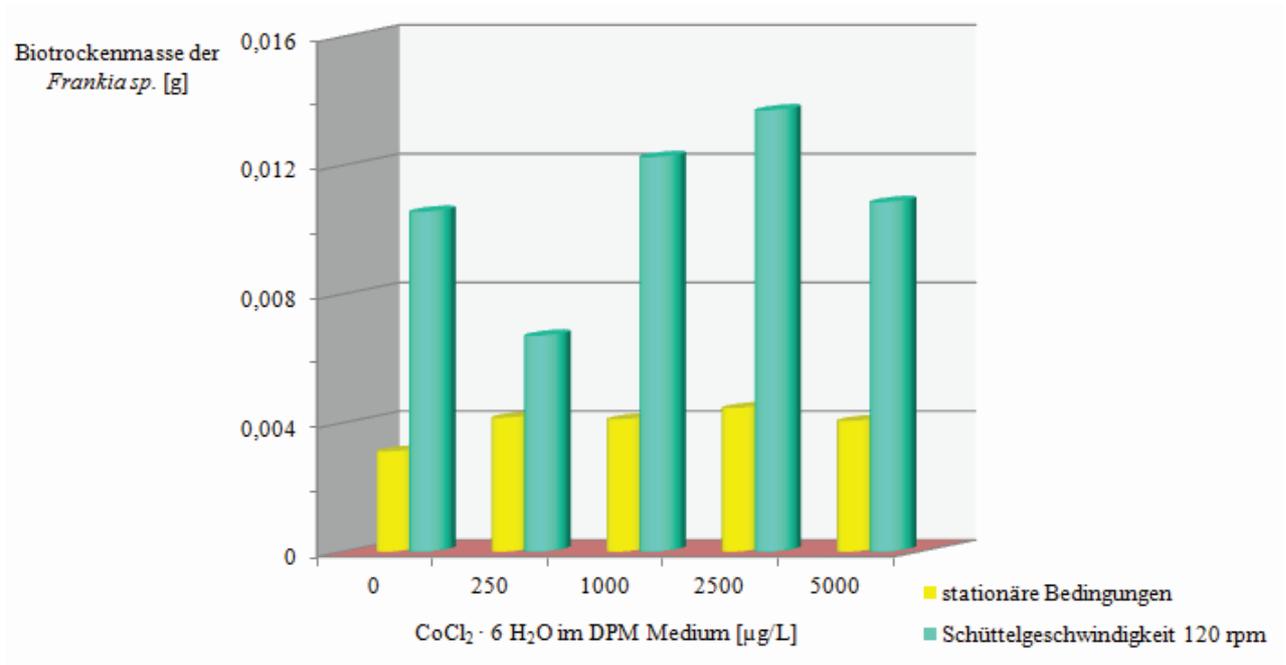


Abb. 3-18: Abhängigkeit der Biotrockenmasse der *Frankia sp.* von der Rührgeschwindigkeit und der Konzentration des Kobalt(II)-chlorids im DPM-Suspensionsmedium nach vierwöchiger Inkubation bei 30 °C. Die stationären *Frankia sp.*-Kulturen wurden jeweils in 30 mL DPM-Medium in 50 mL-Falcontubes unter stationären Bedingungen inkubiert. Die Schüttelkolben-Kulturen der *Frankia sp.* wurden in jeweils 50 mL DPM-Medium bei 120 rpm inkubiert.

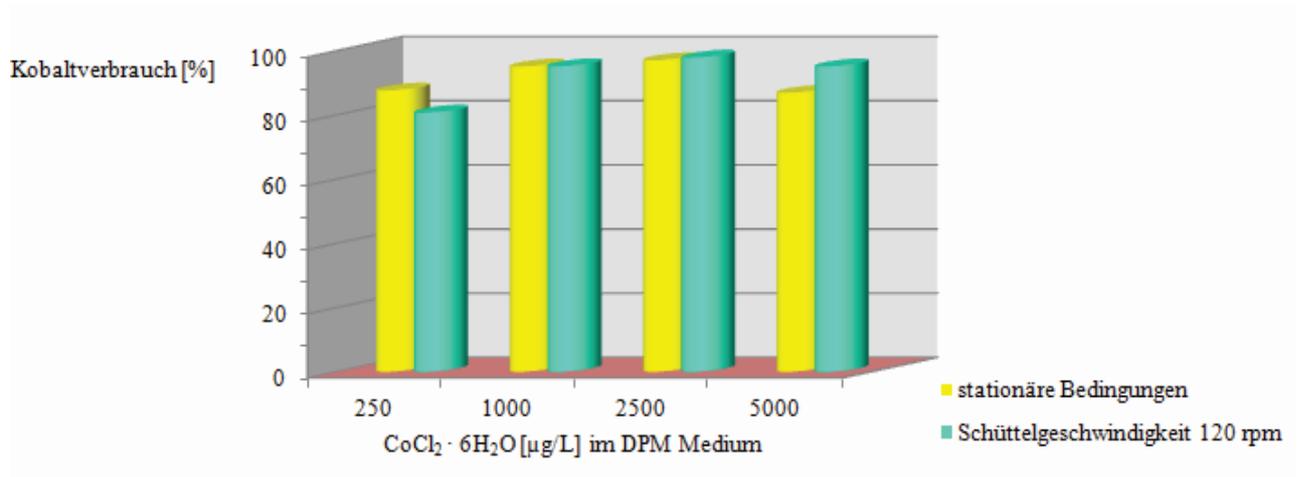


Abb. 3-19: Kobaltverbrauch durch *Frankia sp.* unter stationären Bedingungen und in einer Schüttelkolbenkultur bei 120 rpm. Die Kobalt(II)-Konzentrationen des Medienüberstands wurden nach vierwöchiger Inkubation der *Frankia sp.* im DPM-Medium mittels NANOCOLOR® Kobalt (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) bestimmt.

Ein deutlicher Zusammenhang besteht zwischen dem Kobaltverbrauch, dem Sauerstoff- und Stickstoffeintrag und dem Wachstum des Bakteriums (siehe Abbildungen 3-20 A und B). Während das Wachstum der *Frankia sp.* unter

stationären Bedingungen mit steigendem Kobaltverbrauch konstant bleibt, weisen die Schüttelkolben-Kulturen mit steigendem Kobaltverbrauch einen steilen Wachstumsanstieg auf.

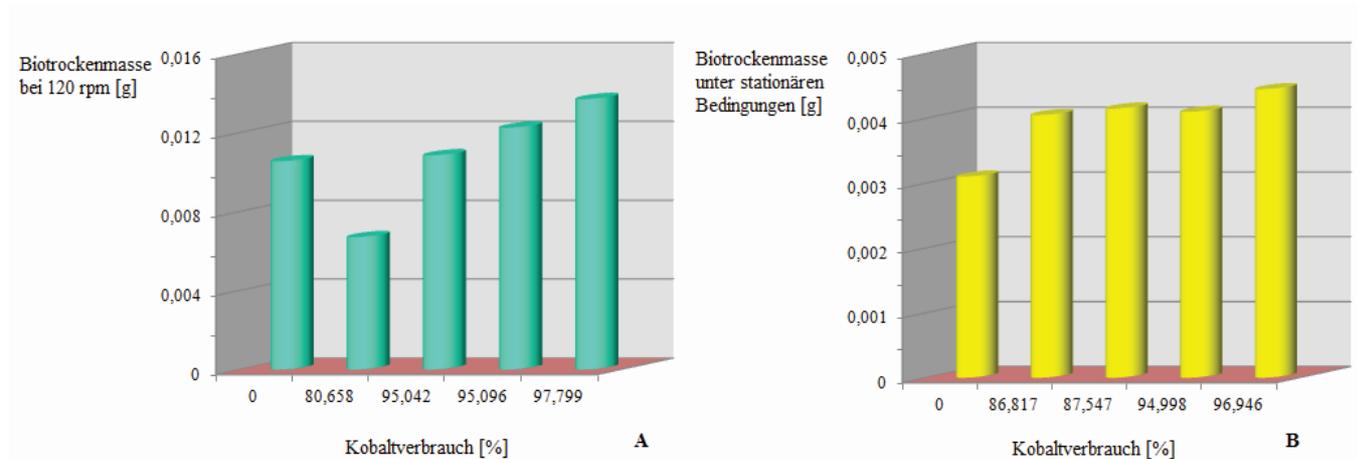


Abb. 3-20: Biotrockenmasse der *Frankia sp.* im DPM-Medium nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit von dem Kobaltverbrauch. **A** Schüttelkultur bei 120 rpm. **B** Unter stationären Bedingungen.

Dieses Verhalten ist unter anderem auf den steigenden Sauerstoff- und Stickstoffeintrag zurückzuführen. Sowohl die Schüttelkolben-Kultur der *Frankia sp.* als auch die Bakterienkultur unter stationären Bedingungen wachsen auch unter Kobalt-freien Bedingungen, d.h. bei ruhendem Kobaltverbrauch. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den im Kapitel 3.2.1.2 vorgestellten Ergebnissen. Das im Medium verfügbare Kobalt wird dabei nahezu vollständig von *Frankia sp.* aufgenommen und gespeichert, wobei das Bakterium unter Kobalt-armen Bedingungen auf seine Kobaltreserven zurückgreift.

3.2.1.4 Die Cobalamin-Produktion in *Frankia* in Abhängigkeit von der Kobalt- und Dimethylbenzimidazol-Konzentration

Das Kobalt (II) und das Dimethylbenzimidazol (DMI) stellen die zwei wichtigsten Struktur-Bausteine des Vitamin B₁₂ dar. Im Folgenden sollen die Auswirkungen unterschiedlicher Co(II)- und DMI-Konzentrationen auf die Cobalamin-Produktion in *Frankia sp.* untersucht werden. Insbesondere soll geprüft werden, ob mit zunehmender Kobalt (II)- und DMI-Konzentration der inter- und extrazelluläre Cobalamin-Gehalt der *Frankia sp.* steigt. Hierzu wurde *Frankia sp.* bei

Konzentrationen von 0-5.000 $\mu\text{g/L}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und jeweils bei 2.500 und 5.000 $\mu\text{g/L}$ DMI mit 2.500 $\mu\text{g/L}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ bei 30 °C und 120 rpm in 100 mL DPM Medium kultiviert. Anschließend wurde die *Frankia*-Biomasse von dem Medienüberstand abgetrennt und nach der Gefriertrocknung und enzymatischen Vitamin B₁₂-Extraktion (zur Extraktion des Vitamin B₁₂ aus *Frankia sp.* siehe Anhang, Kapitel 5.1.2) der Cyanocobalamin-Gehalt bestimmt. In Abb. 3-21 sind die mittels RP-HPLC nach IAC-SPE-Aufreinigung bestimmte Vitamin B₁₂-Gehalte der *Frankia sp.*-Biotrockenmasse gezeigt, dabei kann tatsächlich eine lineare Abhängigkeit des intrazellulären, essentiellen Vitamin B₁₂-Gehaltes von der im Medium eingesetzten Kobalt(II)-Konzentration festgestellt werden.

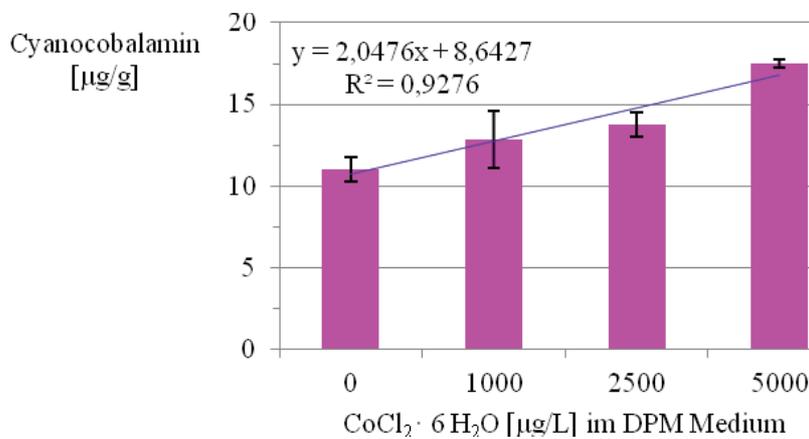


Abb. 3-21: Einfluss der Co(II)-Konzentration auf den Vitamin B₁₂-Gehalt in *Frankia sp.* nach vierwöchiger Inkubation bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium. Die Konzentrationen wurden nach der IAC-SPE Aufreinigung mittels RP-HPLC bestimmt (HPLC-Methode siehe Anhang, Kapitel 5.1.4.2).

Wesentlich auffälliger ist der Einfluss der DMI-Konzentration auf die Produktion des essentiellen Vitamin B₁₂. So konnte bei einer Kultivierung des Bakteriums mit 2.500 $\mu\text{g/L}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ohne DMI-Zusatz ein Gehalt von 13,73 $\mu\text{g/g}$ des Vitamin B₁₂ in *Frankia sp.* detektiert werden. Während unter Zusatz von 2.500 $\mu\text{g/L}$ DMI ein Gehalt von 15,39 $\mu\text{g/g}$ und unter Zusatz von 5.000 $\mu\text{g/L}$ DMI sogar 30,48 $\mu\text{g/g}$ essentielles Vitamin B₁₂ detektiert werden konnten (Abb. 3-22). Somit kann eine Verdopplung des essentiellen Vitamin B₁₂-Gehaltes bei einer Verdopplung der DMI-Konzentration und damit eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Vitamin B₁₂ und dem Liganden festgestellt werden.

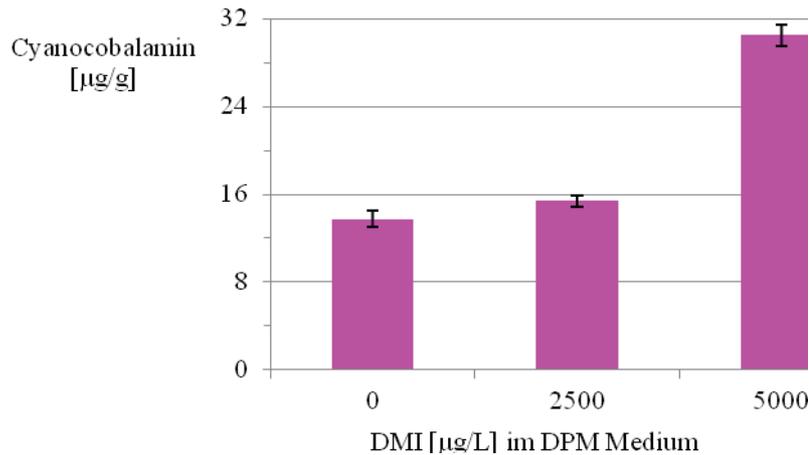


Abb. 3-22: Einfluss der DMI-Konzentration auf den Vitamin B₁₂-Gehalt in *Frankia sp.* nach vierwöchiger Inkubation bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium mit 2.500 $\mu\text{g/L}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Die Konzentrationen wurden nach der IAC-SPE Aufreinigung mittels RP-HPLC bestimmt (HPLC-Methode siehe Anhang, Kapitel 5.1.4.2).

Im Medienüberstand dagegen konnten nur geringe Vitamin B₁₂-Konzentrationen gemessen werden, jedoch wie die Abb. 3-23 zeigt, lässt sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen dem Vitamin B₁₂-Gehalt des Medienüberstands und der eingesetzten Kobalt(II)-Konzentration erkennen. Die in Abb. 3-23 dargestellten Ergebnisse geben den Gesamt-Cobalamin-Gehalt wieder, wobei dieser mit dem mikrobiologischen Nachweis für Vitamin B₁₂ bestimmt wurde (siehe Kapitel 3.1.1.1.). Bei dieser Methode ist das Wachstum des Testorganismus proportional zum Vitamin B₁₂-Gehalt des Testmediums. Die Testorganismen können jedoch auch die für den Menschen nicht essentiellen Cobalamin-Formen detektieren.

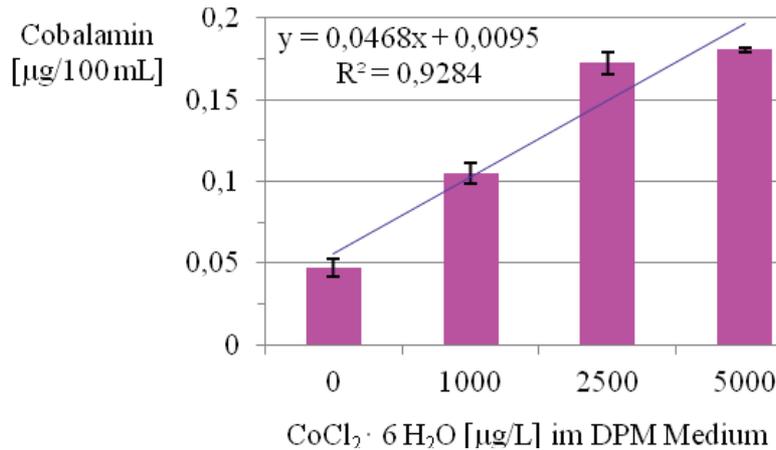


Abb. 3-23: Cobalamin-Gehalt im Medienüberstand der *Frankia sp.* nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium und unterschiedlichen Kobalt(II)-Konzentrationen. Der Cobalamin-Gehalt wurde mikrobiologisch bestimmt (siehe Anhang, Kapitel 5.1.5).

In der Abb. 3-24 ist auch der Gehalt des essentiellen Vitamin B₁₂ im Medienüberstand unter Zusatz von DMI gezeigt. Dieser wurde nach der IAC-SPE-Aufreinigung mittels RP-HPLC bestimmt. Im Überstand der Kulturmedien ohne DMI-Zusatz konnte dagegen mit dieser Methode kein Cyanocobalamin nachgewiesen werden, wobei hier im Medienüberstand bei einer Anfangskonzentration des Kobaltdichlorids von 2.500 µg/L der Gesamt-Cobalamin-Gehalt 0,17 µg/100 mL betrug (vgl. Abb. 3-23).

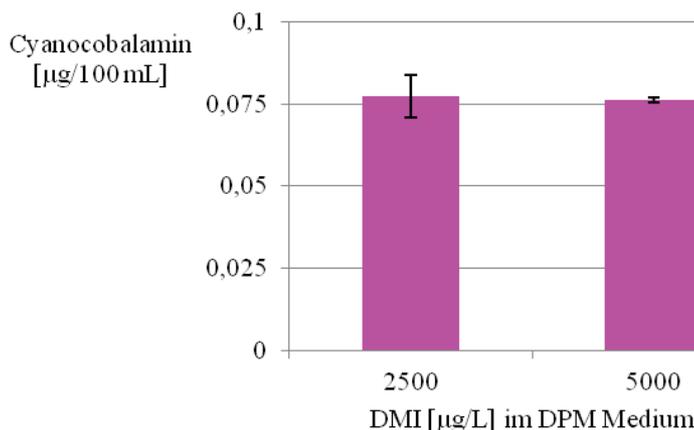


Abb. 3-24: Cyanocobalamin-Gehalt im Medienüberstand der *Frankia sp.* nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium mit 2.500 µg/L CoCl₂ · 6 H₂O und unterschiedlichen DMI-Konzentrationen. Der Cobalamin-Gehalt wurde mittels RP-HPLC nach IAC-SPE-Aufreinigung bestimmt (HPLC-Methode siehe Anhang, Kapitel 5.1.4.2).

Im Unterschied zum intrazellulären Vitamin B₁₂-Gehalt der *Frankia sp.* in Abhängigkeit von der DMI-Konzentration des Mediums, bleibt die extrazelluläre Vitamin B₁₂-Konzentration konstant. Abbildung 3-25 zeigt das Wachstumsverhalten der *Frankia sp.* in Abhängigkeit der DMI-Konzentration, dabei fällt auf dass unter Zusatz von DMI die Biotrockenmasse des Bakteriums vervierfacht wird, wobei mit zunehmender DMI-Konzentration das bakterielle Wachstum weiterhin konstant bleibt. Somit wirkt sich DMI in der Tat begünstigend auf die intrazelluläre Produktion des Vitamin B₁₂ aus, dieses wird jedoch vermutlich für das zelleigene Wachstum der *Frankia* verwendet.

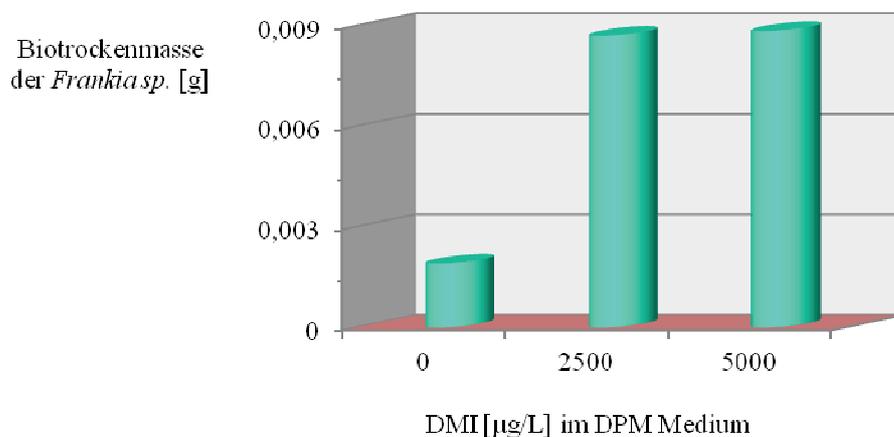


Abb. 3-25: Biotrockenmasse der lyophilisierten *Frankia sp.* nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm im DPM-Medium mit 2.500 µg/L CoCl₂ · 6 H₂O und unterschiedlichen DMI-Konzentrationen.

3.2.1.5 Einfluss des Vitamin B₁₂ auf das Wachstum der *Frankia sp.*

Im folgenden Kapitel soll gezeigt werden, in welcher Weise Vitamin B₁₂ das Wachstum der *Frankia* beeinflusst. Hierzu wurde *Frankia sp.* vier Wochen sowohl mit als auch ohne Zusatz von 30 µg Cyanocobalamin in 100 mL Kobalt-freien DPM-Medium kultiviert. Abbildung 3-26 zeigt das Wachstum der *Frankia sp.* in Abhängigkeit von der Vitamin B₁₂- und der Kobalt(II)-Konzentration.

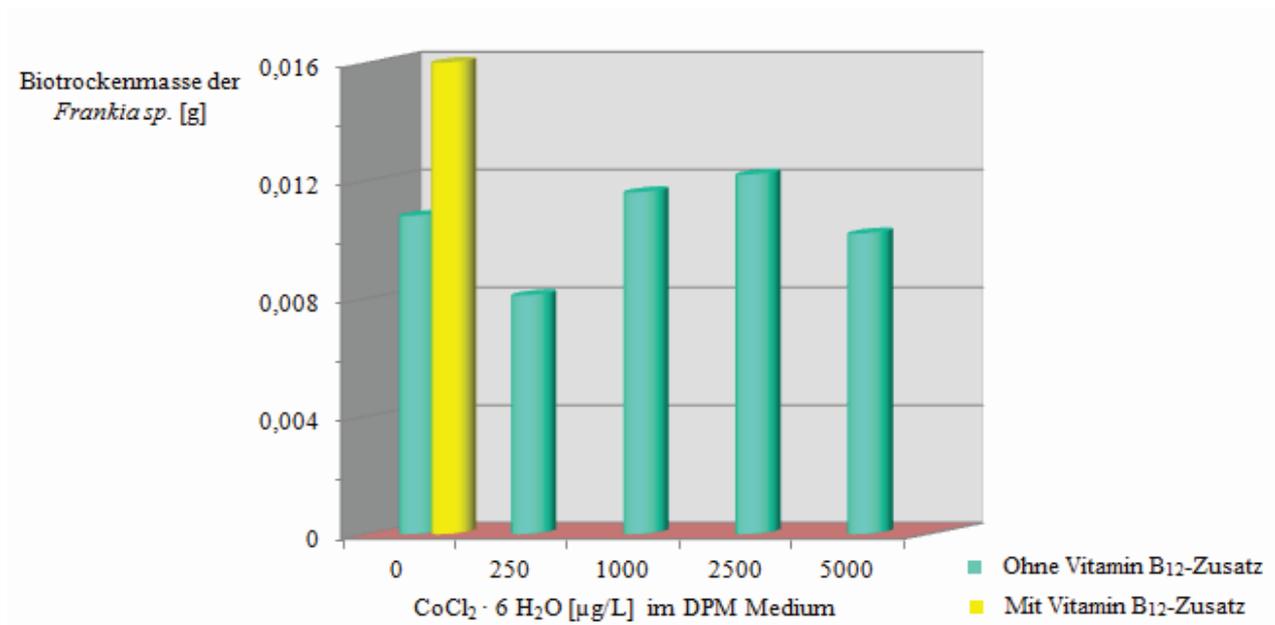


Abb. 3-26: Biotrockenmasse der *Frankia sp.* in Abhängigkeit von der Kobalt- und Vitamin B₁₂-Konzentration im DPM-Medium nach vierwöchiger Kultivierung bei 30 °C und 120 rpm.

Ähnlich den im Kapitel 3.2.1.3 gezeigten Ergebnissen, kann auch hier keine eindeutige Abhängigkeit des bakteriellen Wachstums von der Kobalt(II)-Konzentration im Medium festgestellt werden, dagegen nimmt die Biotrockenmasse der *Frankia sp.* unter Zusatz von Vitamin B₁₂ um 50 % zu. Abbildung 3-27 zeigt den Vitamin B₁₂-Gehalt in *Frankia sp.* und im Medienüberstand.

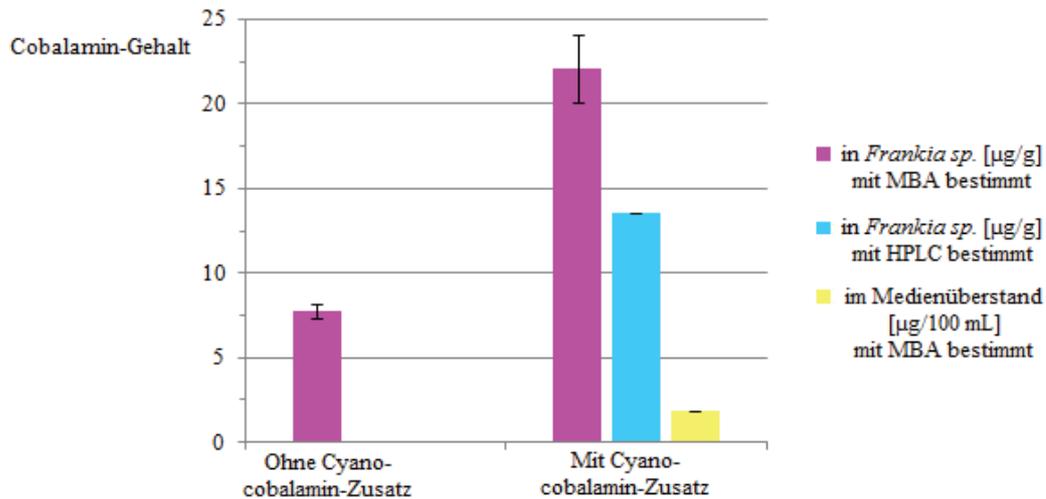


Abb. 3-27: Vitamin B₁₂-Konzentrationen in *Frankia sp.* und im Medienüberstand nach vierwöchiger Kultivierung im DPM-Medium mit Cyanocobalamin-Supplementierung bei 30 °C und 120 rpm. Der Gehalt wurde sowohl mit MBA als auch mittels RP-HPLC nach vorheriger IAC-SPE-Aufreinigung bestimmt.

Frankia sp. weist unter Vitamin B₁₂-Zusatz erwartungsgemäß höheren intrazellulären Vitamin B₁₂-Gehalt auf, wobei der mittels MBA bestimmte Gesamt-Cobalamin-Gehalt bei 22,1 µg/g lag, davon entsprachen nur 13,5 µg/g dem Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin). Im Medienüberstand dieser Probe konnte mikrobiologisch ein Gesamt-Cobalamin-Gehalt von 1,9 µg/100 mL bestimmt werden, es konnte jedoch kein Vitamin B₁₂ mittels RP-HPLC nachgewiesen werden.

Ohne Cyanocobalamin-Zusatz lag der intrazelluläre mikrobiologisch bestimmte Gesamt-Cobalamin-Gehalt bei 7,7 µg/g, hier konnte jedoch kein essentielles Vitamin B₁₂ mit RP-HPLC nachgewiesen werden. Im Medienüberstand lag der Cobalamin-Gehalt sogar sowohl für den mikrobiologischen Nachweis als auch den chromatographischen Nachweis nach IAC-SPE-Aufreinigung unterhalb der Nachweisgrenze.

Aus den in Abbildungen 3-26 und 3-27 dargestellten Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Cyanocobalamin, das als Vitamin B₁₂ dem DPM Medium zugesetzt wurde, vollständig von *Frankia sp.* aufgenommen und größtenteils aufgebraucht wurde, wobei die Biomasse erhöht wurde. Damit lässt sich die in

Kapitel 3.2.1.4 aufgestellte Vermutung, dass das Vitamin B₁₂ hauptsächlich dem zelleigenen Wachstum des Bakteriums dient, bestätigen.

3.2.1.6 Der Vitamin B₁₂-Gehalt in Sanddorn

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Gehalt an Vitamin B₁₂ in Sanddorn unterschiedlicher Herkunft bestimmt. In der Tabelle 3-7 ist der mittels RP-HPLC nach IAC-SPE-Aufreinigung bestimmte Vitamin B₁₂-Gehalt in Sanddornbeeren verschiedener kultivierter Sanddorn-Pflanzen, sowie in wildwachsendem Sanddorn gezeigt.

Tabelle 3-7: Vitamin B₁₂-Gehalt im wilden und kultivierten Sanddorn. Bei den Proben der Teutopharma GmbH handelte es sich um unterschiedliche Kultursorten des Sanddorns (Abkürzungen: n. n. = nicht nachweisbar. Zur Beschreibung der Extraktion und Analytikmethoden siehe Anhang, Kapitel 5.1.1 und 5.1.4).

Probe	Interner Teutopharma-Code	Vitamin B ₁₂ -Gehalt [µg/100 g]
Sanddornbeeren (Teutopharma GmbH, Glandorf)	210610/181	2,84
	210610/182	0,76
	031210/256	0,673
	011210/240	0,57
	121010/254	0,62 ± 0,13
	070611/327	3,41
	210611/330	n. n.
	250711/342	2,08
Sanddornbeeren, Sorte Frugana (Ludwigslust)		n. n.
Sanddornbeeren, Sorte Leikora (Ludwigslust)		n. n.
Wilde Sanddornbeeren (Langeoog)		n. n.
Wurzelknolle des wilden Sanddorns (Langeoog)		0,96
Sanddornbeeren, wild (Norderney)		0,32 ± 0,02
Sanddorn-Blätter, wild (Norderney)		n. n.
Sanddorn-Direktsaft (Storchennest GmbH, Ludwigslust)		0,33 µg/100 mL
Sanddorn-Saft 100 % (Alnavit GmbH, Biekenbach)		0,76 ± 0,05 µg/100 mL
Sanddorn-Saft des wilden Sanddorns (Ostseeküste)		2,84 ± 0,03 µg/100 mL

Der in der Tabelle 3-7 zusammengestellte Vitamin B₁₂-Gehalt in Sanddorn-Beeren zeigt, dass trotz der bestehenden Symbiose zwischen der Wirtspflanze und dem Bakterium *Frankia*, das Vitamin nur in Spuren in den Beeren vorhanden ist. Dabei liegen seine Konzentrationen im Bereich von 0,3 – 3 µg/100 g Vitamin B₁₂. Durch Stickstoff-reiche Düngung der Anbau-Böden wird die Symbiose beeinträchtigt, bis hin zur vollständigen Zerstörung des Symbionten. Jedoch auch bei wilden Sanddorn beträgt der maximale Vitamin B₁₂-Gehalt im Beerensaft lediglich 2,8 µg/100 mL (siehe Tabelle 3-7, Sanddorn-Saft des wilden Sanddorns der Ostseeküste). In den Blättern der Wirtspflanze konnte kein Vitamin B₁₂ nachgewiesen werden. Dagegen konnten in Wurzelknöllchen 0,9 µg/ 100 g Vitamin B₁₂ nachgewiesen werden, wobei der Cobalamin-Gehalt sowohl von der Bakterien-Zellzahl als auch von dem Alter der Wurzelknolle abhängig ist.

3.2.2 Diskussion

Zur Isolierung des Symbionten *Frankia* aus den Wurzelknöllchen der wildlebenden Sanddorn-Pflanze und aus ihren unterschiedlichen Kultursorten, wurden verschiedene in der Literatur umfangreich beschriebene Nährmedien und Techniken verwendet: das Glukose-haltige BAP-Medium nach Carú ^[112], das neben Glukose auch Lipid- und Hefeextrakt-haltige QMod-Medium nach Lalonde ^[114] und das Spurenelemente und Natriumpyruvat-haltige FM-Medium nach Benson ^[113]. Auf dem reichhaltigen QMod-Medium und dem Glukose-haltigen BAP-Medium war das Wachstum der schnellwachsenden kontaminanten Bakterien begünstigt, wodurch das für *Frankia* charakteristische langsame Wachstum zusätzlich gehemmt war. Auf dem FM-Medium konnten nach fünf Wochen einige winzige farblose Bakterien-Kolonien beobachtet werden. Hierbei wurde Na-Pyruvat, ein Zwischenprodukt der Glykolyse, als Kohlenstoff-Quelle verwendet. Dieses führt in seinem weiteren Abbau in *Frankia* zur Bildung von 3-Carboxy-3-hydroxy-4-methylpentanoat, das in die Leucin-biosynthese eingebunden ist. Desweiteren bilden sich Homocitrat und Malonyl CoA, die jeweils in die Lysin- und die Fettsäurebiosynthese eingebunden sind ^[115]. Dabei weisen einige *Frankia*-Stämme, wie HFPArI3 (Isolat aus *Alnus rubra*) und AvcI1 (Isolat aus *Alnus viridis*) Enzyme des Glykolyse-Abbaus, darunter Glucokinase, Phosphorfructokinase und Pyruvatkinase ^[116, 117] auf. Dadurch war das unerwünschte Wachstum von kontaminanten Bakterien gehemmt.

Morphologisch wiesen die Bakterien, die auf dem FM-Medium gewachsenen waren, die typischen Eigenschaften der *Frankia* auf: Fehlendes Luftmycel, senkrecht Wachstum in das Agar-Medium, sowie Vesikel, Hyphen und Sporangien. Auch nach einer erneuten Kultivierung auf dem FM-Medium zeigten die Bakterien das gleiche für *Frankia* typische Wachstum auf. Bei wiederholten Reinigungsausstrichen zeigten die Bakterien ein stetig abnehmendes Wachstumsverhalten auf, bis hin zum vollständigen Erliegen des Wachstums. Augenscheinlich fehlten für die nachhaltige Kultivierung des Symbionten spezielle, in der Wirtspflanze vorkommende Wuchsstoffe. Somit konnte keine dauerhafte Kultivierung der Reinkultur des isolierten *Frankia*-Stammes unter Laborbedingungen und der Abwesenheit der Wirtspflanze erzielt werden. Dieses Verhalten ist für viele *Frankia*-Stämme charakteristisch, auch ihre erst späte erfolgreiche Isolierung im Jahre 1978^[47] ist auf diese Eigenart der *Frankia* zurückzuführen. Viele *Frankia*-Stämme sind auf die in der Wirtspflanze produzierten Wuchsstoffe angewiesen. 1989 gelang es Quispel et al. aus der *Alnus glutinosa* das Dipteroicarpol als Wuchsstoff für den Symbionten zu isolieren^[118]. Der Bedarf an speziellen Wuchsstoffen, die von der Wirtspflanze synthetisiert werden, hängt von der Art der Symbiose ab.

Die nachfolgenden Untersuchungen sollten die Fragen klären, in welchen Mengen Cobalamine und speziell das Vitamin B₁₂ in *Frankia sp.* synthetisiert werden können und welche Faktoren das bakterielle Wachstum und die Cobalamin-Synthese beeinflussen. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde der Stamm *Frankia sp.* ArI3, der von der DSMZ GmbH angefordert wurde, verwendet. Die *Frankia sp.* weist ein sehr langsames Wachstum auf und bildet auch im Suspensionsmedium flockenartige Kolonien (vgl. Abb. 3-17 A und B). Dabei konnte durch den höheren Sauerstoff- und Stickstoffeintrag das Wachstum der *Frankia sp.* bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 rpm fast verdreifacht werden, gegenüber *Frankia*-Kulturen im vergleichbaren Medium unter stationären Bedingungen. Unter diesen Bedingungen konnte eine maximale Biotrockenmasse von ca. 14 mg erreicht werden. Es besteht jedoch keine signifikante Wachstumsabhängigkeit gegenüber der Kobalt(II)-Konzentration im Suspensionsmedium bei gleichzeitigem fast vollständigem Verbrauch des Kobalts (vgl. Abb. 3-18 und Abb. 3-19). Das Wachstum der Schüttelkulturen der *Frankia sp.* nimmt jedoch mit steigendem Kobaltverbrauch zu (vgl. Abb. 3-20 A), während dieses unter stationären

Bedingungen konstant bleibt. Auch dieses Verhalten ist sowohl auf den höheren Sauerstoff- und Stickstoffeintrag als auch auf die homogene Verteilung der Nährstoffe und Kobalts im Medium durch das Schütteln zurückzuführen. Sowohl die Schüttelkulturen der *Frankia* als auch unter stationären Kultivierungsbedingungen erfolgt ein fast vollständiger Verbrauch des Kobalts, wobei diese Beobachtung mit den spektroskopischen Kobalt-Untersuchungen in Wurzelknöllchen, Wurzeln und Bodenproben des Sanddorns übereinstimmt (vgl. Tabelle 3-6). Hier konnte der höchste Kobalt-Gehalt in den Wurzelknöllchen gemessen werden, während der Kobalt-Gehalt des Bodens um den Faktor 300 niedriger lag, in der Sanddornwurzel dagegen war die Kobalt-Konzentration nur um das Zweifache höher als im Boden (vgl. Abb. 3-16). Dieses Ergebnis deutet ganz auf eine Akkumulation des Kobalts im Symbionten hin.

Die anschließenden Untersuchungen zeigten einen linearen Anstieg der Vitamin B₁₂-Konzentration in *Frankia sp.* mit zunehmenden Kobalt(II)-Gehalt im Suspensionsmedium (vgl. Abb. 3-21). Die intrazelluläre Vitamin B₁₂-Konzentration der *Frankia sp.* betrug unter Zusatz von 5.000 µg/L Kobaltdichlorid 17,5 µg/g und 10,9 µg/g Vitamin B₁₂ ohne Kobalt-Zusatz, damit wird deutlich, dass das im Bakterium akkumulierte Kobalt in der Tat der Cobalamin-Synthese dient. Bei Zusatz von Dimethylbenzimidazol (DMI) steigt der intrazelluläre Vitamin B₁₂-Gehalt deutlich an (Abb. 3-22). Dabei ist das DMI als Ligand des Vitamin B₁₂, eines seiner wesentlichen Strukturbausteine (siehe Abb. 2-1). Das DMI spielt eine wichtige Rolle im Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus der *Frankia* sowie der Bildung des Vitamin B₁₂-Coenzym^[119]. Bei der Verdopplung der DMI-Konzentration im Medium konnte auch eine Verdopplung des Gehaltes am intrazellulären Vitamin B₁₂ beobachtet werden. Im Medienüberstand dagegen war die Vitamin B₁₂-Konzentration wesentlich geringer (vgl. Abb. 3-24) und im Medienüberstand ohne DMI-Zusätze konnte kein Vitamin B₁₂ detektiert werden. Der mikrobiologisch bestimmte Gesamt-Cobalamin-Gehalt lag jedoch zwischen 0,04-0,18 µg/100 mL (siehe Abb. 3-23), wobei auch hier eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Cobalamin- und Kobalt-Gehalt im Medium bestand. Die Spuren an Cobalamin und essentiellen Vitamin B₁₂ können aus den abgestorbenen und perforierten Bakterienzellen stammen, wobei *Frankia* das Cobalamin hauptsächlich für seinen eigenen Stoffwechsel benötigt. Die Erhöhung der essentiellen Vitamin B₁₂-

Produktion durch DMI-Zusatz war zugleich mit einer Vervierfachung des Wachstums von *Frankia sp.* verbunden (siehe Abb. 3-25).

Unter Zusatz von 30 µg/100 mL Cyanocobalamin in das DPM-Medium der *Frankia sp.* stieg neben dem Wachstum des Bakteriums auch der intrazelluläre Gesamt-Cobalamin-Gehalt von 7,7 µg/g auf 22,1 µg/g *Frankia*-Biotrockenmasse (siehe Abbildungen 3-26 und 3-27). Der intrazelluläre Gehalt an Vitamin B₁₂ betrug dabei 13,5 µg/g *Frankia*-Biotrockenmasse. Nach vierwöchiger Kultivierung konnte im Medienüberstand kein Vitamin B₁₂ mehr detektiert werden. Somit wurde das gesamte Cyanocobalamin von dem Bakterium aufgenommen. Um die Frage zu klären, wie viel essentielles Vitamin B₁₂ durch *Frankia* für das zelleigene Wachstum verbraucht und metabolisiert wird, wären weitere Untersuchungen unter Zusatz von isotopenmarkierten Cyanocobalamin interessant.

Beim Nachweis des Vitamin B₁₂ im Sanddorn konnten nur Spurenkonzentrationen von Vitamin B₁₂ im Bereich von 0,5-3 µg/100 g Frucht gefunden werden, was darauf hinweist, dass das in *Frankia* gebildete Vitamin größtenteils zum eigenen Wachstum von dem Bakterium synthetisiert und verbraucht wird. Es findet nur ein limitiertes Vitamin B₁₂-Austausch zwischen der Wirtspflanze und dem Symbionten statt. In zukünftiger Arbeit sollten eingehende Untersuchungen zur Symbiose zwischen *Frankia* und Sanddorn durchgeführt werden. Dabei sollten *in vivo*-Experimente durchgeführt werden, zur Aufklärung der Vitamin B₁₂-Synthese in Abhängigkeit von der Wachstumsphase des Symbionten, den Stressfaktoren und dem Alter der Bäume. Weiterführende Untersuchungen des Vitamin B₁₂-Transportes vom Symbionten in die Wirtspflanze notwendig. Durch die Aufklärung der Frage, welche Faktoren den Transport von Vitamin B₁₂ in Sanddornbeeren beeinflussen, könnte durch geeignete Kultivierungs- und Anbaumethoden des Sanddorns der Vitamin B₁₂-Gehalt in den Beeren erhöht werden.

Zusammenfassend konnten folgende Optimierungen erzielt werden:

- Eine Erhöhung der Biotrockenmasse der *Frankia sp.* bis zum Faktor 3 durch den erhöhten Sauerstoff- und Stickstoffeintrag, sowie eine homogene Nährstoffverteilung durch Schütteln der Suspensionskultur bei 120 rpm konnte erzielt werden. Eine Zunahme der Biotrockenmasse der *Frankia sp.*

konnte mit zunehmendem Kobaltverbrauch im Medium festgestellt werden, sowohl unter stationären Bedingungen als auch in der Schüttelkultur. Es konnte jedoch kein eindeutiger Zusammenhang des bakteriellen Wachstums mit der Kobalt(II)-Konzentration im Suspensionsmedium festgestellt werden (vgl. Abbildung 3-18).

- Ein linearer Zusammenhang zwischen der intrazellulären Produktion des essentiellen Vitamin B₁₂ und dem Kobalt(II)-Gehalt des Suspensionsmediums der *Frankia sp.* konnte festgestellt werden (vgl. Abbildung 3-21). Bei einer Erhöhung der Kobalt(II)-Konzentration im Medium um das Fünffache lässt sich der intrazelluläre Vitamin B₁₂-Gehalt des Bakteriums um den Faktor 1,3 steigern.
- Durch DMI-Zusatz konnte der intrazelluläre Vitamin B₁₂-Gehalt in *Frankia sp.* gesteigert werden, wobei eine Verdopplung der DMI-Konzentration bis 5.000 µg/L zu einer Verdopplung des Vitamin B₁₂-Gehaltes bis zu 30,48 µg/g führt (vgl. Abbildung 3-22).
- Das produzierte Vitamin B₁₂ wird unabhängig von dem Kobalt- und DMI-Angebot vollständig für das zelleigene Wachstum des Bakteriums verwendet. Durch Zusatz von Cyanocobalamin in das Suspensionsmedium lässt sich die Biotrockenmasse der *Frankia sp.*, unter vollständigem Verbrauch des essentiellen Vitamin B₁₂, um 50 % steigern (vgl. Abbildung 3-26).
- In Anbetracht des in Sanddorn bestimmten durchschnittlichen Vitamin B₁₂-Gehalts von 0,3-3 µg/100 g kann von einem geringfügigen symbiotischen Cobalamin-Austausch zwischen der Wirtspflanze und *Frankia* ausgegangen werden (vgl. Tabelle 3-7).

3.3 Vitamin B₁₂-Produktion bei mikrobieller Fermentation pflanzlicher Feststoffe

Wie im Kapitel 3.2 eingehend dargestellt, findet in *Frankia sp.* in der Tat eine intrazelluläre Vitamin B₁₂-Produktion in ausreichenden Mengen statt, wobei sich die Produktion des Vitamins durch das zunehmende Kobaltangebot und DMI-Zusätze im Suspensionsmedium der *Frankia* steigern lässt. Das Vitamin B₁₂ wird jedoch nicht von dem Bakterium ausgeschieden, sondern vollständig für das zelleigene Wachstum der *Frankia* verwendet. Wie die geringen Vitamin B₁₂-Gehalte im Sanddorn zeigen (vgl. Tabelle 3-7), findet nur in geringfügiger Weise ein Cobalamin-Austausch zwischen dem Symbionten und der Wirtspflanze statt. Der durchschnittliche Gehalt an essentiellm Vitamin B₁₂ in Sanddorn-Beeren liegt deshalb im Bereich von 0,3-3 µg/100 g.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Folgenden untersucht, ob durch andere mikrobielle Fermentationen das Vitamin B₁₂ in pflanzlichen Lebensmitteln angereichert werden kann. Dabei sollten pflanzliche Feststoffe milchsauer (malolaktisch) und durch Fermentation mittels *Bacillus megaterium* vergoren werden, welches weitverbreitet auch zur industriellen Herstellung von Vitamin B₁₂ verwendet wird. Das Ziel dieser Versuchsreihe war es zu untersuchen, in welchen Mengen das Vitamin B₁₂ auf diese Weise gebildet werden kann und durch welche Maßnahmen das Vitamin schonend angereichert werden kann. Im Einklang mit der urheimischen Firmenphilosophie der Firma Teutopharma GmbH wurden hierbei hauptsächlich europäische Pflanzen, wie Weißkohl, Giersch und Sanddorn, verwendet.

Mikrobiell vergorene pflanzliche Lebensmittel, wie Sauerkraut aber auch Wein haben eine uralte Tradition in der Ernährungskultur der Europäer. Seit Jahrhunderten wird malolaktische Fermentation, neben Vergärung von Pflanzen auch zur Herstellung von Sauerteig und Haltbarkeitsmachung und Veredelung von Milch- und Fleischprodukten, verwendet. Solche Produkte können infolge der mikrobiellen Vergärung Spuren an Cobalaminen enthalten, die jedoch den menschlichen Tagesbedarf an Vitamin B₁₂ nicht decken können. Das primäre Ziel dieser Versuchsreihe war es eine essentielle Vitamin B₁₂-Konzentration von 30 µg in 100 g

vergorenen pflanzlichen Materials zu erreichen, die eine pharmazeutische Herstellung von pflanzlichen, Vitamin B₁₂-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln erlauben würde. Dazu sollte der Vitamin B₁₂-Gehalt in bakteriell vergorenen pflanzlichen Lebensmitteln in Abhängigkeit von verwendeten Starterkulturen, dem pflanzlichen Feststoffmaterial und den Zusätzen mit einem hohen Anteil an Vitamin B₁₂-Analoge untersucht werden. Es sollten geeignete Methoden zur schonenden Anreicherung des Vitamins etabliert werden.

3.3.1 Vitamin B₁₂-Gehalt in fermentierten pflanzlichen Lebensmitteln

3.3.1.1 Mikrobielle Vergärung von Weißkohl mittels *B. megaterium* und ausgewählter malolaktischer Starterkulturen

Die Herstellung eines handelsüblichen Sauerkrauts erfolgt in der Regel durch malolaktische Vergärung des fein geschnittenen Weißkohls unter Zusatz von ca. 2 % (w/v) Kochsalz. Dabei werden üblicherweise Milchsäurebakterien, wie *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* und *Pediococcus pentosaceus* ^[127] als Starterkulturen verwendet. Die modernen industriellen Verfahren zur Herstellung von Vitamin B₁₂ beruhen auf der Fermentation bestimmter *Bacillus megaterium*-Stämme (vgl. Kapitel 2.1.3) und der anschließenden Extraktion des Vitamins.

Im Folgenden wurde der Vitamin B₁₂-Gehalt in malolaktisch und mit *B. megaterium* vergorenem Weißkohl untersucht. In dieser Arbeit wurden für malolaktische Vergärung, ähnlich der konventionellen industriellen Sauerkrautherstellung, die Milchsäurebakterien *Leuconostoc mesenteroides sp. mesenteroides* (DSM 20343), *Lactobacillus plantarum* (DSM 20174), *Lactobacillus brevis* (DSM 20054) und *Pediococcus pentosaceus* (DSM 20336) als Starterkulturen verwendet. Im Einklang mit der Firmenphilosophie der Firma Teutopharma GmbH wurde für die Fermentation mit *B. megaterium* der nicht geklonte Stamm (DSM 319) gewählt.

Hierbei wurden 150 g fein in Streifen geschnittenes frisches Weißkohl in 200 mL 2 % (w/v) NaCl-Lösung suspendiert und jeweils mit $1 \cdot 10^6$ Zellen malolaktischer Bakterien auf ein Gramm Weißkohl inokuliert und bei 25°C unter mikroaerophilen

Bedingungen über 6 Wochen inkubiert. Mit *B. megaterium* wurde die ähnlich vorbereitete NaCl-haltige Weißkohl-Suspension mit $4 \cdot 10^6$ Zellen/g Weißkohl inokuliert und bei 25 °C über sechs Wochen fermentiert.

Die Tabelle 3-8 zeigt die Ergebnisse der Fermentation und die erhaltenen Vitamin B₁₂-Gehalte im Vergleich zum Vitamin B₁₂-Gehalt im kommerziell erhältlichen Sauerkraut.

Tabelle 3-8: Vitamin B₁₂-Gehalt in malolaktisch und mit *B. megaterium* fermentierten Weißkohl im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Sauerkraut. Alle Konzentrationen wurden mit RP-HPLC nach IAC-SPE Aufreinigung bestimmt.

Probe	Beschaffenheit	Vitamin B ₁₂ µg/ 100 g
Weißkohl (<i>B. megaterium</i>)	frisch	0,86 ± 0,07
	lyophilisiert	5,89 ± 0,42
	fester Rückstand lyophilisiert	3,59 ± 0,06
	lyophilisierter Gärssaft	20,05 ± 0,5
Weißkohl (malolaktisch)	frisch	0,84 ± 0,003
	lyophilisiert	5,08 ± 0,63
Sauerkrautsaft (Alnatura)	frisch	0,49 ± 0,08 µg/ 100 mL
	lyophilisiert	1,36 ± 0,29
	lyophilisierte Trübstoffe	91,13 ± 1,47
	lyophilisierte Überstand	3,32 ± 0,35
Weinsauerkraut (Ja! Rewe)	frisch	1,22 ± 0,15
	lyophilisiert	1,72 ± 0,17
	lyophilisierte Trübstoffe	44,21 ± 2,60
	lyophilisierte Überstand	5,3 ± 0,15

Sowohl der mit *B. megaterium* als auch malolaktisch fermentierte Weißkohl weist Spurenkonzentrationen an Vitamin B₁₂ auf. Auch im kommerziell erhältlichem Sauerkrautsaft und Weinsauerkraut ist Vitamin B₁₂ nur in Spurenkonzentrationen von 0,49 µg/100 mL und 1,22 µg/100 g enthalten. Mittels Gefriertrocknung lässt sich jedoch der Gehalt an temperaturempfindlichen Vitamin B₁₂ in Abhängigkeit des Wassergehaltes der jeweiligen Probe um ein Vielfaches erhöhen. Auf diese Weise lässt sich im gefriergetrockneten mit *B. megaterium* vergorenem Weißkohl bis zu

sechsmal und in seinem Gärssaft sogar bis zu zwanzigmal höhere Vitamin B₁₂-Gehalt von bis zu 20,05 µg/100 g erzielen, im Vergleich zum frischen vergorenem Weißkohl. Besonders hohe Vitamin B₁₂-Konzentrationen können dabei in den gefriergetrockneten Trübstoffen des Sauerkrautsafts, in Höhe von bis zu 91,13 µg/100 g, erhalten werden.

3.3.2 Vitamin B₁₂-Produktion in mikrobiell fermentierten pflanzlichen Feststoffen unter Zusatz von *Spirulina platensis*

3.3.2.1 Vitamin B₁₂-Produktion bei mikrobieller Fermentation des Weißkohls mit *Spirulina platensis* Mikroalgen

Spirulina platensis wurde in dieser Arbeit als eine in Europa weit verbreitete Algenart mit hohem Cobalamin-Gehalt verwendet. Es wurden dabei die *Spirulina platensis* Mikroalgen (Naturescheune Sonnenmacht GmbH, Autenhausen) verwendet, die laut Herstellerangaben 4,7 µg Vitamin B₁₂ in 100 g der Mikroalgen enthalten. Mittels RP-HPLC konnten im Mikroalgen-Extrakt nach der IAC-SPE-Aufreinigung ohne vorherige Cyanidierung 2,7 µg/100 g Cyanocobalamin und nach der Cyanidierung des Mikroalgen-Extraktes 16,74 µg/100 g Cyanocobalamin in *Spirulina platensis* gefunden werden. Mittels mikrobiologischen Nachweises wurde ein Gesamt-Cobalamin-Gehalt in *Spirulina platensis* von 71,55 µg/100 g bestimmt, dabei kann davon ausgegangen werden, dass 54,81 µg/100 g davon nicht essentielle Cobalamin-Formen darstellen. Diese Mikroalgen zeigen u. a. auch eine mitogene Wirkung auf das bakterielle Wachstum. Durch Zusatz von *Spirulina* sollte der Weißkohl jeweils mittels *Bacillus megaterium* und malolaktisch vergoren werden. Es sollte dabei der Einfluss einer mit nicht essentiellen Cobalamin angereicherten Quelle auf den Vitamin B₁₂-Gehalt des auf solche Weise fermentierten Weißkohls untersucht werden.

Hierzu wurden 150 g feingeschnittenes Weißkohl in 200 mL 2 % (w/v) NaCl-Lösung suspendiert und mit 10 % (w/v) *Spirulina platensis* Mikroalgen (Naturescheune Sonnenmacht GmbH, Autenhausen) versetzt. Die jeweils mit *B. megaterium* und Milchsäurebakterien beimpften Suspensionen (Inokulum siehe Kapitel 3.3.1.1)

wurden 6 Wochen bei 25 °C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen mit einem Stabmixer homogenisiert und gefriergetrocknet. Nach der enzymatischen Extraktion des Cyanocobalamins mit KCN und nach IAC-SPE-Aufreinigung wurde der Vitamin B₁₂-Gehalt mittels RP-HPLC bestimmt. Die Tabelle 3-9 gibt den Vitamin B₁₂-Gehalt in den gefriergetrockneten und frischen Proben wieder.

Tabelle 3-9: Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin)-Konzentration im mit *Spirulina platensis* vergorenen Weißkohl. Alle Konzentrationen wurden mittels RP-HPLC nach IAC-SPE Aufreinigung bestimmt.

Probe	Beschaffenheit	Cyanocobalamin [µg/100 g]
Weißkohl mit 10 % (w/v) <i>Spirulina</i> (<i>B. megaterium</i>)	frisch	3,81 ± 0,06
	gefriergetrocknet	62,46 ± 0,19
Weißkohl mit 10 % (w/v) <i>Spirulina</i> (malolaktisch)	frisch	1,244 ± 0,025
	gefriergetrocknet	17,14 ± 0,58

Auffällig ist der hohe Vitamin B₁₂-Gehalt in dem mit *B. megaterium* und 10 % (w/v) *Spirulina*-Zusatz vergorenen gefriergetrockneten Weißkohl. Unter der Berücksichtigung des o. g. Vitamin B₁₂-Gehaltes und des mikrobiologisch bestimmten nicht essentiellen Cobalamin-Gehalts von 54,81 µg/100 g im eingesetzten *Spirulina*-Extrakt, kann von einer Umsetzung der nicht essentiellen Cobalamin-Formen der Mikroalgen zum Vitamin B₁₂ durch *B. megaterium* ausgegangen werden. Dabei bewirkt die Anwesenheit der Mikroalgen auch eine Erhöhung der Vitamin B₁₂-Produktion während der mikrobiellen Fermentation des Weißkohls, wobei diese insbesondere bei der Fermentation mit *B. megaterium* zum Ausdruck kommt. Die malolaktisch vergorene Weißkohlprobe weist eine Erhöhung des Vitamin B₁₂-Gehaltes unter *Spirulina*-Zusatz von 5,08 µg/100 g auf 17,14 µg/100 g auf (vgl. auch Tabelle 3-8). Dieses Ergebnis ist vermutlich auf die mitogene Wirkung der *Spirulina platensis* auf das mikrobielle Wachstum sowohl von *B. megaterium* als auch malolaktischer Starterkulturen zurückzuführen.

Zur Überprüfung der Annahme, dass das *B. megaterium* die nicht essentiellen Cobalamin-Formen der *Spirulina platensis* zum Vitamin B₁₂ umsetzt, wurde 1 g *Spirulina platensis* mit *B. megaterium* sieben Tage bei 30 °C inkubiert (siehe Anhang 5.4.1). Nach der Gefrier Trocknung wurde der Vitamin B₁₂-Gehalt mittels RP-HPLC nach der IAC-SPE-Aufreinigung bestimmt. Der Vitamin B₁₂-Gehalt der auf

diese Weise fermentierten *Spirulina* betrug $29,72 \pm 2,29 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. Somit kann bereits nach 1-wöchiger Inkubation der *Spirulina* mit *B. megaterium* der Gehalt an Vitamin B₁₂ nahezu verdoppelt werden (siehe oben, Vitamin B₁₂-Gehalt laut Herstellerangaben $4,7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$, mittels RP-HPLC nach IAC-SPE-Aufreinigung bestimmte Vitamin B₁₂-Gehalt des cyanidierten *Spirulina*-Extraktes betrug $16,74 \mu\text{g}/100 \text{ g}$).

3.3.2.2 Einfluss des *Spirulina*-Extraktes auf das Wachstum von *Frankia alni* im flüssigen Medium und ihre Vitamin B₁₂-Produktion

Im Folgenden soll untersucht werden, ob neben der mitogenen Wirkung des *Spirulina*-Extraktes eine ähnliche Umsetzung der nicht essentiellen Cobalamine der Mikroalgen in das Vitamin B₁₂ durch *Frankia sp.* stattfindet und, ob ähnlich der Fermentation der *Spirulina* mit *B. megaterium*, eine Anreicherung des essentiellen Vitamin B₁₂ in *Frankia sp.* erfolgt.

Frankia alni wurde zwei Wochen bei 30 °C und 120 rpm in 100 mL flüssigem DPM-Medium mit 5.000 µg/L DMI und 2.500 mg/L CoCl₂·6 H₂O mit jeweils 0,5 % (w/v) Extrakt aus *Spirulina platensis*, welche jeweils nach vorherigem Ultraschall-Aufschluss und nicht aufgeschlossen eingesetzt wurde. Nach einigen Tagen konnten die ersten kugelförmigen Kolonien im Suspensionsmedium beobachtet werden, sowie eine deutliche Wachstumsverbesserung im Vergleich zur Kultur ohne Zusatz von *Spirulina*-Extrakt (siehe Abb. 3-28).

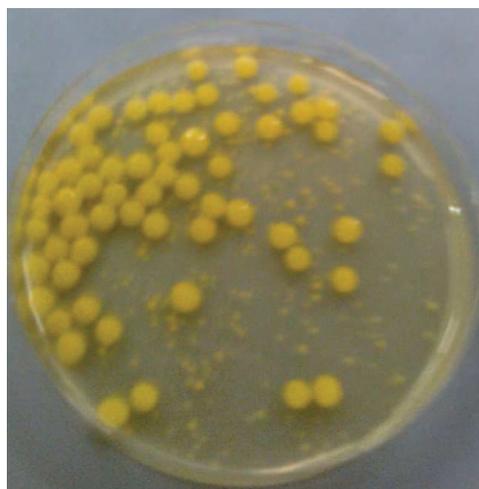


Abb. 3-28: *Frankia alni* nach 2-wöchiger Kultivierung in DPM-Medium mit 0,5 % (w/v) *Spirulina platensis*-Extrakt. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Suspensionskultur in eine Petri-Schale umgefüllt.

In Tabelle 3-10 sind die Biotrockenmassen der *Frankia*-Kulturen und die Anzahl der Kolonien im DPM-Suspensionsmedium neben der intrazellulären Konzentration an essentiellm Vitamin B₁₂ in *Frankia sp.* wiedergegeben.

Tabelle 3-10: Biotrockenmasse von *Frankia sp.* im DPM-Suspensionsmedium mit 5.000 µg/L DMI und 2.500 µg/L CoCl₂ · 6 H₂O, Vitamin B₁₂-Gehalt in *Frankia sp.* und Anzahl der Kolonien im DPM-Suspensionsmedium mit und ohne *Spirulina*-Supplementierung. Der Vitamin B₁₂-Gehalt (Cyanocobalamin) wurde mittels RP-HPLC nach IAC-SPE Aufreinigung bestimmt (vgl. Anhang Kapitel 5.1.1 und 5.1.4). Abkürzungen: n. n. = nicht nachweisbar.

Zusätze der <i>Frankia</i> -Kultur	Biotrockenmasse im DPM-Medium [g/100 mL]	Anzahl der Kolonien in 100 mL DPM-Medium	Cyanocobalamin in <i>Frankia sp.</i> [µg/g]
0,5 % (w/v) <i>Spirulina</i> -Extrakt	0,05738	50	1,98
	0,10535	56	1,08
0,5 % (w/v) <i>Spirulina</i> -Extrakt nach Ultraschall-Aufschluss	0,0617	46	3,01
	0,0599	39	5,85
Ohne <i>Spirulina</i> -Zusatz	0,0226	-	3,96
	0,014	-	n. n.

Spirulina platensis weist eine deutliche mitogene Wirkung auf das mikrobielle Wachstum der *Frankia alni* auf, die sich in der Erhöhung der Biotrockenmasse und gleichzeitiger Wachstumsbeschleunigung des Bakteriums äußert. Auffällig sind dabei die Ausbildung kugelförmiger Kolonien im Suspensionsmedium (siehe Abbildung 3-28) und ein deutlich besseres Wachstum im Suspensionsmedium, unter Zusatz von dem nicht mit Ultraschall aufgeschlossenem *Spirulina*-Extrakt. Im Gegenzug zum *B. megaterium* findet in Anwesenheit von *Spirulina* zwar eine deutliche Wachstumsverbesserung der *Frankia sp.* statt, es erfolgt jedoch keine Umsetzung der nicht essentiellen Cobalamine zum Vitamin B₁₂. Nach zweiwöchiger Inkubation im DPM-Medium unter Zusatz von DMI und *Spirulina* liegt die Cyanocobalamin-Konzentration in *Frankia sp.* zwischen 1,08-5,85 µg/g Biotrockenmasse. Dagegen betrug die intrazelluläre Vitamin B₁₂-Konzentration in *Frankia sp.* ohne *Spirulina*-Zusatz 3,96 µg/g Biotrockenmasse.

Ähnlich den im Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnissen, wird offensichtlich auch unter Zusatz Cobalamin-reicher Mikroalgen das Vitamin B₁₂ zum zelleigenen Wachstum der *Frankia* verwendet. Demnach kann auch in Anwesenheit der *Spirulina* keine Anreicherung des Vitamin B₁₂ in *Frankia* beobachtet werden.

3.3.2.3 Vitamin B₁₂-Produktion bei der Fermentation von Giersch und Sanddorn-Saft mit *B. megaterium* unter Zusatz von DMI

Wie bereits in vorigen Kapiteln erwähnt, ist Dimethylbenzimidazol (DMI) eines der wichtigsten Strukturbausteine des Vitamin B₁₂. Im Folgenden soll untersucht werden, ob unter Zusatz von DMI eine Erhöhung der Vitamin B₁₂-Produktion bei der Fermentation der Giersch und des Sanddorn-Saftes bewirkt werden kann, wie schon bei *Frankia* nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.2).

Hierzu wurden jeweils 50 mL des frischen Sanddornbeeren-Saftes in 50 mL steriler 2 % (w/v) NaCl/Glukose-Lösung verdünnt. Jeweils 10 g der getrockneten Giersch-Blätter wurden in 100 mL steriler 2 % (w/v) NaCl/Glukose-Lösung suspendiert. In einem parallelen Versuchsansatz wurden Sanddornsaft/NaCl/Glukose-Lösung und Giersch/NaCl/Glukose-Suspension mit jeweils 5.000 µg/L DMI versetzt. Im Anschluss wurden alle Versuchsansätze jeweils mit 5 % *B. megaterium*-Vorkultur inokuliert und 7 Tage bei 30 °C und 130 rpm inkubiert. Die Tabelle 3-11 zeigt die Anfangs- und die Endwerte der Glukose- und Laktat-Konzentrationen, den pH-Wert und die erzielten Vitamin B₁₂-Konzentrationen der einzelnen Fermentations-suspensionen. Der Vitamin B₁₂-Gehalt wurde mit der Standard-Methode mit RP-HPLC nach IAC-SPE-Aufreinigung der gefriergetrockneten fermentierten Giersch- und Sanddornsaft-Proben ermittelt (siehe Anhang Kapitel 5.1.1 und 5.1.4).

Die in Tabelle 3-11 vorgestellten Anfangs- und Endkonzentrationen für Glukose und Laktat zeigen, dass sowohl in der Giersch-Suspension als auch im verdünnten Sanddorn-Saft die Fermentation mittels *B. megaterium* erfolgreich verlaufen ist. Bei der Giersch-Probe sowohl mit als auch ohne DMI-Zusatz ist dabei eine pH-Wert-Abnahme zu beobachten, die bei Sanddorn-Saft eher geringfügig bleibt. Die zugesetzte Glukose wird während der Fermentation der Giersch vollständig abgebaut, unter gleichzeitiger Erhöhung der Laktat-Konzentration. Im Sanddorn-Saft

dagegen steigen sowohl in Anwesenheit des DMI als auch ohne DMI-Zusatz die Glukose-Konzentrationen unter gleichzeitiger Zunahme der Laktat-Konzentrationen. Vermutlich werden die im Sanddorn-Saft vorhandenen Disaccharide infolge der Fermentation mit *B. megaterium* gespalten, unter Freisetzung von Glukose, die dann unter Freisetzung von Laktat verbraucht wird.

Tabelle 3-11: Anfangs- und Endwerte für pH, Glukose- und Laktat-Konzentrationen und Vitamin B₁₂-Endkonzentrationen nach 7-tägiger Inkubation der mit *B. megaterium* fermentierten Giersch und des Sanddorn-Saftes. Die Glukose-/Laktat-Konzentrationen wurden mittels YSI 2300 nach 10-facher Verdünnung mit deion. Wasser bestimmt. Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) wurde in gefriergetrockneten Proben mittels RP-HPLC nach vorheriger IAC-SPE-Aufreinigung bestimmt.

Probe	Anfangskonzentrationen und pH-Wert			Endkonzentrationen und pH-Wert			
	pH	Glukose g/L	Laktat g/L	pH	Glukose g/L	Laktat g/L	Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin) [µg/100 g]
Giersch	5,63	15,03	0,01	4,95	0	0,121	1,48 ± 0,32
Giersch mit DMI	5,55	13,8	0,07	4,77	0,075	0,094	1,6 ± 0,3
Sanddorn-Saft	2,73	18,84	0,071	2,64	21,32	0,161	4,51 ± 0,44
Sanddorn-Saft mit DMI	2,72	18,19	0,088	2,65	19,57	0,151	15,35 ± 0,08

Während die fermentierte Giersch Vitamin B₁₂-Konzentrationen im Bereich von 1,48-1,6 µg/100 g aufweist, wobei kein Zusammenhang zwischen dem Vitamin B₁₂-Gehalt und DMI-Zusätzen zu verzeichnen ist, ist eine fast dreifache Zunahme der Vitamin B₁₂-Konzentration im mit DMI-Zusatz vergorenen Sanddorn-Saft festzustellen. Nach 7-tägiger Fermentation mit *B. megaterium* konnten im gefriergetrockneten Sanddorn-Saft ohne DMI-Zusatz eine Cyanocobalamin-Konzentration von 4,51 µg/100 g detektiert werden, dagegen in Anwesenheit des DMI konnte eine deutliche Zunahme der Vitamin B₁₂-Konzentration bis zu 15,35 µg/100 g beobachtet werden. Der niedrige pH-Wert des zur Fermentation verwendeten verdünnten Sanddorn-Saftes wirkt sich dabei begünstigend auf die Vitamin B₁₂-Produktion aus, wobei in Anwesenheit des DMI eine 3-fache Erhöhung der essentiellen Vitamin B₁₂-Konzentration gegenüber der Konzentration im vergorenen Sanddorn-Saft ohne DMI-Zusatz, und eine 30-fache Erhöhung der Vitamin B₁₂-Konzentration im

Vergleich zu der Durchschnittskonzentration von 0,54 µg/100 mL Vitamin B₁₂ im frischen Saft der Kultursorten des Sanddorns erzielt werden kann. In schwach saurer Giersch-Suspension dagegen mit pH 5,5-5,6 konnten keine Auswirkungen des DMI auf den Vitamin B₁₂-Gehalt in mit *B. megaterium* vergorener Giersch festgestellt werden.

3.3.3 Diskussion

Mikrobiell vergorenes Sauerkraut weist Spurenkonzentrationen an Vitamin B₁₂ auf, die sich jedoch durch Gefriertrocknung auf eine schonende Weise aufkonzentrieren lassen. Durch thermische Trocknungsverfahren können bis zu 40 % der temperatur- und lichtempfindlichen Cobalamine zersetzt werden ^[120]. Bei der Gefriertrocknung dagegen wird die Feuchtigkeit einer gefrorenen Probe unter Vakuum auf eine schonende Weise entzogen. Einen besonders hohen Vitamin B₁₂-Gehalt von 20 µg/100 g weist der gefriergetrocknete Weißkohl-Gärsaft des mit *B. megaterium* fermentierten Weißkohls auf. In malolaktisch vergorenem Weißkohl konnten nur in gefriergetrockneten Trübstoffen des Sauerkraut- und Weinsauerkrautsafts hohe Vitamin B₁₂-Gehalte von 44 µg/100 g und 91 µg/100 g gefunden werden. Dies kann damit erklärt werden, dass solche Trübstoffe besonders hohe Konzentration an Milchsäurebakterien enthalten, insbesondere im Sauerkrautsaft.

Bei der mikrobiellen Vergärung von pflanzlichen Feststoffen konnte unter Zusatz von *Spirulina platensis* eine Anreicherung des Vitamin B₁₂ durch das *B. megaterium* beobachtet werden. Dabei weist *Spirulina platensis* einen Gesamt-Cobalamin-Gehalt von 71,5 µg/100 g auf, von dem jedoch nur 16,7 µg/100 g die für den Menschen essentiellen Cobalamin-Formen darstellen. Nach 6-wöchiger Fermentation des Weißkohls mit 10 % (w/v) *Spirulina*-Zusatz konnte sowohl bei Vergärung mit *B. megaterium* als auch mit Milchsäurebakterien eine deutliche Konzentrationszunahme an Vitamin B₁₂ im gefriergetrockneten Weißkohl festgestellt werden, im Unterschied zu einer Vergärung ohne Mikroalgen-Zusatz. Die höchsten Konzentrationen von 62 µg/100 g konnten im mit *B. megaterium* und unter Mikroalgen-Zusatz vergorenen Weißkohl gefunden werden. Diese Konzentrationszunahme ist vermutlich auf eine Umsetzung der in *Spirulina* enthaltenen Vitamin B₁₂-Analoga und nicht essentieller Cobalamine durch *B. megaterium* zurückzuführen, wobei durch mitogene Wirkung

der *Spirulina* das bakterielle Wachstum verbessert und auch zusätzlich die Vitamin B₁₂-Produktion verstärkt wird. Auch nach einwöchiger Kultivierung des *B. megaterium* unter Zusatz von 1 % (w/v) *Spirulina* konnte eine Erhöhung des Vitamin B₁₂-Gehalts von 16,7 µg/100 g auf 29,7 µg/100 g beobachtet werden. Dagegen im malolaktisch vergorenen *Spirulina* verändert sich der Gehalt an Vitamin B₁₂ nicht.

Bei einer Kultivierung der *Frankia sp.* in Anwesenheit der *Spirulina platensis* konnte eine Erhöhung der Biotrockenmasse von *Frankia sp.* um fast das Fünffache erzielt werden gegenüber einer Kultivierung ohne *Spirulina*-Zusatz. Dieses positive Wachstumsverhalten beruht auf den mitogenen Eigenschaften der *Spirulina*. Trotz der deutlichen Erhöhung der Biotrockenmasse von *Frankia sp.* konnte jedoch keine signifikante Erhöhung des Vitamin B₁₂-Gehalts erzielt werden. Unter der Berücksichtigung der Biotrockenmassenzunahme von *Frankia sp.* lässt sich schlussfolgern, dass ähnlich den im Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnissen werden Cobalamine größtenteils für das zelleigene Stoffwechsel der *Frankia sp.* verwendet.

Bei der Vergärung von Giersch und Sanddorn-Saft mit *B. megaterium* unter Zusatz von DMI konnte bei Sanddorn-Saft eine Verdreifachung des Vitamin B₁₂-Gehaltes gegenüber einer Vergärung ohne DMI-Zusatz erzielt werden und eine 30-fache Zunahme der Vitamin B₁₂-Konzentration gegenüber dem Durchschnittsgehalt im frischen Sanddorn-Saft der Kultursorten. Somit wird das DMI, wie bereits bei *Frankia* beobachtet, auch bei der Cobalamin-Synthese im *B. megaterium* für die Produktion des Vitamin-B₁₂ verwendet. Dabei wirkt sich der saure pH-Wert des Sanddorn-Saftes günstig auf die Synthese von Vitamin B₁₂ aus. Bereits nach einwöchiger Fermentation des Sanddorn-Saftes mit *B. megaterium* bei pH 2,7 und unter Zusatz von 5.000 µg/L DMI lassen sich 15,3 µg/100 g Vitamin B₁₂ im gefriergetrockneten Gärüberstand erzielen. Dagegen im gefriergetrockneten Gärüberstand des Sanddorns-Saftes ohne DMI-Zusatz konnten 4,5 µg/100 g des Vitamin B₁₂ nachgewiesen werden. Unter schwach sauren Bedingungen der Giersch-Suspension mit pH 5,5-5,6 konnten keine Auswirkungen des DMI auf den Vitamin B₁₂-Gehalt nach der Fermentation mit *B. megaterium* festgestellt werden. So lagen in sowohl mit als auch ohne DMI-Zusatz vergorener Giersch die Konzentrationen jeweils bei 1,5 µg/100 g und 1,6 µg/100 g Vitamin B₁₂.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund der Vielfältigkeit unterschiedlicher Analytikmethoden für Cobalamine wurden zu Beginn dieser Arbeit die am häufigsten in der Lebensmittelanalytik verwendeten Nachweismethoden miteinander verglichen. Dabei sollte eine verlässliche Analytikmethode zum Nachweis von essentiellen Cobalamin-Formen (Vitamin B₁₂) in pflanzlichen Matrices gefunden werden, die einen schnellen, effizienten und ökonomischen Nachweis auch für serienmäßige Qualitätskontrolle-Untersuchungen erlaubt. Hierzu wurde der Anfang der 60er Jahre entwickelte und weitverbreitete mikrobiologische Nachweis (MBA) für Cobalamine nach AOAC 952.20, und der seit den 90er Jahren vorzugsweise für klinische Untersuchungen gebräuchliche Enzymimmunoassay (ELISA) mit dem instrumentellen Nachweis mittels RP-HPLC nach einer klassischen und nach einer innovativen immunoaffinitätschromatographischen Festphasenextraktion des Vitamin B₁₂, verglichen. Die Methoden sollten dabei neben ihrer Selektivität gegenüber der für den Menschen essentiellen Cobalamin-Formen, auch die Anforderungen der Reproduzierbarkeit, Genauigkeit und Wiederfindung bei ihrer Anwendung auf pflanzliche Matrices erfüllen. Zur Bestimmung der Wiederfindung von Vitamin B₁₂ wurden eine reine Vitamin B₁₂-Lösung sowie Fleisch- und Sanddornbeeren-Extrakt, die jeweils mit einer definierten Menge an Cyanocobalamin versetzt wurden, als Testlösungen verwendet.

Sowohl MBA als auch ELISA zeigten bei einer reinen Cyanocobalamin-Lösung und mit Cyanocobalamin versetztem Fleischextrakt eine gute Wiederfindung von 90-92 % (MBA, vgl. Kapitel 3.1.1.1) und 105-97 % (ELISA, vgl. Kapitel 3.1.1.2). Dagegen konnten in Proben pflanzlichen Ursprungs mittels ELISA 82 % Vitamin B₁₂ mit einer sehr hohen Varianz wiedergefunden werden. Mittels MBA ließen sich sogar nur 22 % Vitamin B₁₂ wiederfinden. Dabei konnte in Anwesenheit einiger typischer Bestandteile des Sanddornbeeren-Saftes ein deutlicher Verlust des linearen Bakterienwachstums in Abhängigkeit von der Cyanocobalamin-Konzentration festgestellt werden, wobei insbesondere mit zunehmender Konzentration des Flavonoids Quercetin als auch des Vitamin C das Wachstum des Testorganismus verlangsamt wird. Dieses Ergebnis korreliert mit den Literaturangaben ^[88,89], die

ebenfalls von der mangelnden Spezifität gegenüber den essentiellen Formen der Cobalamine als auch von der Ungenauigkeit der Methode in Anwesenheit einiger weiterer Bestandteile der Testprobe berichten. Auch in *Spirulina platensis* konnte mittels MBA ein Gesamt-Cobalamin-Gehalt von 71,55 µg/100 g nachgewiesen werden, wobei laut Herstellerangaben der Vitamin B₁₂-Gehalt dieses Mikroalgen-Extrakts 4,7 µg/100 g beträgt (vgl. Kapitel 3.3.2.1). Damit sind mittels MBA auch die für den Menschen nicht essentielle Cobalamin-Formen nachweisbar.

Mittels ELISA lässt sich zwar eine deutlich höhere Wiederfindung erzielen, jedoch weist diese eine sehr hohe Varianz bei der Anwendung auf pflanzliche Proben auf (vgl. Tabelle 3-1). Diese Abweichungen beruhen offensichtlich auf Matrixeffekten des verwendeten Testextrakts, wobei u. a. Korrelationen mit weiteren reduktionsfähigen Bestandteilen der Testprobe, die die Bindung zwischen dem Konjugat und Vitamin B₁₂ der Probe beeinflussen, das Ergebnis verfälschen. Dabei können beispielsweise hohe Vitamin C-Konzentrationen in der Probe sogar höhere Vitamin B₁₂-Konzentrationen vortäuschen^[94]. Damit eignen sich diese beiden Methoden nicht zum Nachweis von Vitamin B₁₂ in den pflanzlichen Proben mit hohem Ascorbinsäure-Gehalt.

Als nächstes wurde versucht das Vitamin B₁₂ mittels RP-HPLC nachzuweisen, wobei das Vitamin B₁₂ zunächst mit Hilfe einer geeigneten und für das Vitamin B₁₂ spezifischen Methode, extrahiert und aufkonzentriert werden musste. Hierzu wurde zum einen die klassische Festphasenextraktion an einer C18-Kartusche und zum anderen eine immunologische Aufreinigung mittels immunoaffinitätschromatographischer Festphasenextraktion getestet. Dabei wurden neben einer reinen Cyanocobalamin-Lösung, sowohl eine tierische als auch eine pflanzliche Extraktprobe, die jeweils mit einer bestimmten Konzentration an Cyanocobalamin versetzt wurden, verwendet. Die SPE mittels C18-Kartusche zeigte sowohl nach polarer als auch unpolarer Elution neben einer hohen Anzahl von unbekanntem Peaks auch eine sehr schlechte Trennung und Verlust der Basislinie, was gleichermaßen keine präzise quantitative Bestimmung des Vitamin B₁₂ ermöglichte.

Dagegen zeigten die mittels immunoaffinitätschromatographischer Festphasenextraktion aufgereinigte Proben sowohl tierischer als auch pflanzlicher Extrakte eine sehr gute spezifische Retention des Cyanocobalamins auf der Säule und die damit

verbundene vollständige Trennung des Vitamins von den weiteren Bestandteilen der Probe. Zusätzlich wurde die Basislinie im folgenden RP-HPLC-Chromatogramm deutlich stabilisiert. Damit ist nun eine genaue quantitative Aussage über das Vitamin B₁₂ möglich. Dabei ließen sich 85 % Vitamin B₁₂ in der pflanzlichen Sanddornbeeren-Probe und 87 % Vitamin B₁₂ in der Fleischextrakt-Probe wiederfinden. Der Verlust von ca. 15 % Vitamin B₁₂ bei der Wiederfindung lässt sich vermutlich auf die öl- und fetthaltige Beschaffenheit der Probe zurückführen, die die Bindung des Vitamin B₁₂ an die spezifischen Antikörper beeinflussen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die durchschnittliche Vitamin B₁₂-Konzentration im Sanddorn ermittelt, die in der Regel zwischen 0,3-3 µg/100 g liegt.

Um die Frage zu klären, in welchen Mengen Vitamin B₁₂ im Symbionten des Sanddorns produziert werden kann, wurde zunächst versucht *Frankia* aus den Knöllchen der Sanddorn-Wurzel zu isolieren. Ein erfolgreiches Wachstum des zu isolierenden Symbionten konnte auf dem Mikroelement-haltigen FM-Agarmedium erzielt werden. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten dabei die für die *Frankia* typische Morphologie. Eine Stammerhaltung und vollständige Dekontamination des Symbionten war jedoch nicht möglich. Entsprechend wurde ein von DSMZ angeforderter *Frankia sp.*-Stamm (DSM No.: 44251, ArI3, isoliert aus *Alnus rubra*) für weitere Untersuchungen verwendet. Dabei weist das Bakterium ein typisches langsames Wachstumsverhalten unter Bildung geringer flockenartiger Biomasse auf. Durch das Schütteln der Suspensionskulturen und damit verbundenen erhöhten Sauerstoff- und Stickstoffeintrag, sowie eine homogene Nährstoffverteilung konnte das Wachstum der Bakterien um den Faktor 3 erhöht werden, gegenüber dem Wachstumsverhalten unter stationären Bedingungen. Es konnte keine direkte Abhängigkeit des Wachstums von *Frankia sp.* von der Kobalt-Konzentration im Medium beobachtet werden, dagegen konnte bei zunehmendem Kobaltverbrauch ein linearer Anstieg der bakteriellen Biotrockenmasse in einer Schüttelkultur festgestellt werden. Es konnte dabei ein nahezu vollständiger Verbrauch des Kobalts von fast 98 % in einer *in vitro*-Kultur der *Frankia* unabhängig von der Anfangs-Kobaltkonzentration beobachtet werden. Dieser Kobalt-Verbrauch führte jedoch nur zu einem stetigen Anstieg des intrazellulären Vitamin B₁₂-Gehaltes. Die Ergebnisse zeigten, dass das Kobalt nicht das Wachstum der *Frankia sp.* beeinflusst. Sein

vollständiger Verbrauch aus dem Suspensionsmedium und nur geringe Zunahme der intrazellulären Vitamin B₁₂-Konzentration korrelieren mit den Ergebnissen der spektroskopischen Kobalt-Bestimmung in den Boden-Proben, sowie in der Sanddorn-Wurzel und Wurzelknöllchen. Dabei konnte der höchste Kobalt-Gehalt in Wurzelknöllchen gemessen werden, während in der Sanddorn-Wurzel und Boden-Probe der Kobalt-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten spektroskopischen Analytikmethode lag. Ausgehend von dem durchschnittlichen Kobalt-Gehalt der Böden ist der Kobalt-Gehalt in Wurzelknöllchen des Sanddorns um den Faktor 300 höher als in ihrem Umgebungsboden. Damit wird das Kobalt durch die *Frankia* aufgenommen und gespeichert, wird jedoch nicht vollständig für die Cobalamin-Produktion verwendet. Dabei konnten bei einer Anfangskonzentration von 5.000 µg/L Kobalt(II)-chlorid im Suspensionsmedium 17,5 µg/g Vitamin B₁₂ gefunden werden, während unter Kobalt-freien Bedingungen die intrazelluläre Vitamin B₁₂-Konzentration bei 10,9 µg/g lag. Dagegen ließ sich die intrazelluläre Vitamin B₁₂-Konzentration unter Zusatz von 5.000 µg/L 5,6-Dimethylbenzimidazol (DMI) auf 30,4 µg/g verdoppeln, im Vergleich zu einer unter ähnlichen Bedingungen kultivierten *Frankia*-Kultur ohne DMI-Zusatz.

Das Vitamin B₁₂ wird von dem Bakterium offensichtlich für seinen eigenen Stoffwechsel synthetisiert und gebraucht, was die geringen extrazellulären Vitamin B₁₂-Konzentrationen im Medienüberstand zeigen, sowie der vollständige Verbrauch des zugesetzten Vitamin B₁₂ im Suspensionsmedium der *Frankia sp.* Dabei konnte unter Zusatz von Vitamin B₁₂ eine Erhöhung der Biomasse um fast 40 % beobachtet werden, im Vergleich zum *Frankia*-Wachstum ohne Vitamin B₁₂-Zusatz. Auch unter Zusatz von *Spirulina platensis*-Extrakt, der einen sehr hohen Gesamt-Cobalamingehalt von 71,5 µg/100 g aufweist, konnte eine Erhöhung des *Frankia*-Wachstums um mehr als das Dreifache erzielt werden. Dabei blieb die intrazelluläre Vitamin B₁₂-Konzentration gering.

Da es sich bei allen Versuchen stets um *in vitro*-Versuche handelte, wären *in vivo*-Untersuchungen zur Auswirkung der Kobalt- und DMI-Versorgung auf die Symbiose, das Gedeihen und den daraus resultierenden Vitamin B₁₂-Gehalt im Sanddorn, notwendig. Der Vitamin B₁₂-Gehalt in Knöllchen sollte in Abhängigkeit von der Wachstumsphase des Symbionten, den Stressfaktoren und dem Alter der

Bäume bestimmt werden. Weiterführende Untersuchungen des Vitamin B₁₂-Transportes vom Symbionten in die Wirtspflanze notwendig. Hierzu könnten geeignete Isotopenmarkierungstechniken den Transport des Vitamin B₁₂ von dem Symbionten *Frankia* in die Sanddornbeeren aufklären. Anschließend sollte die Frage geklärt werden, welche Faktoren den Transport von Vitamin B₁₂ in die Sanddornbeeren beeinflussen, wobei durch geeignete Kultivierungs- und Anbaumethoden des Sanddorns der Vitamin B₁₂-Gehalt in den Beeren erhöht werden könnte.

Zum Schluss wurde versucht das Vitamin B₁₂ durch unterschiedliche Vergärungsstrategien von pflanzlichen Feststoffen anzureichern. Für die malolaktische Vergärung wurden Milchsäurebakterien verwendet, die zur Herstellung des handelsüblichen Sauerkrauts in der Nahrungsmittelindustrie verwendet werden (siehe Kapitel 3.3.1.1). Für die industrielle Produktion des Vitamin B₁₂ wird in der Regel ein gentechnisch veränderter *B. megaterium*-Stamm verwendet ^[17] (vgl. Kapitel 2.1.3). Im Sinne der urheimischen Unternehmensphilosophie der Firma Teutopharma GmbH wurde in dieser Arbeit der nicht gentechnisch veränderte *B. megaterium* DSM 319 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH zur Vergärung des pflanzlichen Materials verwendet. In Abhängigkeit von dem Feuchtigkeitsgehalt der Probe konnte eine Aufkonzentrierung des Vitamin B₁₂-Gehaltes auf ein Vielfaches mittels Gefriertrocknung gegenüber einer frischen Probe erzielt werden. Dabei konnte der höchste Vitamin B₁₂-Gehalt im Gärssaft des vergorenen Weißkohls nachgewiesen werden, wobei insbesondere der mit *B. megaterium* vergorene Gärssaft mit 20 µg/100 g wesentlich höheren Cobalamin-Gehalt aufwies als der Gärssaft nach malolaktischer Gärung. Dagegen gefriergetrockneter, malolaktisch vergorener Weißkohl wies eine höhere Vitamin B₁₂-Konzentration von 5 µg/100 g auf, als das kommerziell erhältliche Weinsauerkraut mit 1,7 µg/100 g Vitamin B₁₂. Bemerkenswert hoch waren jedoch die Vitamin B₁₂-Konzentrationen von 44 µg/100 g und 91 µg/100 g in gefriergetrockneten Trübstoffen des kommerziellen milchsauer vergorenen Sauerkrautsaftes und Weinsauerkrauts. Dabei handelte es sich bei diesen Trübstoffen hauptsächlich um die jeweiligen Milchsäure-Bakterien und deren intrazellulären Vitamin B₁₂-Gehalt.

Bei der Vergärung von Weißkohl jeweils mit *B. megaterium* und malolaktischen Bakterien unter Zusatz von 10 % *Spirulina platensis* konnte eine signifikante Erhöhung der Vitamin B₁₂-Konzentration in gefriergetrockneten Weißkohl um mehr als das Zehnfache erzielt werden, wobei der auf diese Weise mit *B. megaterium* vergorene Weißkohl nach der Gefriertrocknung den höchsten Vitamin B₁₂-Gehalt von 62 µg/100 g aufwies. Unter der Berücksichtigung des Gesamt-Cobalamin-Gehaltes im *Spirulina platensis* von 71,5 µg/100 g (mit MBA bestimmt), wobei 16,7 µg/100 g davon den Vitamin B₁₂-Gehalt ausmachen (mit RP-HPLC nach IAC-SPE-Aufreinigung bestimmt), lässt sich schließen, dass die nicht essentiellen Cobalamine durch das *B. megaterium* in die essentiellen Cobalamin-Formen umgewandelt wurden. Dabei übt *Spirulina platensis* auch einen mitogenen Effekt auf das bakterielle Wachstum aus, wodurch vermutlich auch die Produktion des Vitamin B₁₂ im *B. megaterium* erhöht wird. Der mitogene Effekt konnte dabei bei der Kultivierung der *Frankia sp.* unter Zusatz des *Spirulina*-Extraktes beobachtet werden. Eine Verdopplung des Vitamin B₁₂-Gehaltes konnte bereits nach einwöchiger Fermentierung des 1 % *Spirulina*-Extraktes mit *B. megaterium* beobachtet werden.

Durch den Einsatz des Dimethylbenzimidazols (DMI), eines der wichtigsten Strukturbausteine der essentiellen Cobalamin-Formen, konnte der Vitamin B₁₂-Gehalt bei der Vergärung des Sanddorn-Saftes mit *B. megaterium* um das Dreifache erhöht werden, gegenüber einer Vergärung ohne DMI-Zusatz. Ähnlich den Ergebnissen der Fermentation der *Frankia sp.* mit DMI wird auch bei der Vergärung des Sanddorn-Saftes mit *B. megaterium* die Nukleinbase in die Struktur des Cobalamins eingebaut und dadurch der Gehalt an Vitamin B₁₂ erhöht. Der saure pH-Wert des Sanddorn-Saftes von 2,7 wirkte sich günstig auf die Synthese von Vitamin B₁₂ aus, wobei bereits nach einwöchiger Fermentation mit *B. megaterium* unter Zusatz von 5.000 µg/L DMI 15,3 µg/100 g Vitamin B₁₂ im gefriergetrockneten Gärüberstand erzielt werden konnten. Im gefriergetrockneten Gärüberstand des Sanddorns-Safts ohne DMI-Zusatz konnten 4,5 µg/100 g des Vitamin B₁₂ nachgewiesen werden. Unter schwach sauren Bedingungen der Giersch-Suspension, die einen pH-Wert von 5,5-5,6 aufwies, konnten keine Auswirkungen des DMI auf den Vitamin B₁₂-Gehalt nach Fermentation mit *B. megaterium* festgestellt werden. Hier lagen die Konzentrationen an Vitamin B₁₂ bei 1,5 µg/100 g und 1,6 µg/100 g.

Abschließend ist festzustellen, dass die auf die konventionelle Weise malolaktisch vergorene pflanzliche Feststoffe nur geringe Konzentrationen an Vitamin B₁₂ aufweisen, die für die weitere Entwicklung von Cobalamin-haltigen Nahrungsergänzungsmitteln aus Pflanzen rein europäischer Herkunft nicht ausreicht. Dagegen lassen sich durch die Vergärung von Weißkohl unter Zusatz von 10 % der mitogenen *Spirulina platensis* die nicht essentiellen Cobalamin-Formen mittels *B. megaterium* in das Vitamin B₁₂ umsetzen, und damit ein hoher Gehalt von bis zu 62 µg/100 g Vitamin B₁₂ erzielen. In Kombination mit der Gefriertrocknung lässt sich damit auf schonende Weise das Vitamin in Abhängigkeit von dem Feuchtigkeitsgehalt der Proben aufkonzentrieren. Für die Folgeuntersuchungen im Einklang mit der urheimischen Unternehmensphilosophie von Teutopharma GmbH wären insbesondere Vergärungsversuche von weiteren in Symbiose lebenden europäischen Pflanzen mit hohem nicht essentiellen Cobalamin-Gehalt, wie der Lupine oder europäischen Algen-Arten mittels *B. megaterium* interessant.

Auch unter Zusatz von DMI lässt sich bei der Vergärung von Sanddorn-Saft mit *B. megaterium* der Vitamin B₁₂-Gehalt um den Faktor 3 steigern. Für nachfolgende Arbeiten sind weitere Versuche zur Optimierung und Steigerung der Vitamin B₁₂-Produktion durch Fermentation des Sanddorn-Saftes mit *B. megaterium* erforderlich. Da das *B. megaterium* nicht zu den probiotischen Mikroorganismen zählt, sollte bei der anschließenden Produktentwicklung eine geeignete Sterilisationsmethodik entwickelt werden, die aber gleichzeitig mit einem geringen Vitamin B₁₂-Verlust verbunden ist.

5 Anhang

5.1 Nachweis von Vitamin B₁₂

5.1.1 Extraktion von Cyanocobalamin aus pflanzlichen und tierischen Lebensmitteln

Feste Lebensmittelproben (getrocknete Sanddornbeeren, oder Blätter) müssen vor der Extraktion im keramischen Mörser, evtl. unter Zuhilfenahme von flüssigem Stickstoff, so fein wie möglich gemörsert werden. 5-10 g einer pulverförmigen festen Lebensmittelprobe bzw. 5-10 mL flüssige Probe in einem 300 mL Erlenmeyerkolben in 60 – 80 mL Acetat-Puffer (50 mM, pH 4,0; Herstellung siehe Kapitel 5.1.3.1) suspendieren und unter Rühren mit 1 g Pepsin, 300 µL α-Amylase und 1 mL 1 % (w/v) KCN-Lösung versetzen. Die Suspension anschließend für 3 h bei 37 °C unter ständigem Rühren bzw. Schütteln inkubieren. Den enzymatischen Aufschluss durch das 30-minütige Kochen bei 100 °C im Dampfbad und gelegentlichem Schwenken stoppen. Nach dem sofortigen Abkühlen im Eisbad die Suspensionen anschließend in 50 mL-Zentrifugengläser aliquotieren und bei 4000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugieren, evtl. den Vorgang mehrere Male wiederholen bis der Überstand klar ist. Die eventuellen restlichen Trübstoffe (oder Fettschicht bei tierischen Proben) können durch einen Whatman-Filter gefiltert werden. Anschließend den pH-Wert des flüssigen Extraktes auf 4-6 mit 2,5 M NaOH-Lösung titrieren. Die beim Titrieren evtl. sich ausflockenden Trübstoffe in pflanzlichen Extrakten werden durch das 5 min Zentrifugieren bei 4000 rpm und 4 °C getrennt und der Überstand anschließend mit milliQ Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Ölhaltige Proben, wie die der Sanddornbeeren, müssen nach der Titration über mehrere Stunden bei 4 °C gekühlt werden, der klare Extrakt kann durch das vorsichtige Dekantieren in einen sauberen 100 mL-Messkolben abgetrennt werden. Der Ölüberstand wird anschließend mit max. 10 mL Acetat-Puffer versetzt und erneut bei 4 °C zur Abtrennung der Ölschicht von der wässrigen Phase gekühlt. Nach dem Vereinigen der wässrigen Phasen, die Extrakte mit milliQ Wasser auf 100 mL auffüllen.

5.1.2 Extraktion des intrazellulären Cyanocobalamins aus *Frankia sp.*

Frankia sp.-Kultur in vorher abgewogene 50 mL-Zentrifugengläser umfüllen und bei 4000 rpm und 4 °C 15 min zentrifugieren. Nach dem Abtrennen des Medienüberstands den Zellpellet gefriertrocknen und anschließend wiegen. Das trockene Zellpellet in 2-5 mL Acetat-Puffer (50 mM, pH 4,0; siehe Kapitel 5.1.3.1) resuspendieren und 1 min mittels UltraTurex aufschließen. 15-30 mL Acetat-Puffer zu den aufgeschlossenen Bakterien-Zellen hinzufügen und mit 400 mg Pepsin, 100 µL α -Amylase und 400 µL 1 % KCN-Lösung versetzen. Die Suspension anschließend 3 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln bei 120 rpm inkubieren. Der enzymatische Aufschluss wird durch das 35 min Kochen bei 100 °C im Dampfbad bei regelmäßigem Umschwenken (alle 10 min) gestoppt. Nach dem sofortigen Abkühlen im Eisbad die Suspensionen bei 4000 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugieren und den Überstand in ein sauberes 50 mL-Zentrifugenglas dekantieren. Den pH-Wert des Extraktes auf 4-6 mit 2,5 M NaOH-Lösung titrieren und auf ein Volumen von 15 mL für die anschließende IAC-SPE-Aufreinigung, oder auf 40 mL für den MBA-Nachweis mit Acetat-Puffer auffüllen.

5.1.3 Herstellung der für die Extraktion verwendeten Lösungen und Puffer

5.1.3.1 Der Acetat-Puffer

4,1 g Natriumacetat in ca. 800 mL milliQ Wasser lösen und anschließend mit 100 % Essigsäure auf pH 4,0 titrieren. Die Puffer-Lösung auf ein Endvolumen von 1 L mit milliQ Wasser auffüllen und den pH-Wert nochmal kontrollieren.

5.1.3.2 Die 1 % KCN-Lösung

0,1 g KCN in ein 15 mL-Zentrifugengläschen mit einem Schraubverschluss abwiegen und in ca. 5 mL milliQ Wasser lösen, anschließend auf ein Endvolumen von 10 mL mit milliQ Wasser auffüllen.

Entsorgung:

Alle mit KCN oder mit seiner Lösung in Kontakt gekommenen Laborutensilien werden in einer 5 % (w/w) Natriumhypochlorit-Lösung über Nacht inkubiert, wobei das KCN oxidiert wird. Der pH-Wert wird anschließend in einem Wasserbad mit 2 M HCl-Lösung neutralisiert.

5.1.4 Nachweis von Cyanocobalamin mittels RP-HPLC

5.1.4.1 Aufreinigung von Cyanocobalamin mittels IAC-SPE

In dieser Arbeit wurden die EASI-EXTRACT[®] VITAMIN B₁₂-Immunoaffinitätssäulen von R-Biopharm, Rhone LTD, zum Nachweis von Vitamin B₁₂ mittels HPLC, verwendet.

- **Säulenvorbereitung:**

Die Säulen müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Kappe am oberen Ende der Säule entfernen und mit dem Vakuum-Block verbinden, der mit 15 mL-Auffanggefäßen verbunden ist.

- **IAC-SPE-Aufreinigung:**

Den Schutzpuffer entfernen und die Probelösung auf die Säule auftragen. Am Ablasshahn eine Durchflussrate von ca. 2 mL/min einstellen, ein leichter stetiger Unterdruck wird durch die Ölrotationspumpe gewährleistet. Unterdruck ist wichtig für die vollständige Bindung des Cyanocobalamins an die Antikörper. Insgesamt maximal 35 mL/Säule Probelösung auftragen.

- **Waschen der Säule:**

10 mL milliQ Wasser in 2 mL Portionen durch die Säule laufenlassen. Durch leichten Unterdruck (Ölrotationspumpe) wird bei jedem Schritt das Wasser vollständig von der Säule entfernt. Anschließend beide Enden der Säule auf einem trockenen Küchentuch ausklopfen, ebenso wie den Adapter, der das Vakuumblock und das 15 mL-Auffanggefäß mit der IAC-SPE-Säule verbindet.

- **Elution:**

Es werden 5 mL Methanol/Säule (100 %, HPLC grade) zur Elution verwendet. Das Methanol wird mit ca. 1 Tropfen/Sekunde in ein sauberes 15 mL-Zentrifugengläschen durch die Säule fließen gelassen. Zur vollständigen Denaturierung des Antikörpers und Freisetzung des gebundenen Vitamin B₁₂ muss die Säule insgesamt drei Mal rückgespült werden, durch die Umkehrung der Flussrichtung mittels einer Spritze. Die Säule kann dabei nach dem Durchlassen von 3 mL Methanol rückgespült werden. Nach dem Durchlassen der restlichen 2 mL Methanol wird der Rest des Lösemittels durch das Anlegen des Vakuums von der Säule abgesaugt. Das Methanol im Eluat mittels Gefriertrocknen unter Vakuum entfernen und den Rückstand in 500 µL Methanol aufnehmen. Die Probe wird anschließend mittel RP-HPLC (siehe Kapitel 5.1.4.2) analysiert.

- **Entfernung des Methanols durch das Gefriertrocknen:**

Die 15 mL-Zentrifugengläschen mit einem Filterpapier und mit Schraubkappen, welche mit mehreren kleinen Öffnungen versehenen wurden, verschließen und im Aluminium-Blockständer des Gefriertrockners stellen. Den Aluminium-Blockständer vorher ca. 30 min bei – 80 °C temperieren. Mit den Zentrifugengläschen versehenen Aluminium-Blockständer in das flüssige Stickstoff eintauchen bis die methanolische Lösung in den Gläsern gelartig festgeworden ist. Anschließend den Aluminium-Blockständer mit Zentrifugengläschen und einem Becherglas mit ca. 100 mL gefrorenem Wasser rasch in den Gefriertrockner stellen und bei 4 mbar und – 20 °C über Nacht trocknen. Beim Übersiedeln sollte die Anlage rasch leicht belüftet werden um den Druck zu erhöhen.

5.1.4.2 RP-HPLC-Methode zur Detektion des Cyanocobalamins nach der IAC-SPE-Extraktion

- **Methode:**

- Säule: Kinetex (Phenomenex) 2,6 µ C18 100 Å, 100 x 4,60 mm;
- Vorsäule: C18 4 x 3,0 mm
- Eluent:

Lösung A - 0,25 % (v/v) TFA (wässrig);

Lösung B - 100 % Acetonitril (HPLC grade)

Tabelle 5-1: Gradientbedingungen für die RP-HPLC-Methode mit der Kinetex 2,6 u C18-Säule.

Zeit [min]	A:B [%]
0	100:0
0,5	100:0
0,7	85:15
10	85:15
13	100:0
15	100:0

- Temperatur der Säule: 30 °C
- Durchflussrate: 0,5 mL/min
- Wellenlänge des UV-Detektors: 361 nm
- Injektionsvolumen: 100 µL
- Nachweisgrenze: 0,17 µg/mL
- Quantifizierungsgrenze: 0,12 µg/mL
- Wiederfindungsrate:
 - Reine Cyanocobalamin-Lösung 105 %
 - Gespiktes Sanddornbeeren-Extrakt 83 %

5.1.4.3 HPLC-Methode nach der SPE-Aufreinigung

- **Methode:**

- Säule: C18 (Phenomenex) Gemini-NX, 5 µm, 110 Å, 250 x 4,6 mm;
- Vorsäule: C18 4 x 3,0 mm
- Eluent:
 - Lösung A 0,25 % (v/v) TFA (wässrig)
 - Lösung B 100 % Acetonitril (HPLC grade)

- **Gradientbedingungen:**

Tabelle 5-2: Gradientbedingungen für die RP-HPLC-Methode mit der Gemini-NX C18-Säule von Phenomenex.

Zeit [min]	A:B [%]
0	100:0
0,5	100:0
11	85:15
19	75:25
25	75:25
26	85:15
30	90:10
37	100:0

- Temperatur der Säule: 30 °C
- Durchflussrate: 0,5 ml/min
- Wellenlänge des UV-Detektors: 361 nm
- Injektionsvolumen: 100 µL
- Nachweisgrenze: 0,1-0,25 µg/mL

5.1.5 Der mikrobiologische Nachweis von Vitamin B₁₂ nach

AOAC 952.20

- **Test-Organismus:** *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*
(Synonym: *Lactobacillus lactis* oder *Lactobacillus leichmannii*; DSM 20355).
- **AOAC Medium für die Animpfkultur von *L. lactis*:**
 - Kultivierungsbedingungen für die Stamm-Kultur: mikroaerophil

Tabelle 5-3: Flüssigmedium nach AOAC.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
Peptonisierte Milch	15
Hefeextrakt	5
Glukose	10
KH ₂ PO ₄	2
Filtrierter Tomatensaft	100 mL/L
Tween 80	10 mL/L

Die o.g. Inhaltstoffe ohne Tween 80 in ca. 500 mL deion. Wasser lösen. Nach der Zugabe des filtrierten Tomatensaftes, den pH-Wert auf 6,5 einstellen. Anschließend Tween 80 dazugeben. Nach vollständiger Lösung des Tween 80 das Medium auf 1 L auffüllen. Das Medium anschließend in 10 mL Portionen in die 15 mL Schraubdeckel-Glasröhrchen umfüllen und bei 121 °C 15 min autoklavieren. Anschließend sofort im Wasserbad auf Raumtemperatur kühlen und bei 4 °C aufbewahren.

- **Agar-Medium nach AOAC:**

Zu 500 mL flüssigen Medium nach AOAC 5 – 7,5 g Agar dazugeben und im Wasserbad erhitzen bis das Agar vollständig gelöst ist. Anschließend ca. 10 mL des noch heißen Mediums in die 15 mL Schraubdeckel-Glasröhrchen umfüllen und bei 121 °C 15 min autoklavieren. Danach das noch heiße Medium leicht schwenken (nicht Schütteln!), um eine weitgehend homogene Verteilung des Agars im Medium zu erreichen, und sofort im Wasserbad kühlen. Das Medium kann bei 4 °C ca. 2 Monate aufbewahrt werden.

- **Vorbereitung der Animpfkultur von *L. lactis* für MBA:**

Ausgehend von der *L. lactis*-Stammkultur (diese soll min. 3 erfolgreiche Transfer-Kultivierungen während der ersten Woche im MRS-Medium abgeschlossen haben) werden mindestens 3 Transfer-Kultivierungen von *L. lactis* in einer Zeitperiode von 1 Woche in das Agar-Medium nach AOAC durchgeführt. Anschließend wird eine

MBA *L. lactis*-Vorkultur im Flüssigmedium nach AOAC bei 37 °C für 24 h vorbereitet.

Die Zellen der Suspensions-Kultur von *L. lactis* werden mittels 15 min Zentrifugieren bei 4 °C geerntet. Anschließend wird die Kultur 3-4 Mal in 5-10 mL der sterilen Saline gewaschen (das 15-minütige Zentrifugieren der Zellsuspension bei 4000 rpm und 4 °C und Verwerfen des Saline-Überstands) und anschließend in 10 mL steriler Saline resuspendiert. Das auf solche Weise vorbereitete Test-Inokulum sollte eine Zelldichte von ca. $1 \cdot 10^9$ Zellen/mL aufweisen. Die Testmedia können anschließend mit jeweils 15 µL des Inokulums beimpft werden.

- **Vorbereitung der Test-Media:**

- Vorbereitung der Cyanocobalamin-Lösung für MBA:

- i. Standard-Lösung, 100 µg/mL Cyanocobalamin:

In ein sauberes 100 mL Messkolben werden 0,01 g Cyanocobalamin abgewogen und mit 25 % (v/v) Ethanol auf 100 mL aufgefüllt. Die Lösung ist im Dunkeln bei 4 °C 2 Monate haltbar.

- ii. Stamm-Lösung, 100 ng/mL Cyanocobalamin:

Die Standard-Lösung wird 1000-fach mit 25 % (v/v) Ethanol verdünnt. Die Lösung ist im Dunkeln bei 4 °C eine Woche haltbar.

- iii. Intermediate-Lösung, 1 ng/mL Cyanocobalamin:

Die Stamm-Lösung wird 100-fach mit 25 % (v/v) Ethanol verdünnt. Die Lösung ist im Dunkeln bei 4 °C eine Woche haltbar.

- iv. Arbeits-Lösung, 40 pg/mL Cyanocobalamin:

Die Intermediate-Lösung wird 25-fach mit milliQ Wasser verdünnt. Diese Lösung muss für den MBA stets frisch vorbereitet werden.

- **Vorbereitung der Schraubdeckel-Glasröhrchen, sowie aller Glasgeräte für MBA**

Die Glasröhrchen, sowie Messkolben, Bechergläser etc. werden mit 25 % (v/v) Ethanol und anschließend mit deion. Wasser sorgfältig gespült und vor dem MBA min. 2 h bei ca. 180 °C getrocknet, um eventuelle Vitamin B₁₂-Reste zu zersetzen.

- **Basal-Medium und Kalibrationsreihe**

Verwendet wird das fertige, kommerziell erhältliche Vitamin B₁₂-Assay Medium von Fluka. Dabei wird das pulverisierte Medium (83 g/L Vitamin B₁₂-Assay Medium) in Wasser gelöst und anschließend mit Tween 80 (2 mL/L) versetzt. Ein feinpulveriger Niederschlag ist laut Herstellerangaben für den Assay nicht störend.

In der Tabelle 5-4 ist schematisch die Zusammensetzung der Kalibrationsreihe von Cyanocobalamin wiedergegeben. Dabei handelt es sich stets um eine Doppelbestimmung.

Tabelle 5-4: Medien-Zusammensetzung für die Cyanobalamin-Kalibrationsreihe des MBA mit Doppelbestimmung.

Nr.	Cyanocobalamin [pg/mL]	Arbeits-Lösung [mL]	milliQ Wasser [mL]	Basal-Medium [mL]
0 ⁻	0	0	5	5
0 ⁺	0	0	5	
1	4	1	4	
2	8	2	3	
3	12	3	2	
4	16	4	1	
5	20	5	0	

Bei der Nr. 0⁻ handelt es sich um die Sterilkontrolle, die nicht mit *L. lactis*-Kultur beimpft wird. Eine von den sterilen Pipettenspitzen mit der die Medien mit *L. lactis* beimpft werden, wird in dieses Medium reingehalten zur Sterilitätskontrolle des Tests.

Bei der Nr. 0⁺ handelt es sich um die Negativ-Kontrolle. Dabei wird dieses Medium ebenfalls mit 15 μ L der *L. lactis*-Kultur beimpft. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C darf der maximale OD₅₄₆-Wert 0,15-0,17 betragen. Ist der OD₅₄₆-Wert > 0,17 kann der Test nicht weiter ausgewertet werden. Die Bakterien dürfen nicht in einem Vitamin B₁₂-freien Medium wachsen.

Die Tabelle 5-5 zeigt schematisch die Zusammensetzung der Testmedien ebenfalls in Doppelbestimmung.

Tabelle 5-5: Zusammensetzung der Testmedien für den MBA.

Nr.	Proben-Extrakt [mL]	MilliQ Wasser [mL]	Basal- Medium [mL]
T-1	1	4	5
T-2	2	3	
T-3	3	2	
T-4	4	1	

Alle Röhren mit einem Autoklavier- und Isopropanol-festen Stift mit der entsprechenden Nummerierung beschriften. Die Medien werden 5 min bei 121 °C sterilisiert und sofort mit Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Medien sind max. 24 h stabil.

Nach dem Beimpfen der Medien mit jeweils 15 μ L der *L. lactis*-Vorkultur (außer Nr. 0⁻) werden diese im Stehen bei 37 °C 24-48 h inkubiert und anschließend der OD₅₄₆-Wert in 1mL-Küvetten bestimmt.

In Abbildung 5-1 ist ein Beispiel einer Cyanocobalamin-Kalibrationsgerade bei einem erfolgreichen mikrobiologischen Nachweis von Vitamin B₁₂ gezeigt.

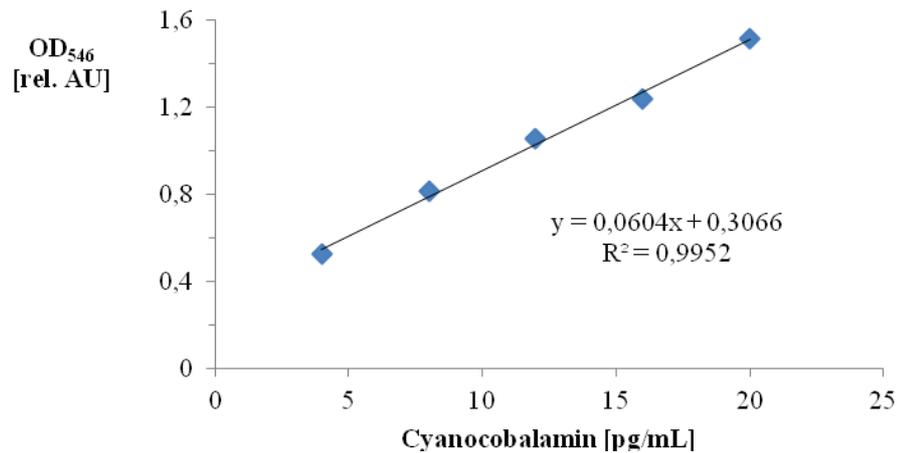


Abbildung 5-1: Beispiel einer Cyanocobalamin-Kalibrationsgerade für *L. lactis* nach 24 h Inkubation bei 37 °C.

5.1.6 Enzymimmunoassay von Vitamin B₁₂ (ELISA)

Der Nachweis erfolgte mittels Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B₁₂ in Nahrungsmitteln von Immunolab GmbH. Es wurden alle im Kit gebrauchsfertig enthaltenen Reagenzien verwendet, darunter:

- Standard-Lösungen (0; 0,4; 1; 4; 10; 40 ng/mL Cyanocobalamin);
- Konjugat (Vitamin B₁₂-Peroxidase);
- Substratlösung (TMB);
- Stopp-Lösung (0,5 M H₂SO₄);
- Probenverdünnungspuffer (PBS);
- Waschlösung (PBS, Tween 20) und
- 96well-Mikrotiterplatte mit 12 herausnehmbaren Streifen, beschichtet mit polyklonalem anti-Vitamin B₁₂.

• Testdurchführung:

Vor Beginn der Analyse werden Mikrotiterplatte und alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben werden mit dem Verdünnungspuffer bis zu einem Konzentrationsbereich von 0,4 bis 4 ng/mL Vitamin B₁₂ verdünnt. Je 50 μL der Standard-Lösungen bzw. Probelösungen werden im Doppelansatz in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und sofort mit jeweils 50 μL Konjugatlösung versetzt. Die Platte wird nun 60 min bei Raumtemperatur, mit Folie abgedeckt und

bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Vertiefungen mit der Pipette abgesaugt und drei Mal mit jeweils 300 μL Waschlösung (10-fach verdünnt) gewaschen. Nach dem Entfernen der Waschlösung und Abtrocknen werden die einzelnen Vertiefungen mit je 100 μL Substratlösung versetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 100 μL Stopp-Lösung gestoppt, dabei erfolgt ein Farbumschlag von gelb nach blau. Nach dem Mischen wird sofort die Extinktion bei 450 nm gemessen.

5.2 Verwendete Medien

5.2.1 MRS-Medium, Stammhaltungsmedium für *L. lactis*

- **Bedingungen:** anaerob

Tabelle 5-6: Zusammensetzung des MRS-Mediums, das Stammhaltungsmedium für *L. lactis*.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
Caseinpepton	10
Fleischextrakt	10
Hefeextrakt	5
Tween 80	1 mL/L
Vitamin-Lösung	10 mL/L
K_2HPO_4	2
NH_4 -Acetat	5
Na_2 -Citrat	2
0,4 % (w/v) Resazurin-Lösung	3 mL/L
Cystein-HCl	0,5
Glukose	20

- **Salzlösung:**

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/L

- **Vitamin-Lösung:**

Tabelle 5-7: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung für das MRS-Medium.

Chemikalie	Konzentration [mg/L]
Biotin	2
Folsäure	2
Vitamin B ₆	10
Vitamin B ₁	5
Vitamin B ₂	5
Nicotinsäure	5
D-Ca-Pantothenat	5
4-Aminobenzoesäure (PABA)	5
Liponsäure	5
Vitamin B ₁₂	0,1

Die schwerlöslichen Vitamine werden abgewogen und in Wasser gelöst. Der Lösevorgang kann beschleunigt/erleichtert werden durch Zugabe einiger Tropfen 2,5 M NaOH-Lösung. Anschließend werden die leichtlöslichen Vitamine dazugegeben und nach dem Lösen der pH-Wert auf 6-7 eingestellt. Die Vitamin-Lösung wird in ein mit N₂/CO₂ (80/20) begastes mit Butylgummi festverschlossenes Fläschchen durch ein Sterilfilter (0,2 µm Porendurchmesser) filtriert.

- **Vorbereitung der konzentrierten Glukose-Lösung:**

400 g/L Glukose werden im Wasser unter Erhitzen gelöst und in ein mit Butylgummi und Aluminiumring verschlossenes und mit N₂/CO₂ (80/20) begastes autoklaviertes Fläschchen durch ein Sterilfilter (0,2 µm Porendurchmesser) filtriert.

Alle Inhaltsstoffe (aufgelistet unter MRS Medium) außer Glukose, Vitamin-Lösung und Cystein-HCl werden in der Salzlösung gelöst. Der pH-Wert wird auf 6,2 eingestellt. Die Lösung wird bis zum Farbumschlag von rot nach gelb unter Rühren gekocht. Nach dem Farbumschlag wird die Lösung ohne Rühren weitere 10-15 min.

unter Begasen mit N₂/CO₂ (80/20)-Gas gekocht und anschließend im Eisbad im N₂/CO₂-Gegenstrom gekühlt. Nach dem Abkühlen wird im Medium das Reduktionsmittel Cystein-HCl gelöst. Jeweils 25 mL Medium werden unter N₂/CO₂-Gegenstrom in die sauberen 50 mL-Kultivierungsfläschchen aliquotiert und sofort mit Butylgummi und einem Aluminiumring fest verschlossen. Das Medium wird sofort bei 121 °C 30 min autoklaviert.

Glukose- und Vitamin-Lösungen werden unter sterilen Bedingungen zu dem MRS-Basismedium mit der Spritze dazugegeben. Wenn kein Farbumschlag (von gelb zu rötlich orange) beobachtet werden kann, wird das Medium mit 5 % (v/v) *L. lactis* beimpft. Bei einem Farbumschlag kann der Rest des Sauerstoffs vor dem Beimpfen des Mediums mit einigen Tropfen Na₂S-Lösung reduziert werden. Die Kultur wird 24 h bei 37 °C stationär inkubiert

Anmerkung: Die Kultivierungsfläschchen müssen stets nach dem gründlichen Waschen mit Spülmittel unter Leitungswasser, anschließend mehrmals mit deion. Wasser gespült werden, um eventuelle Spülmittel-Rückstände zu entfernen. Das Gleiche gilt auch für die Schraubdeckel-Glasröhrchen, die für die Kultivierung der Animpfkultur und für den Assay verwendet werden. Spülmittel-Rückstände führen bei dem äußerst empfindlichen Organismus zu Mutationen und damit zu falschen Ergebnissen.

5.2.2 Isoliermedien für *Frankia sp.*

5.2.2.1 BAP-Agarmedium

Tabelle 5-8: Zusammensetzung des BAP-Agarmediums.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
Glukose	10
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,01
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,008
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	0,01
NH ₄ Cl	0,267
Spurenelementlösung	1 mL/L
Vitamin-Lösung	1 ml/l
Puffer-Lösung	20 ml/l
Agar	15

- **Spurenelementlösung:**

Tabelle 5-9: Zusammensetzung der Spurenelementlösung des BAP-Mediums.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,22
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,08
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,025
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	0,001

- **Vitamin-Lösung:**

Tabelle 5-10: Zusammensetzung der Vitamin-Lösung des BAP-Mediums.

Chemikalie	Konzentration [mg/100 mL]
Vitamin B ₁	10
Vitamin B ₆	50
Nikotinsäure	50
Biotin	22,5
Folsäure	10
Vitamin B ₂	10

- **Puffer-Lösung:**

Tabelle 5-11: Zusammensetzung der Puffer-Lösung des BAP-Mediums.

Chemikalie	Konzentration [g/200 mL]
K ₂ HPO ₄	17,418
KH ₂ PO ₄	13,61
pH 6,8	

5.2.2.2 Stickstoffarmes BAP-Agarmedium

Zusammensetzung wie oben unter Ausschluss von Ammoniumchlorid.

5.2.2.3 FM-Agarmedium

Tabelle 5-12: Zusammensetzung des FM -Agarmediums.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
K ₂ HPO ₄	3
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
NaCl	0,3
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	0,16
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,117
Spurenelement-Lösung (siehe BAP)	1 mL/L
Vitamin-Lösung (siehe BAP)	1 mL/L
Na-Pyruvat	3
CaCO ₃	0,05
Agar	15

pH 6,9

Nach der pH-Einstellung CaCO₃ und Agar hinzufügen.

5.2.2.4 QMod-Agarmedium

Tabelle 5-13: Zusammensetzung des QMod-Agarmediums.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
K_2HPO_4	300 mg/L
NaH_2PO_4	200 mg/L
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	200 mg/L
KCl	200 mg/L
Hefeextrakt	500 mg/L
Caseinpepton	5
Glukose	10
Eisencitrat-Lösung	2 mL/L
Spurenelement-Lösung	1 mL/L
$CaCO_3$	100 mg/L
Agar	15
Lipid Supplement	50 mg/L

pH 6,8-7,0

- **Eisencitrat-Lösung:**

Eisen(III)-Citrat 0,5 g/100 mL

Citronensäure 0,5 g/100 mL

- **Spurenelement-Lösung:**

Tabelle 5-14: Zusammensetzung der Spurenelement-Lösung des QMod-Mediums.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
H_3BO_3	1,5
$MnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,8
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,6
$CuSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,1
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,27
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,0084

- **Lipid Supplement:**

500 mg L- α -Lecithin in 50 mL 96 % Ethanol lösen, auf 100 mL mit deion. Wasser auffüllen und bei – 20 °C aufbewahren.

5.2.2.5 DPM-Agarmedium

Tabelle 5-15: Zusammensetzung des DPM-Agarmediums.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01
Na-Pyruvat	1,2
Hoagland's-Spurelementlösung	1 mL/L
Eisen-EDTA-Lösung	3,6 ml/l
Agar	15

pH 6,8

- **Eisen-EDTA-Lösung:**

Tabelle 5-16: Zusammensetzung der Eisen-EDTA-Lösung des DPM-Mediums.

Chemikalie	Konzentration
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,75 g/200 mL
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,56 g/mL

- **Hoagland's-Spurenelementlösung:**

Tabelle 5-17: Zusammensetzung der Hoagland's-Spurenelementlösung des DPM-Mediums.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
H_3BO_3	2,8
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,8
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,025

5.2.2.6 Nalidixinsäure-haltige Medien

N-arme BAP-, FM-, QMod- und DPM-Agarmedien wurden laut Anleitung mit 10 g/L Agar vorbereitet. Vor dem Autoklavieren wurden in jedes Medium je 10 µg/mL Nalidixinsäure hinzugefügt.

5.2.2.7 Cycloheximid (Antimycotikum)-haltige Medien

N-arme BAP-, FM-, QMod- und DPM-Agarmedien wurden laut Anleitung mit 10 g/L Agar vorbereitet. Vor dem Autoklavieren wurden in jedes Medium 100 µg/mL Actidion (Cycloheximid) hinzugefügt.

5.2.2.8 Isolierungstechniken

Keramik-Mörser wurden gewaschen und mit deion. Wasser mehrere Male gespült. Anschließend 1 h bei 121 °C autoklaviert.

Sanddorn-Wurzelknöllchen wurden unter Leitungswasser gründlich gewaschen und mit milliQ Wasser mehrere Male gespült. Mit einem Küchentuch wurde grober Schmutz entfernt und anschließend wurden die Knöllchen erneut mehrere Male mit milliQ Wasser gespült und zur oberflächlichen Desinfektion für ca. 5 min unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur in 2 % NaClO-Lösung inkubiert. Die nun gelblich-braune Lösung wurde verworfen und die Knöllchen mehrere Male mit sterilem milliQ Wasser unter sterilen Bedingungen gewaschen. Anschließend wurde die Obeflächendesinfektion nochmal wiederholt. Nach dem Spülen der Knöllchen mit sterilem milliQ Wasser wurden die Knöllchen zur Neutralisierung mehrere Male mit steriler Phosphat-Puffer-Lösung (pH 6,8, siehe Tabelle 5-11) gespült. Einzelne Noppen wurden mit einem Skalpell abgeschnitten, weitgehend geputzt und in kleine, dünne Scheiben geschnitten.

- **Ausplattierung:**

- Einige Scheiben wurden direkt in das BAP-, FM- und QMod-Agarmedium eingestochen, sodass die Scheiben vollständig mit dem Agar bedeckt wurden. Die so inokulierten Media wurden bei 28 °C im Dunkeln über mehrere Wochen inkubiert.
- Die geputzten, dünn geschnittenen Knöllchenscheiben wurden im sterilen Keramik-Mörser mit etwas sterilem milliQ Wasser weitgehend homogenisiert und in weiteren 5 mL sterilem milliQ Wasser suspendiert. Die Suspension wurde auf QMod-, BAP- und FM-Agarmedium ausplattiert und bei 28 °C im Dunkeln über mehrere Wochen inkubiert.

Das Wachstum wurde täglich beobachtet. Einzelne schnellwachsende Bakterienkolonien wurden regelmäßig mit einem sterilen Spatel entfernt.

5.2.3 Stammhaltungsmedium für *Frankia sp.*

5.2.3.1 DPM Medium

Tabelle 5-18: Zusammensetzung des DPM-Mediums für *Frankia sp.*

Chemikalie	Konzentration [g/L]
KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01
Eisen-EDTA-Lösung	1,8 mL/L
Spurenelementlösung	1 mL/L

- **Eisen-EDTA-Lösung:**

Tabelle 5-19: Zusammensetzung der Eisen-EDTA-Lösung des DPM-Mediums.

Chemikalie	Konzentration g/L
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,54
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7,56

- **Spurenelementlösung:**

Tabelle 5-20: Zusammensetzung der Spurenelementlösung des DPM-Mediums.

Chemikalie	Konzentration g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,08
H_3BO_3	2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22

- **Kobalt-Stammlösung:**

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L

5.3 Kobalt-Nachweis

Der Kobalt-Nachweis im Medienüberstand erfolgte mittels Nanocolor[®] Kobalt von MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. Die Konzentration der Co^{2+} -Ionen erfolgt photometrisch durch die Komplexierung des Kobalts mittels 4-[5-Chlor-pyridyl-(2)-azo]-m-phenylendiamin (5-Cl-PADAB). Es wurden für den Test gebrauchsfertige Reaktionslösungen 1-3 des Test-Kits verwendet.

- **Durchführung:**

In einen 10 mL Messkolben werden 8 mL der Probelösung und jeweils 0,4 mL von den Reagenzlösungen 1-3 eingefüllt und anschließend auf 10 mL mit milliQ Wasser aufgefüllt. Für den Referenzwert werden 8 mL milliQ Wasser jeweils mit 0,4 mL Reagenzlösungen 1-3 versetzt und auf 10 mL mit milliQ Wasser aufgefüllt. Nach 5 min Reaktionszeit wird 1 mL der Probe- bzw. Referenzlösung in die 1 mL-Halbmikroküvette pipettiert, die Konzentration wird anschließend bei 540 nm photometrisch bestimmt. Der Rest der Probelösungen kann anschließend in den Ausguss mit viel Wasser entsorgt werden. In der Abbildung 5-2 ist die Kalibrationsgerade des Kobalt-Nachweistests gezeigt.

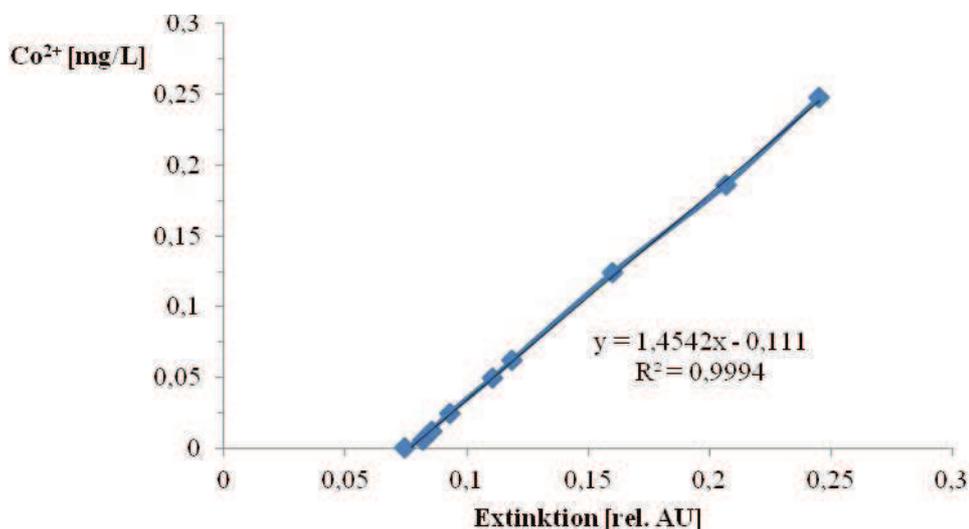


Abb. 5-2: Kalibrationsgerade des photometrischen Kobalt-Nachweistests.

5.4 Mikrobielle Vergärung

- **Milchsaure Vergärung:**

- Verwendete Mikroorganismen:

Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides (DSM 20343)

Lactobacillus plantarum subsp. plantarum (DSM 20174)

Lactobacillus brevis (DSM 20054)

Pediococcus pentosaceus (DSM 20336)

- Stammhaltungsmedium:

MRS-Medium:

Tabelle 5-21: Zusammensetzung des MRS-Mediums für milchsaure Bakterien.

Chemikalie	Konzentration g/L
Caseinpepton	10
Fleischextrakt	10
Hefeextrakt	5
Glukose	10
Tween 80	1
K ₂ HPO ₄	2
Natriumacetat	5
(NH ₄) ₂ -Citrat	2
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
MnSO ₄ · H ₂ O	0,05

pH 6,2-6,5

Die Bakterien werden jeweils unter mikroaerophilen Bedingungen bei 30 °C im Stehen 48 h kultiviert.

- **Vergärung mit *Bacillus megaterium*:**

- Verwendetes Mikroorganismus:

Bacillus megaterium (DSM 319)

- Stammhaltungsmedium:

Nutrient Agar

Tabelle 5-22: Zusammensetzung des Nutrient Agar für das *B. megaterium*.

Chemikalie	Konzentration [g/L]
Pepton	5
Fleischextrakt	3
Agar	15
MnSO ₄ H ₂ O	10 mg/L

Für das Flüssigmedium wird auf den Zusatz von Agar verzichtet. *B. megaterium* wird zunächst auf dem Nutrient Agarmedium ausplattiert und bei 30 °C 24 h inkubiert. Anschließend in das flüssige Nutrient-Medium überführt und bei 30 °C und 300 rpm inkubiert.

Für die Vergärung von pflanzlichen Feststoffen werden sowohl Milchsäurekulturen als auch *B. megaterium* 15 min. bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert und mehrere Male mit steriler Saline-Lösung gewaschen.

5.4.1 Vergärung von *Spirulina* mit *B. megaterium*

Vorbereitung der Vorkultur von *B. megaterium*

Wie im Abschnitt 5.4 wird ein Abstrich der Agar-Kultur des *B. megaterium* in einen 150 mL-Erlenmeyerkolben mit 50 mL flüssigen Nutrient-Medium überführt und bei 30 °C und 200 rpm, 24 h inkubiert. Die *B. megaterium*-Kultur wird anschließend 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert und dreimal mit jeweils 10 mL steriler Saline gewaschen.

Vorbereitung der *Spirulina*-Suspension und Inokulation

1 g *Spirulina* in einem sterilen Erlenmeyerkolben in 100 mL steriler wässriger Kochsalz-Glukoselösung (je 2 % m/v NaCl und Glukose) suspendieren. Die Suspension anschließend mit 5 mL einer in 40 mL steriler Saline aufgenommenen *B. megaterium*-Kultur animpfen. Anschließend eine Woche bei 30 °C und 130 rpm inkubieren.

5.5 Metabolismus von *Frankia* sp.

- Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus der *Frankia*:

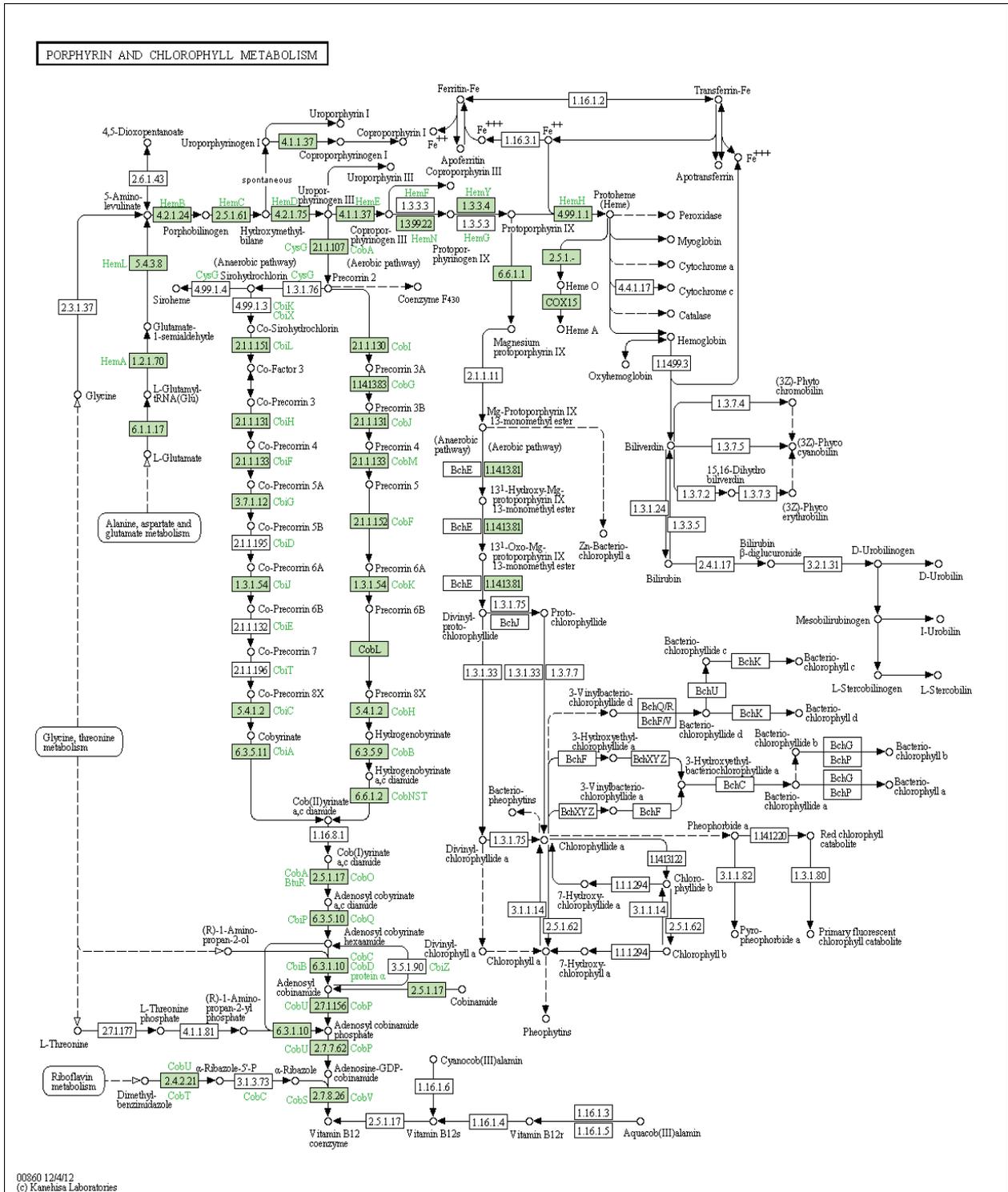


Abbildung 5-3: Porphyrin- und Chlorophyll-Metabolismus [119] der *Frankia*.

• Pyruvat-Metabolismus der *Frankia*:

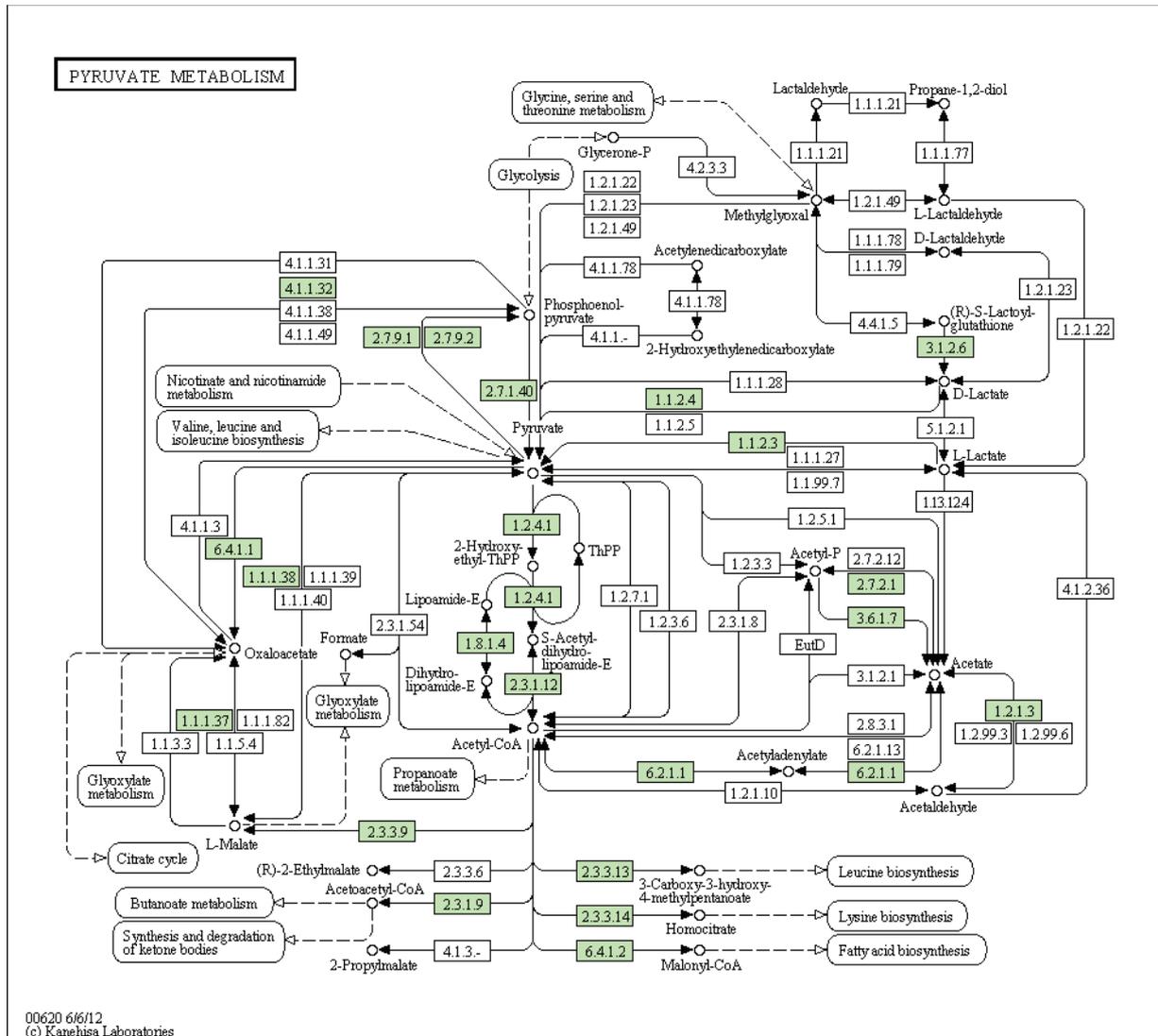


Abbildung 5-4: Pyruvat-Metabolismus^[115] der *Frankia*.

5.6 Geräte

- **HPLC**

Merck LaChrom HPLC System,
Merck Hitachi, Tokyo

Pumpe L-7100

Autosampler L-7200

Säulenoffen L-7350

Steuerung, Interface D-7000

Detektor Diode Array Detector (DAD) L-7455

Degaser Gilson 864

- **Zentrifuge**

Tischzentrifuge Eppendorf 4515 C Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf Deutschland

Multifuge Heraeus Fresco 17 Thermo Fisher Scientific Inc.

- **Autoklav**

Systec V-150 Systec GmbH, Labor-Systemtechnik, Wettenberg Deutschland

- **Homogenisierer**

Ultraschallsonde Labsonic M Sartorius AG, Goettingen Deutschland

Ultra-Turrax T25 basic IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Deutschland

- **Vakuumbrücke für SPE und IAC-SPE**

Supelco Visiprep DL Sigma-Aldrich Co. LLC

- **Gefriertrockner**

GAMMA 1-16 LSC plus Martin Christ GmbH, Osterode Deutschland

- **Thermomixer**

Eppendorf 5437 Eppendorf AG, Hamburg Deutschland

- **Waage**

Analysenwaage Extend Sartorius Weighing Technology GmbH,
Göttingen Deutschland

- **Vortex**

Vortex-Mixer Gemmy Industrial Corporation, Taiwan und
Heidolph, Schwabach Deutschland

- **Inkubatorschrank**

Certomat HK B. Braun Biotech International

Memmert Memmert GmbH & Co. KG,
Schwabach Deutschland

Ohne Bezeichnung Ifors AG, Basel, Schweiz

- **pH-Meter**

pH-Meter 766 Knick Elektronisch Messgeräte GmbH & Co.
KG, Berlin Deutschland

- **Photometer**

Uvicon 922 Kontron Instruments

Multiscan Spectrum Thermo Electron GmbH, Dreieich Deutschland
Thermo Labsystems

Microplate Reader Benchmark Bio-Rad Laboratories GmbH, München Deutschland

- **Rührer**

Rührer RCT Ikamag IKA-Werke GmbH & Co. KG,
Staufen Deutschland

- **Cleanbench**

HERASafe Thermo Fisher Scientific Instruments GmbH

- **Ultraschallbad**

Sonorex RK 510 H Bandelin Electronic, Berlin Deutschland

- **Eismaschine**

Ohne Bezeichnung Ziegra Eismaschinen GmbH,
Isernhagen Deutschland

- **Drehschieberpumpe**

Ohne Bezeichnung Vacuumbrand GmbH & Co. KG,
Wertheim Deutschland

- **Glukose-/Laktatbestimmung**

YSI 2700 SELECT Analyzer YSI Incorporated, USA

- **Mikroskop**

Olympus BX 41 Olympus Corporation, Tokyo

5.7 Materialien

Zählkammer Neubauer Brand GmbH & Co. KG, Wertheim Deutschland

Pipetten Eppendorf AG, Hamburg Deutschland

- **HPLC-Säulen** Phenomenex Inc., Aschaffenburg Deutschland

Kinetex (Phenomenex), 2,6 μ C18 100 Å, 100 x 4,60 mm

C18 (Phenomenex) Gemini-NX, 5 μ m, 110 Å, 250 x 4,6 mm

- **Vitamin B₁₂-Nachweis nach ELISA**

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B₁₂ in

Nahrungsmitteln Immunolab GmbH, Kassel Deutschland

- **IAC-SPE zum Vitamin B₁₂-Nachweis**

EASI-EXTRACT Vitamin B₁₂ R-Biopharm, Darmstadt Deutschland

- **SPE-Kartusche**

Strata C18-E (Phenomenex) 500 mg/6 mL Phenomenex Inc., Aschaffenburg
Deutschland

- **Kobalt-Nachweis**

Nanocolor® Kobalt MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG,
Dueren Deutschland

- **Einmalspritzen**

5 mL und 10 mL Omnifix-Spritzen B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Deutschland

- **Kanülen**

Sterican 100 B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Deutschland

Halbmikroküvette Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland

- **Zentrifugenröhrchen**

15 mL und 50 mL Corning B. V. Life Sciences, Amsterdam,
Niederlande

- **Reagiergefäße**

1 mL und 2 mL Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland

- **Sterilfilter**

0,2 µm Minisart High Flow Sartorius Stedim Biotech

Pipettenspitzen Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland

- **Anaerobe Kultivierung**

Injektionsflasche 50 mL Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden
Deutschland

Butylsepten N20 Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden
Deutschland

Alu-Bördelkappen Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden
Deutschland

Crimpzange Ochs Laborfachhandel e.K., Bovenden
Deutschland

Dispensette 100 mL B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Deutschland

• **Mikroaerophile Kultivierung und MBA**

20 mL Glas-Kulturröhrchen mit Schraubkappen VWR International

5.8 Chemikalien

4-Aminobenzoesäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
5-10% Natriumhypochlorit (SODOSIL RA 16)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Acetonitril	Roth GmbH, Karlsruhe Deutschland
Agar	BD Biosciences, Heidelberg Deutschland
Ammoniumacetat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Ascorbinsäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Biotin	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Borsäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Calciumchlorid-Dihydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Caseinpepton	Biotechnica International SA DE CV
Chinasäure	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Citronensäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Cyanocobalamin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Cycloheximid (Actidion)	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
D-Ca-Pantothenat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Dimethylsulfoxid	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Eisen-Citrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Eisensulfat-Heptahydrat	Merck KgaA, Darmstadt Deutschland
Eisentrichlorid-Hexahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Essigsäure	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe Deutschland
Fleischextrakt	Biotechnica International SA DE CV
Folsäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Glukose	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Hefe-Extrakt	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Isopropanol	Roth GmbH, Karlsruhe Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Kaliumcyanid	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Kalziumcarbonat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Kobaltsulfat-Heptahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Kupfersulfat-Pentahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
L-Cystein-HCl	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Liponsäure	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
L- α -Lecithin	Merck KgaA, Darmstadt Deutschland

Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Manganchlorid-Tetrahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Mangansulfat-Monohydrat	Merck KgaA, Darmstadt Deutschland
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe Deutschland
Natriumedetat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Nalidixinsäure	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Natriumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Natriumcitrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Natriumhydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt Deutschland
Natriumhydroxid	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Natriummolybdat-Dihydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Natriumpyruvat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Natriumsulfid-Nonahydrat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Nicotinsäure	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Quercetin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Resazurin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Riboflavin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Salzsäure	Riedel-de-Haën, Seelze Deutschland
Thiamin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Trifluoressigsäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Tween 80	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Vitamin B ₁₂ Assay Medium	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz
Vitamin B ₆	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland
Zinksulfat-Heptahydrat	Fluka Chemie GmbH, Buchs Schweiz

6 Literaturverzeichnis

- [1] Messina V., Mangels R., Messina M., The Dietitians Guide to Vegetarian Diets: Issues and Applications, 2. Ed., Jones and Bartlett Publications **2004**, Sudbury MA, 170-172.
- [2] Callender ST, Spray GH, Latent pernicious anemia, Br. J. Haematol. **1962**, 8 (3), 230-240.
- [3] Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Ciba-Geigy AG, Basel, 8. Aufl., Band 1, **1977**, 250-255.
- [4] Becker E. W., Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, **1994**, 190.
- [5] Ternes W., Lebensmittellexikon, Band 2, 3. Aufl., **1993**, 796.
- [6] Jakubke H.-D., Jeschkeit H., Lexikon Biochemie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, **1976**, 581.
- [7] Lago B.D., Demain A.L., Alternate requirement for vitamin B₁₂ or methionine in mutants of *Pseudomonas denitrificans*, a vitamin B₁₂-producing bacterium, J.Bacteriol. **1969**, 99/1, 347-349.
- [8] Toraya T., Yongsmith B., Tanaka A., Fukui S., Vitamin B₁₂ production by a methanol-utilizing bacterium, Appl. Microb. **1975**, 30/3., 477-479.
- [9] Roman R.V., Iluc E., Mustea A., Neacsu A., Asandului V., Optimization of medium components in vitamin B₁₂ biosynthesis, Roum. Biotechnol. Lett. **2001**, 6, 343-350.
- [10] Martins J.H., Barg H., Warren M.J., Jahn D., Microbial production of vitamin B₁₂, Appl. Microbiol. Biotechnol. **2002**, 58, 275-285.
- [11] Li K.-T., Liu D.-H., Li Y.-L., Chu J., Wang Y.-H., Zhuang Y.-P., Zhang S.-L., Improved large-scale production of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding, Biores. Technol. **2008**, 99, 8516-8520.

- [12] Herbert V., Drivas G., Manusselis C., Mackler B., Eng J., Schwartz E., Are colon bacteria a major source of cobalamin analogues in human tissues? 24-hour human stool contains only about 5 µg of cobalamin but about 100 µg of apparent analogue (and 200 µg of folate). *Trans. Assoc. Am. Phys.* **1984**, 97, 161-171.
- [13] a) Woodward R.B., *Pure Appl. Chem.* **1968**, 17, 519; b) **1971**, 25, 283; c) **1973**, 33, [45]; d) Eschenmoser A., *Pure Appl. Chem.* **1963**, 7, 297; e) **1969**, 20, 1; f) Eschenmoser A., et. al.: *Proc. Roy. Soc. A* **1965**, 288, 306; g) Eschenmoser A.: *Chem. Soc. Rev. (London)* **1976**, 5, 377; h) Eschenmoser A.: *Naturwissenschaften* **1974**, 61, 513.
- [14] Falbe J., Regitz, M., (Hrsg.), *Römpp-Lexikon Chemie*, 10. Aufl., Georg Thieme Verlag, **1999**, Stuttgart.
- [15] Barg H., Gezielte gentechnische Optimierung von *Bacillus megaterium* für die Vitamin B₁₂ Produktion. Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo Wilhelmina zu Braunschweig, Dissertation **2003**.
- [16] Patent: Bijl H.L., DE69717207T2, DSM N.V. Heerlen, Niederlande **2003**, Mikrobielle Herstellung von Vitamin B₁₂ sowie Herstellung und Verwendung von Zusammensetzungen, die Vitamin B₁₂ in hohen Konzentrationen enthalten.
- [17] Patent: Barg H., Jahn D., Künkel A., DE10150359A1, BASF AG, Ludwigshafen **2003**, Verfahren zur Herstellung von Vitamin B₁₂.
- [18] Spalla C., Grein A., Garofano L., Ferni G., Microbial production of Vitamin B₁₂, In "Biotechnology of Vitamins Pigments and Growth Factors", Ed.: Vandamme E.J., Elsevier, London, New York **1989**, 257-284.
- [19] Hegnauer R., *Chemotaxonomie der Pflanzen: Band 4: Dicotyledoneae: Daphniphyllaceae-Lythraceae*, Birkhäuser Verlag, Basel **1966**, 54-60.
- [20] Beveridge T., Li T.S.C., Oomah B.D., Smith A., Sea buckthorn products: Manufacture and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 3480-3488.

- [21] Negi P.S., Chauhan A.S., Sadia G.A., Rohinishree Y.S., Ramteke R.S., Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. Food Chemistry **2005**, 92, 119-124.
- [22] Mörsel J.-T., Sanddorn, Moderne Anbautechnologien, Books on demand GmbH, Nordstedt **2009**, 11-22.
- [23] Lu R., Sea buckthorn: A multipurpose plant species for fragile mountains. Intl. Center for Intergrated Mountain Development, Katmandu, Nepal, **1992**.
- [24] Li T.S.C., Schroeder W.R., Review: Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A multipurpose plant, Hort Technology *1996*, 6 (4), 370-380.
- [25] Pott R., Die Pflanzengesellschaften Deutschlands, 2.Aufl., Eugen Ulmer Verlag, **1995**, 486 ff.
- [26] Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie, Sanddorn im Erwerbsanbau Stand 18.04.2005,

URL: <http://www.smul.sachsen.de/de/wu/Landwirtschaft/lfl/inhalt/2814.htm>

(Stand vom 13.3.2010).
- [27] Облепиха, биологические особенности облепихи (Sanddorn, Biologische Eigenschaften des Sanddorns),

URL: <http://seaberry.ru/biologicheskie-osobennosti-oblepixi/>

(Stand vom 13.3.2010).
- [28] Beveridge T., Harrison J.E., Drover J., Processing Effects on the Composition of Sea Buckthorn Juice from *Hippophae rhamnoides* L. Cv. Indian Summer, J. Agric. Food Chem. **2002**, 50, 113-116.
- [29] Rousi A., Aulin H., Ascorbic acid and content in relation to ripeness in fruit of six *Hippophae rhamnoides* clones from Pyharanta, SW Finland. Ann. Agr. Fenn. **1977**, 16, 80-87.

- [30] Yao Y., Tigerstedt P.M.A., Joy P., Variation of Vitamin C concentration and character correlation between and within natural sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) populations. Acta. Agr. Scand. **1992**, 42, 12-17.
- [31] Yao Y., Tigerstedt P.M.A., Genetic diversity in *Hippophae L.* and its use in plant breeding. Euphytica **1994**, 77, 165-169.
- [32] Patent: Bock W., Felkenheuer W., Dongowski G., Kroll J., Schweider C., Baars H., Sievert B., GDR Patent 275 775 A3, **1990**, Method for enhancing processing of raw juice from sea buckthorn berries.
- [33] Patent: Pandalis G., EP 0799237, **1996**, Vitamin B₁₂-containing sallow thorn concentrates or extracts.
- [34] Gimmler G., Wähling A., Abschlussbericht zur Studie: Integrierter Umweltschutz in der Ernährungsindustrie am Beispiel der nachhaltigen Produktion und Verwertung von Sanddornfrüchten in China, NIG Nahrungs-Ingenieurtechnik GmbH, Marburg **2001**.
- [35] Garanovich I.M., Introduction and selection of *Hippophae* in Belarus. In: Proc. Intl. Sea Buckthorn. Dec. **1995**, Beijing, China.
- [36] Montpetit D., Lalonde M., In vitro propagation and subsequent nodulation of the actinorhizal *Hippophae rhamnoides L.*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Netherlands) **1988**, 15, 189-200.
- [37] Tjepkema J.D., Schwintzer C.R., Benson D.R., Physiology of actinorhizal nodules. Annu. Rev. Plant Physiol. **1986**, 37, 209-232.
- [38] Schwitzer C.R., Tjepkema J.D., The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Academic Press, Inc. **1990**, San Diego, California, 1-13.
- [39] Benson, D.R., Clawson M.L., Evolution of the actinorhizal plant symbioses; In "Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for analysis of biological process", Ed.: Triplett EW., Horizon Scientific Press **2000**, Wymondham, UK, 207-224.

- [40] Benson D.R., Frankia Biology; Nodule Ultrastructure, In “Frankia & Actinorhizal Plants”,
URL: <http://web.uconn.edu/mcbstaff/benson/Frankia/Structure.htm>
(Stand vom 11.11.2012).
- [41] Benson D.R., Frankia Biology; Nodules, In “Frankia & Actinorhizal Plants”,
URL: <http://web.uconn.edu/mcbstaff/benson/Frankia/StructureNod.htm>
(Stand vom 11.11.2012).
- [42] Meyen J., Über das Hervorwachsen parasitischer Gebilde aus den Wurzeln anderer Pflanzen. Flora (Jena) **1929**, 12, 49-64.
- [43] Woronin M., Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und bei der gewöhnlichen Gartenlupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelanschwellungen. Mem. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg **1866**, Ser. 7, T. 10(6), 1-13.
- [44] Brunchorst J., Die Struktur der Inhaltkörper in den Zellen einiger Wurzelanschwellungen. Bergens Mus. Aarsb. **1887**, 235.
- [45] Hiltner L., Über die Bedeutung der Wurzelknöllchen von *Alnus glutinosa* für die Stickstoffernährung dieser Pflanze. Landwirtsch. Vers.-Stn. **1895**, 46, 153-161.
- [46] Becking J.H., DeBoer W.E., Houwink A.L., Electron microscopy of the endophyte of *Alnus glutinosa*. Antonie Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. **1964**, 30, 343-376.
- [47] Callaham D., DelTredici P., Torrey J.G., Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. Science **1978**, 199, 899-902.
- [48] Lalonde M., Confirmation of the infectivity of a free-living actinomycete isolated from *Comptonia peregrina* root nodules by immunological and ultrastructural studies. Can. J. Bot. **1978**, 56, 2621-2635.

- [49] Normand P., Fernandez M.P., Evolution And Diversity Of *Frankia*; In “Prokaryotic Symbionts in Plants” Ed.: Pawlowski K., Springer-Verlag Heidelberg **2009**, 103-125.
- [50] Schwintzer C.R., Spore-positive and spore-negative nodules; In The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants, Ed.: Schwintzer C.R., Tjepkema J.D., Academic Press, Inc. **1990** San Diego, California, 177-193.
- [51] Hardy R.W.F., Burns R.L., Biological Nitrogen Fixation, Anna. Rev. Biochem. **1968**, 37, 331-358.
- [52] Bothe H., Schmitz O., Geoffrey Yates M., Newton W.E., Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **2010**, 74 (4), 529-551.
- [53] Howard J.B., Douglas C.R., Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation, Chem. Rev. **1996**, 96, 1965-1982.
- [54] Simpson F.B., Burris R.H., A Nitrogen Pressure of 50 Atmospheres Does Not Prevent Evolution of Hydrogen by Nitrogenase, Science **1984**, 224, 1095-1097.
- [55] Bishop P.E., Premakumar R., Alternative Nitrogen Fixation Systems. In “Biological Nitrogen Fixation”. Ed.: Stacey G., Burris R.H., Evans D.J., Chapman and Hall Inc. **1992**, New York, 736-762.
- [56] Wilson S.B., Hallsworth E.G., The Distribution of Cobalt on *T. Subterraneum*, Plant & Soil **1965**, 23, 60.
- [57] Gustafson F.G., Absorption of ⁶⁰Co by Leaves of Young Plants and Its Translocation Through the Plant, Am. J. Bot. **1956**, 43, p. 157.
- [58] Lowe R.J., Evans H.J., Ahmed S., The Effect of Cobalt on the Growth of *Rhizobium Japonicum*, Biochem. Biophys. Res. Comm. **1960**, 3, 675.
- [59] Lowe R.J., Evans H.J., Cobalt Requirement for the Growth of *Rhizobia*, J. Bacteriol. **1962**, 83, 210.

- [60] Cowles J.R., Evans H.J., Russell S., B₁₂ Coenzyme-Dependent Ribonucleotide Reductase in *Rhizobium* Species and the Effect of Cobalt Deficiency on the Activity of the Enzyme, *J. Bacteriol.* **1969**, 97, 1460.
- [61] De Hertogh A.A., Mayeux P.A., Evans H.J., The Relationship of Cobalt Requirements to Propionate Metabolism in *Rhizobium*, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2446.
- [62] Jackson E.K., Evans H.J., Propionate in Heme Biosynthesis in Soybean Nodules, *Plant Physiol.* **1966**, 41, 1673.
- [63] Cutting J.A., Schulman H.M., The site of Heme Synthesis in Soybean Nodules, *Biochemica et Biophysica Acta* **1969**, 192, 486.
- [64] Godfrey C.A., Dilworth M.J., Haem Biosynthesis from (¹⁴C)- δ -Amino Laevulinic Acid in Laboratory-Grown and Root Nodule *Rhizobium Lupini*, *J. Gen. Microbiol.* **1971**, 69, 385.
- [65] Nadler K.D., Avissar Y. J., Heme Synthesis in Soybean Root Nodules. I. On the Role of the Bacteroids δ -Aminolevulinic Acid Synthetase and δ -Aminolevulinic Acid Dehydrase in the Synthesis of the Heme of Leghaemoglobin. *Plant Physiol.* **1977**, 60, 433.
- [66] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., *Biochemistry*. 6th Ed. Freeman **2007**, New York.
- [67] Ahmed S., Evans H.J., The Essentiality of Cobalt for Soybean Plants Grown Under Symbiotic Conditions, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1961**, U.S.A., 47, 24.
- [68] Kliewer M., Evans H.J., B₁₂ Coenzyme Content on the Nodules from legumes, Alder and of *Rhizobium Meliloti*, *Nature* **1962** 194, 108.
- [69] Kliewer M., Evans H.J., Effect of Cobalt Deficiency on the B₁₂ Coenzyme Content of *Rhizobium Meliloti*, *Arch. Biochem.& Biophys.* **1962** , 97, 427.
- [70] Gladstones J.S., Loneragan J.F., Goodchild N.A., Field Responses to Cobalt and Molybdenum by Different Legume Species, With Inferences on the Role of Cobalt in Legume Growth, *Austr. J. Agric. Res.* **1977**, 28, 619.

- [71] Cowles J.R., Evans H.J., Some Properties of the Ribonucleotide Reductase from *Rhizobium Meliloti*, Arch. Biochem. & Biophys. **1968**, 127, 770.
- [72] Sato K., Inukai S., Shimizu S., Vitamin B₁₂-Dependent Methionine Synthesis in *Rhizobium Meliloti*, Biochem. Biophys. Res. Com. **1974**, 60, 723.
- [73] Inukai S., Sato K., Shimizu S., The Relationship of Cobalt Requirement to Vitamin B₁₂-Dependent Methionine Synthesis in *Rhizobium Meliloti*. Agric. Biol. Chem. **1977**, 41, 2229.
- [74] Dilworth M.J., Robson A.D., Chatel D.L., Cobalt and Nitrogen Fixation in *Lupinus Angustifolius L.* II. Nodule Formation and Function, New Phytol. **1979**, 83, 63.
- [75] Patent: G. Pandalis, EP 0799237, **1996**, Vitamin B₁₂-containing sawtooth thorn concentrates or extracts.
- [76] Dr. Pandalis Naturprodukte, Sanddornprodukte z.Zt. nicht lieferbar – Stellungnahme,

URL: <http://www.pandalis.de/de/startseite/sanddornprodukte-z-zt-nicht-lieferbar-stellungnahme/> (Stand vom 28.11.2012).
- [77] Minot G.R., Murphy W.P., Treatment of pernicious anaemia by a special diet, JAMA **1926**, 87, 470-476.
- [78] Rickes E.L., Brink N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R., Folkers K., Crystalline Vitamin B₁₂. Science **1948**, 107, 396–397.
- [79] Smith E.L., Parker L.F.J. Purification of Anti-Pernicious Anemia Factor, Biochem. J. **1948**, 43, viii.
- [80] Ross G.I.M. Vitamin B₁₂ Assay in Body Fluids, Nature **1950**, 166, 270.
- [81] Ross G.I.M. Vitamin B₁₂ Assay in Body Fluids Using *Euglena gracilis*, J. clin. Path. **1952**, 5, 250.
- [82] Collins R.A., Harper A.E., Schreiber M., Elvehjem C.A., The folic acid and vitamin B₁₂ content of the milk of various species, J. Nutr. **1951**, 43, 313-321.

- [83] Sreenivasamurthy V., Nambudripad V.K.N., Iya K.K., Studies on Vitamin B₁₂ Activity of Milk, Indian J. Dairy Res. **1950**, 3, 179-187.
- [84] Ford J.E., The microbiological assay of vitamin B₁₂; the specificity of the requirement of *Ochromonas malhamensis* for cyanocobalamin, Brit. J. Nutr. **1953**, 7, 299-306.
- [85] Gregory M.E., The Microbiological Assay of "Vitamin B₁₂" in the Milk of Different Animal Species, British J. Nutr. **1954**, 8, 340-347.
- [86] AOAC Official Method 952.20 Cobalamin (Vitamin B₁₂ Activity) in Vitamin Preparations, Microbiological Methods, First Action **1952**, Last Action **1960**.
- [87] AOAC Official Method 960.46, Vitamin Assays, Microbiological Methods, First Action **1960** Final Action.
- [88] Ford J.E., Differentiation of vitamin B₁₂ active compounds by ionophoresis and microbiological assay; microbiological tests, Nature **1953**, 171, 149-150.
- [89] Shive W., Ravel J.M., Harding W.M., An interrelationship of purines and vitamin B₁₂, J. Biol. Chem. **1948**, 176, 991.
- [90] Lindenbaum J., Status of Laboratory Testing in the Diagnosis of Megaloblastic Anemia, Blood **1983**, 61, 624.
- [91] Gimsing P., Beck W.S., Cobalamin analogues in plasma. An in vitro phenomenon? J Clin Lab Invest **1989**, 49 (194), 37-40.
- [92] Watanabe F., Nakano Y., Stupperich E., Ushikoshi K., Ushikoshi S., Ushikoshi I., Kitaoka S., A radioisotope dilution method for quantitation of total vitamin B₁₂ in biological samples using isolated *Euglena pellicle* fragments as a solid-phase vitamin B₁₂-binding material, Anal Chem **1993**, 65, 657-659.
- [93] Ed.: Attaway D.H., Zaborsky O.R., Marine Biotechnology and Bioactive Natural Products, Band 1, Plenum Press, New York **1993**, 156.
- [94] Reichert N., Rubach K., Bestimmung von Vitamin B₁₂ in vitaminisierten Lebensmitteln mittels eines kompetitiven Protein-Bindungsassay (CPBA) und

- eines ELISA (Ezyme-Linked Immunosorbent Assay), Deutsche Lebensmittel-Rundschau **1990**, 86 Jahrg., 10, 307-310.
- [95] Albala-Hurtado S., Veciana-Nogues M.T, Izquierdo-Pulido M., Marine- Font A., Determination of Water-Soluble Vitamins in Infant Milk by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* **1997**, 778, 247-253.
- [96] Moren P., Salvadó V., Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2000**, 870 (1-2), 207-215.
- [97] Wongyai S, Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets by multimode high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **2000**, 870 (1-2), 217-220.
- [98] Kozhanova L.A., Fedorova G.A., Baram G.I., Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Multivitamin Preparations by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Anal. Chem.* **2002**, 57 (1), 40-45.
- [99] Viñas P., López-Erroz C., Balsalobre N., Hernández-Córdoba M., Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods, *J. Chromatogr. A* **2003**, 1007 (1-2), 77-84.
- [100] Klejdus B., Petrlová J., Potěšil D., Adam V., Mikelová R., Vacek J., Kizek R., Kubáň V., Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 520, 57-67.
- [101] Li H.B., Chen F., Jiang Y., Determination of Vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* **2000**, 891, 2, 243-247.
- [102] Pakin C., Bergaentzlé M., Aoudé-Werner D., Hasselmann C., α -Ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B₁₂ in foodstuffs, *J. Chromatogr. A* **2005**, 10881 (2), 182-189.

- [103] Viñas .P, Campillo N., López García I., Hernández Córdoba M., Speciation of vitamin B₁₂ analogues by liquid chromatography with flame atomic absorption spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* **1996**, 318,3, 319-325.
- [104] Morita M., Uehiro T., Fuwa K., Speciation and elemental analysis of mixtures by high performance liquid chromatography with inductively coupled argon plasma emission spectrometric detection, *Anal. Chem.* **1980**, 52 (2), 349-351.
- [105] Baker S.A., Miller-Ihli N.J., Determination of cobalamins using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta Part B* **2000**, 55 (12), 1823-1832.
- [106] Chassaigne H., Łobiński R., Determination of Cobalamins and Cobinamides by Microbore Reversed-Phase HPLC with Spectrophotometric, Ion-Spray Ionization MS and Inductively coupled Plasma MS Detection, *Anal. Chim. Acta* **1998**, 359, 227-235.
- [107] Chatzimichalakis P.F., Samanidou V.F., Verpoorte R., Papadoyannis I.N., Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction, *J. Sep. Science* **2004**, 27 (14), 1181-1188.
- [108] Iwase H., Ono I., Determination of cyanocobalamin in foods by high-performance liquid chromatography with visible detection after solid-phase extraction and membrane filtration for the precolumn separation of lipophilic species, *J. Chromatogr. A* **1997**, 771 (1-2), 127-134.
- [109] Okbamichael M., Sanudo-Wilhelmy S.A., A new method for the determination of vitamin B₁₂ in seawater, *Anal. Chim. Acta* **2004**, 517, 33-38.
- [110] Baker D., O'Keefe D., A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples, *Plant and Soil* **1998**, 78, 23-28.
- [111] Lechavalier M.P., Lechevalier H.A., Systematics, isolation, and culture of *Frankia*, In "The biology of *Frankia* and actinorhizal plants", Ed.: Schwintzer C., Tjepkema J., Academic Press, Inc., San Diego (CA) USA **1990**, 35-60.

- [112] Carú M., Becerra A., Sepulveda D., Cabello A., Isolation of infective and effective *Frankia* strains from root nodules of *Alnus acuminata*, World J. Microbiol. & Biotech. **2000**, 16, 647-651.
- [113] Benson D.R., Isolation of *Frankia* strains from alder actinorhizal root nodules, Appl. & Environ. Microbiol. **1982**, 44 (2), 461-465.
- [114] Lalonde M., Calvert H.E., Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculants for *Alnus* species. In "Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests", Ed.: Gordon J.C., Wheeler C.T., Perry D.A., Oregon State University Corvallis **1979**, 95-110.
- [115] KEGG PATHWAY Database, Kyoto University Bioinformatics Center,
URL: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?fra00620
(Stand vom 25.12.12).
- [116] Lopez M.F., Torrey J.G., Enzymes of glucose metabolism in *Frankia sp.*, J. Bacteriol. **1985**, 162, 110-116.
- [117] Blom J., Harkink R., Metabolic pathways for gluconeogenesis and energy generation in *Frankia AvcII*, FEMS Microbiol. Lett. **1981**, 11, 221-224.
- [118] Quispel A., Svendsen A.B., Schripsema J., Baas W.J., Erkelens C., Lugtenburg J., Identification of dipterocarpol as isolation factor for the induction of primary isolation of *Frankia* from root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. Mol. Plant-Microbe Interact. **1989**, 2, 107-112.
- [119] KEGG PATHWAY Database, Kyoto University Bioinformatics Center
URL: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?fra00860
(Stand vom 25.12.12).
- [120] Watanabe F., Abe K., Fujita T., Goto M., Hiemori M., Nakano Y., Effects of microwave on the loss of vitamin B₁₂ in foods, J. Agric. Food Chem. **1998**, 46, 206-210.

- [121] Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Björk L., Trajkovski V., Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) during maturation, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (5), 1485-1490.
- [122] Raffo A., Paoletti F., Antonelli M., Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) cultivars, *European Food Research and Technology* **2004**, 219 (4), 360-368.
- [123] Skrede G., Wrolstadt R.E., Flavonoids from berries and grapes, In “Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects” Ed.: Shi J., Mazza G., Le Magner M., 2. Edition, CRC Press LLC, Florida **2002**, 83.
- [124] Lõugas T., Study on physico-chemical properties and some bioactive compounds of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*), Dissertation, Tallinn University of Technology, **2006**.
- [125] Smith K.A., Paterson J.E., Mangan und Cobalt. In „Schwermetalle in Böden“, Alloway B.J. (Hrsg.), Springer, Berlin-Heidelberg **1999**, 241-263.
- [126] Stemme K., Untersuchungen zur Kobalt-Versorgung von Milchkühen, Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, **2002**.
- [127] Hutkins R.W., Microbiology and Technology of Fermented Foods, Blackwell Publishing Ltd, Oxford **2006**, 236.

Lebenslauf

Geboren am 01. Juni 1982 in Kiew, Ukraine
Kinder: Renata Maria Kysil, geboren am 07. März 2006 in Hannover

Schulbesuch

seit 09/1989-06/1995 Besuch der Mittelschule in Kiew
seit 08/1995-07/1999 Besuch der Werner von Siemens-Schule in Hannover
07/1999 Erwerb des Erweiterten Realschulabschlusses
seit 08/1999-06/2002 Besuch des Käthe-Kollwitz-Gymnasiums in Hannover
06/2002 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium

seit 09/2002-04/2009 Chemie-Studium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
11/2005 Diplomvorprüfung mit der Gesamtnote 1,7
seit 09/2008-03/2009 Erstellung der Diplomarbeit im Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
Thema: „Grundlegende Untersuchungen zur Biotransformation der Flavonoide“, Gesamtnote 1,7
05/2009 Diplomerwerb zur Diplom-Chemikerin an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 6/2009-12/2009 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Technische Chemie Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
seit 01/2010-12/2011 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Teutopharma GmbH, Glandorf und externe Doktorandin im Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
Betreuung des Forschungsprojektes “Untersuchung der Synthese pflanzlicher Wirkstoffe in symbiotischen Vegetationssystemen“ sowie Qualitätsbestimmung in pflanzlichen und tierischen Rohmaterialien
12/2013 Promotion mit der Dissertationsschrift
„Grundlegende Untersuchungen zur mikrobiellen Synthese von Vitamin B₁₂ in symbiotischen pflanzlichen Systemen am Beispiel der *Frankia*.
Entwicklung neuartiger pflanzlicher Extrakte mit hohem essentiellen Vitamin B₁₂-Gehalt“

Beruflicher Werdegang

Seit 09/2012 Brandschutzingenieurin bei
HDI-Gerling Sicherheitstechnik GmbH in Hannover

Sprachen: Russisch, Ukrainisch, Deutsch, Englisch