



Artikel

Gewinnung neuer Vitamin B12 -Produktionsstämme *Acetobacter malorum* HFD 3141 und *Acetobacter orientalis* HFD 3031 aus

Hausgegorener Sauerteig

Lisa Stumpf ^{1,*}, Stefan Schildbach ¹ und Aidan Coffey ²

¹ Fachbereich Lebensmitteltechnologie, Hochschule Fulda, 36037 Fulda, Deutschland; stefan.schildbach@lt.hs-fulda.de
Fachbereich Biowissenschaften,

² Technische Universität Münster, T12 P928 Cork, Irland; aidan.coffey@mtu.ie * Korrespondenz: lisa.stumpf@lt.hs-fulda.de

Zusammenfassung: Vitamin B12 ist ein wichtiger Nährstoff in veganen und vegetarischen Lebensweisen, da pflanzliche Vitaminquellen selten sind. Herkömmliche fermentierte Lebensmittel könnten durch Zugabe von Vitamin B12-produzierenden Bakterien angereichert werden, um nicht-tierische Vitaminquellen zu bieten. Ziel war es, einen Vitamin-B12 -Produzenten zu isolieren, der das für den Menschen aktive Vitamin auch bei niedrigem pH-Wert produzieren kann, damit es zur Anreicherung von Fruchtsäften verwendet werden kann. Daher wurden fermentierte Lebensmittel (hausgemacht und industriell) und Probiotika auf Vitamin- B12- produzierende Stämme untersucht. Ein modifizierter mikrobiologischer Vitamin- B12- Test auf Basis von *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355 wurde verwendet, um Vitamin- B12-haltige Proben und das Vorhandensein von Vitamin- B12-produzierenden Stämmen zu identifizieren. Das Screening führte zur Isolierung mehrerer positiver Stämme für die Vitamin- B12 - Bildung aus Sauerteig. Durch Massenspektrometrie wurde die Biosynthese ausschließlich der für den Menschen physiologisch aktiven Form bestätigt. Die von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen durchgeführte Artenidentifizierung ergab zwei Arten: *Acetobacter orientalis* und *Acetobacter malorum*, von denen zwei Isolate weiter charakterisiert wurden. Das Potenzial für Cobalaminbiosynthesen in Lebensmittelmatrizes wurde für *A. malorum* HFD 3141 und *A. orientalis* HFD 3031 in Apfelsaft bei unterschiedlichen pH-Werten (2,85–3,80) nachgewiesen. Die Isolate synthetisierten bis zu 18,89 µg/L und 7,97 µg/L Vitamin B12 bei pH 3,80. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Essigsäurebakterien (AAB) und fermentierte essigsäure Lebensmittel vielversprechende Quellen für Vitamin B12 und seine Produzenten sind, die in der Vergangenheit möglicherweise übersehen wurden.

Schlüsselwörter: Cobalamin; Pseudocobalamin; *Acetobacter*; Essigsäurebakterien; Biofortifizierung von Lebensmitteln; versteckter Hunger



Zitat: Stumpf, L.; Schildbach, S.; Coffey, A. Obtaining Novel Vitamin B12- Produktionsstämme *Acetobacter malorum* HFD 3141 und *Acetobacter orientalis* HFD 3031 von Home-Fermentierter Sauerteig. Appl. Microbiol. **2024**, *4*, 986–999. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030067>

Wissenschaftliche Lektorin: Sabina Fijan

Empfangen: 21. Mai 2024

Überarbeitet: 8. Juni 2024

Akzeptiert: 14. Juni 2024

Veröffentlicht: 23. Juni 2024



Copyright: © 2024 bei den Autoren.

Lizenznehmer MDPI, Basel, Schweiz.

Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel vertrieben unter den Bedingungen und

Bedingungen der Creative Commons

Namensnennungslizenz (CC BY)

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Einleitung

Obwohl Cobalamin (Vitamin B12) ausschließlich von bestimmten Bakterien und Archaeen produziert wird, stellen Lebensmittel tierischen Ursprungs (Fleisch, Eier und Milch) die Hauptquelle für Cobalamin in der menschlichen Ernährung dar [1]. Werden diese weggelassen, kann es schwierig sein, die empfohlene tägliche Aufnahmemenge zu erreichen. Die Deutsche Veganstudie (GVS) deckte eine erhebliche Lücke bei der Aufnahme von Vitamin B12 in der veganen und vegetarischen Gemeinschaft auf [2]. Die GVS fand heraus, dass männliche Veganer nur $0,84 \pm 1,21$ µg/Tag und weibliche Veganer $0,78 \pm 2,14$ µg/Tag Cobalamin zu sich nehmen, was unter der von der EFSA empfohlenen täglichen Aufnahmemenge von 4,0 µg liegt [3]. Daher stellt die Bereitstellung lebenswichtiger Nährstoffe über fermentierte, pflanzliche Lebensmittel einen vielversprechenden und kostengünstigen Ansatz zur Beseitigung dieser Ernährungsungleichheit dar [4].

Nicht alle Bakterien sind in der Lage, Vitamin B12 zu produzieren. Daher ist es notwendig, geeignete Stämme zu isolieren und zu identifizieren. In der Literatur identifizierte Vitamin- B12 -Produzenten gehören zur Gattung *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacterium*.

ter, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Xanthomonas* [5], *Propionibacterium* (z. B. [5,6]), *Acetobacter* [7,8] *Gluconobacter* [8] und *Lactobacillus* (z. B. [9,10]). Während *Pseudomonas denitrificans* und *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* für die industrielle Produktion im großen Maßstab verwendet werden, konzentriert sich die Forschung zur Biofortifizierung von Lebensmitteln auf Milchsäurebakterien (LAB) und Propionsäurebakterien (PAB) [11], hauptsächlich *Propionibacterium freudenreichii* [4]. LAB und *P. freudenreichii* besitzen laut der Food and Drug Administration den GRAS-Status („generally recognize as safe“), sodass ihre Anwendung verständlich ist. *P. freudenreichii*-Stämme sind prototroph für alle Aminosäuren und Nukleotide [12], was bedeutet, dass die Anforderungen an Fermentationsmedien relativ gering sind.

Der bevorzugte pH-Wert von PAB liegt zwischen 6 und 7 [13], und die Toleranz reicht bis zu pH 5,0 [14]. Wie der Name schon sagt, produziert es das scharf riechende Propionat, das für bestimmte Käsesorten charakteristisch ist [15], aber in bioangereicherten Lebensmitteln möglicherweise unerwünscht ist. LAB produzieren die weniger scharf riechende Milchsäure als wichtigstes Stoffwechselendprodukt; sie sind oft auxotroph gegenüber mehreren Aminosäuren und Vitaminen [16] und benötigen nährstoffreiche Fermentationsmedien. Das pH-Optimum ist stammabhängig und liegt zwischen 5,5 und 6,2 für Laktobazillen und zwischen 4,5 und 6,5 für die meisten Stämme der Gattung *Lactobacillus* [17].

Zur Isolierung und Identifizierung Vitamin B12-produzierender Mikroorganismen aus komplexen Matrizen oder Stammsammlungen werden unterschiedliche Ansätze verwendet, darunter Methoden, die auf der Medienzusammensetzung, dem Vorhandensein einzelner Gene oder der direkten Messung des Vitamins im Fermentationsmedium basieren. Am häufigsten wird das Wachstumspotenzial von Isolat auf Vitamin B12-freien Medien getestet, um potenzielle Produktionsstämme selektiv zu züchten. Die Hypothese ist, dass nur Bakterien auf dem Medium wachsen können, wenn sie das Vitamin produzieren können. Vitamin B12 fungiert als Coenzym in verschiedenen prokaryotischen Stoffwechselwegen, z. B. in der Cobalamin-abhängigen Methioninsynthase [18], der Glyceroldehydratase und der Ethanolamin-Ammoniak-Lyase. Da jedoch nicht alle Bakterien auf Cobalamin-abhängige Stoffwechselwege angewiesen sind und es Cobalamin-unabhängige Alternativen gibt [19], ist diese Technik nicht völlig diskriminierend gegenüber nicht-produzierenden Organismen [20]. Mit dieser Methode wurden vier *Lactobacillus*-Stämme aus Nukazuke (japanisches Pickle) [9], ein *Bacillus* sp.-Stamm aus Tua-Noa (ungesalzene fermentierte Sojabohne) [21] sowie *Lactobacillus lactis*, *Levilactobacillus brevis* und *Pediococcus pentosaceus* aus industriellen *Chlorella vulgaris*-Fermentationen [22] isoliert. Das Vorhandensein von Homologen der bluB/cobT2-Fusionsgene [23,24] oder des cbiK-Gens [20,25] wurde als Marker zur Identifizierung wahrscheinlicher Vitamin- B12- Produzenten verwendet. Diese Gene kodieren für spezifische Enzyme der Cobalaminsynthese: Die Enzyme BluB und CobT2 katalysieren die Bildung des niederen Liganden DMBI (5,6-Dimethylbenzimidazol) von Vitamin B12 sowie dessen Aktivierung und Einbau in das Cobalaminmolekül [24]. CbiK katalysiert den Einbau des Cobaltions in die Cobalaminstruktur [26]. Bhushan et al. verwendeten eine dreiphasige Screeningmethode (Vitamin- B12-freies Medium, Kobaltsupplementierung und Screening auf das cbiK-Gen), um Laktobazillen aus menschlichen Proben (Muttermilch und Stuhl) zu isolieren [20]. Das Screening führte zu zwei *Lactiplantibacillus plantarum*-Stämmen.

Obwohl die Isolierung erfolgreich war, schlussfolgerten die Autoren, dass die ersten beiden Schritte – oder Laktobazillen – selektiver sein müssen und nur nach dem cbiK-Gen gesucht werden muss, um vielversprechende Stämme zu identifizieren. Kumari et al. folgten der beabsichtigten einphasigen Identifizierung durch das cbiK-Gen und identifizierten drei Vitamin B12-produzierende Stämme (*Limosilactobacillus reuteri* F2, *Lactiplantibacillus plantarum* V7 und *Lactocaseibacillus rhamnosus* F5), die aus Stuhlproben von Säuglingen isoliert wurden [25]. Hugenschmidt et al. überprüften PAB- und LAB-Stämme, indem sie den Cobalamingehalt des Kulturmediums direkt mittels HPLC maßen, ohne die mit den oben genannten Methoden getesteten Stämme einzuschränken [6].

Nach der Identifizierung der wahrscheinlichen Vitamin- B12- Produzenten wird deren Vitamin- B12-Bildungskapazität typischerweise durch eine mikrobiologische Bestimmung mit *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 (=L. *delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355) [10,21,22] oder chromatographische Methoden (Flüssigkeitschromatographie -Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) [23] und ultraschnelle Flüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektor (UFLC-DAD) [20]) überprüft. Die mikrobiologische Vitamin- B12 -Bestimmung basiert auf diesem Vitamin- B12- auxotrophen Indikatorstamm, der mit einem definierten Probenvolumen in einem Vitamin- B12-freien Bestimmungsmedium inkubiert wird. Das Wachstum des Indi

Der Stamm, bestimmt durch die optische Dichte (OD), ist ein Maß für die vorhandene Konzentration von Vitamin B12. In ernährungsphysiologischer Hinsicht ist es wichtig, die Möglichkeit zu berücksichtigen, dass Mikroorganismen Formen von Cobalamin produzieren können, die beim Menschen keine physiologische Funktion haben (Pseudocobalamin). In Mikroorganismen können diese Analoga jedoch die gleiche funktionelle Eigenschaft erfüllen wie das echte Vitamin B12 [23]. Während der Indikatorstamm nicht zwischen dem im Menschen aktiven Vitamin B12 und den inaktiven Pseudovitaminen unterscheiden kann, ermöglichen chromatographische Verfahren wie LC-MS/MS die Unterscheidung zwischen den Formen [23]. Die aktiven und nicht-aktiven Vitamin- B12 -Formen beim Menschen unterscheiden sich in ihrem unteren axialen Liganden. Der untere axiale Ligand von Pseudovitaminen ist Adenin, während DMBI in der aktiven Form des Menschen vorhanden ist [7,23].

Ziel dieser Studie war die Isolierung und Identifizierung neuartiger Cobalamin produzierender Stämme aus komplexen Fermentationsprodukten und Mischkulturen unter Verwendung eines Vitamin B12-freien Mediums. Das Isolat muss in der Lage sein, das physiologisch aktive Vitamin B12 zu produzieren und eine Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten aufweisen. Die Anwendung zur Biofortifizierung von Lebensmitteln wurde an Apfelsaft getestet, um deklarierbare Vitamin B12 -Konzentrationen zu erreichen, ohne dass eine pH-Anpassung oder die Zugabe wachstumsfördernder Substanzen (z. B. Hefeextrakt) erforderlich wäre. Es wurde eine Konzentration von mindestens 1,9 µg Vitamin B12/L angestrebt, da dies die Anforderung für gesundheitsbezogene Angaben gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates (Version vom 1. Oktober 2011) erfüllt.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verwendete Kulturmedien zur Anreicherung und

Isolierung mMBA (modifiziertes mikrobielles Vitamin B12-Testmedium): Insgesamt wurden 42,3 g des mikrobiellen Vitamin B12 -Testmediums (M036, HiMedia, Thane, Indien) mit 5 mg/l Kobalt- (II)-chlorid-Hexahydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 5 g/l Glycerin (VWR Chemicals, Darmstadt, Deutschland) für die Anreicherungskultur ergänzt. Vor dem Autoklavieren (121 °C, 15 min) wurden 9 mL des Mediums in 12 mL-Kulturröhrchen mit Schraubverschluss aliquotiert.

Zum Ausstreichen der Platten wurden 1,5 % Agar hinzugefügt.

PAB (Propionibacterium-Agar): Zur gezielten Anreicherung von Propionsäurebakterien wurde DSMZ-Medium 91 verwendet (10,0 g Caseinpepton, vitaminfrei (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland); 5,0 g Hefeextrakt; 10,0 g Na-Lactat (60 %-w/v, ThermoScientific, Geel, Belgien); und 15,0 g Agar (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 1000 mL demineralisiertem H₂O). In einem Anaerobiergefäß wurden Agarplatten unter anaeroben Bedingungen mit Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert.

2.2. Proben

Handelsübliche Proben eines Sauerteigs (Seitenbacher Natur Sauerteig, Seitenbacher Naturkost, Buchen, Deutschland), eines Sauerkrautsafts (dmBio, Karlsruhe, Deutschland) und eines fermentierten Brottrunks (Original Kanne Brottrunk, Kanne Brottrunk GmbH und Co. Betriebsgesellschaft KG, Selm-Bork, Deutschland) wurden in lokalen Supermärkten gekauft; vier Rohmilchproben wurden von lokalen Milchviehbetrieben (Gebiet in und um Fulda, Deutschland) bezogen; und vier Probiotika wurden online bestellt. Die enthaltenen Arten sind nachstehend bei den einzelnen Produkten aufgeführt; wenn sie bei der taxonomischen Neuorganisation im Jahr 2020 [27] neu klassifiziert wurden, wird die neue Artbezeichnung angegeben: • „Symbio Extra RedCare“, Shop-Apotheke BV, Sevenum, Niederlande: *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactococcus*

lactis, *Bifidobacterium lactis*; • „OMNi-BiOTiC® 10“, APG Allergosan Pharma GmbH, Graz, Österreich: *L. Acidophilus* W55, *L. Acidophilus* W37, *L. Plantarum* W1, *B. Lactis* W51, *Enterococcus Faecium* W54, *L. Paracasei* W20, *Lacticaseibacillus Rhamnosus* W71, *Ligilactobacillus Salivarius* W24, *L. Plantarum* W62, *Bifidobacterium bifidum* W23;

• „BactoFlor 10/20“, Dr. Wolz Zell GmbH, Geisenheim, Deutschland: *B. bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *E. faecium*;

- „Darmflora plus select“, Dr. Wolz Zell GmbH, Geisenheim, Deutschland: *L. Acidophilus*, • „Darmflora plus Select“, Dr. Wolz Zell GmbH, Geisenheim, Deutschland: *L. Acidophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactisacipacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. breve*, *Streptococcus thermophilus*, *B. bifidum*, *B. lactis*.

Vier Proben von selbstfermentiertem Sauerteig und eine Probe von selbstfermentiertem Kimchi wurden getestet. Die Proben wurden nicht von den Autoren selbst hergestellt, sondern zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden nicht von den Autoren selbst hergestellt, sondern zur Verfügung gestellt. auf Anfrage von persönlichen Kontakten. Diese sechzehn Proben wurden auf Vit-amin B12 und Vitamin B12-produzierende Stämme. *Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016 (ATCC Vitamin B12 und Vitamin B12-produzierende Stämme. *Limosilactobacillus reuteri* DSM 20016 (ATCC 23272) wurde während des Isolierungsverfahrens als positive Kontrolle verwendet. Dieser Stamm wurde 23272) wurde während des Isolierungsverfahrens als positive Kontrolle verwendet. Dieser Stamm wurde als positive Kontrolle ausgewählt, da es ein schnelles Wachstum auf dem mMBA erzielt, und die Pseu- als positive Kontrolle ausgewählt, da es ein schnelles Wachstum auf dem mMBA erzielt, und die

Die Synthese von Doco-balamin ist in der Literatur gut beschrieben [7,23]. Die Synthese von nicht inokuliertem mMBA- Pseudoco-balamin ist in der Literatur gut beschrieben [7,23]. Die Synthese von nicht inokuliertem mMBA-Pseudoco-balamin ist in der Literatur gut beschrieben [7,23]. wurde als Negativkontrolle verwendet. mMBA wurde als Negativkontrolle verwendet.

2.3. Überblick über das Isolierungsverfahren

Das Screening-Verfahren ist in Abbildung 1 dargestellt. In der ersten Phase wurden die Lebensmittel während von 100 µl mBFA Vitamin B12 untersucht und 100 µl der Probe wurden trans- zu 9 µl 48 MRS pH 5,7 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und bei 30 °C 48 h auf einer Zelle Zellen zu prüfen. Wenn Vitamin B12 nachgewiesen wurde, wurde die Kultur dreimal in 100 µl des suspendierten Kulturmediums in die Kochsalzlösung überführt, 100 µl mBFA und 48 h bei 30 °C inkubiert. Wenn kein Vitamin B12 nachgewiesen wurde, wurde die MRS-Kultur der Probe die Probe werden verworfen.

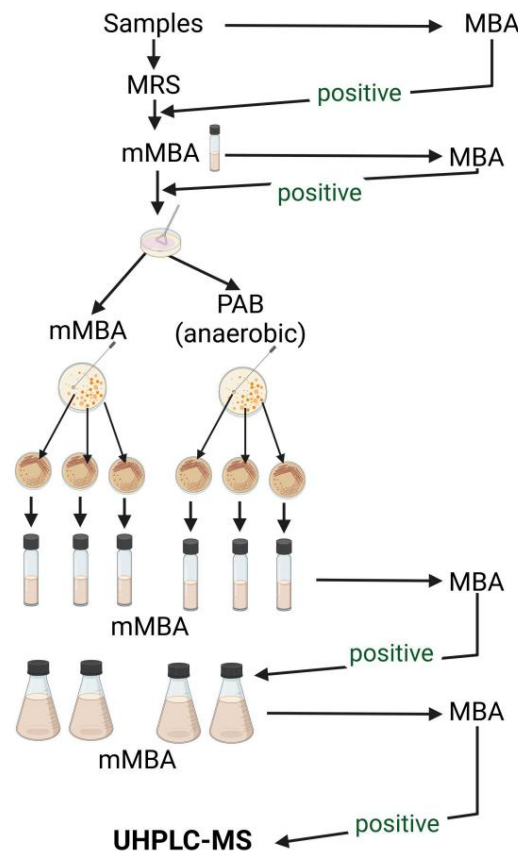


Abbildung 1. Isolierungs- und Screeningverfahren für Cobalaminproduzenten in verschiedenen Lebensmittelproben

Anschließend wurden fünf Subkulturen hergestellt, indem 100 µl in 9 ml des nachdem es 48–72 h lang bei 30 °C inkubiert worden war. Die letzte Subkultur wurde für das MBA verwendet, um mMBA nach Inkubation bei 30 °C für 48–72 h. Die letzte Subkultur wurde für die MBA verwendet, um das Vorhandensein von Cobalaminproduzenten in der mikrobiellen Gemeinschaft zu bestimmen. Die positive bestimmen Sie das Vorhandensein von Cobalaminproduzenten in der mikrobiellen Gemeinschaft. Die positiven MBA-Proben wurden auf mMBA-Agar und PAB (anaerobe Inkubation) ausgestrichen mit

Die Kolonien wurden in verschiedenen Verdünnungen kultiviert und 72 bis 96 Stunden bei 30 °C inkubiert. Eine zufällige Anzahl von Kolonien wurde auf dem jeweiligen Medium ausgestrichen und unter denselben Bedingungen inkubiert. Einzelne Kolonien der isolierten Kolonien wurden in das mMBA überführt und erneut auf das Wachstum des Indikatorstamms getestet. Cobalamin-positive Isolate wurden in 200 mL des mMBA kultiviert und LC-MS/MS-Analysen unterzogen, um den vorhandenen Cobalaminspiegel zu bestimmen.

2.4. Probenvorbereitung

Zur Untersuchung der festen (Lebensmittel-)Proben und Probiotika wurden 0,1 g der Probe bzw. der Inhalt einer Kapsel in 9 ml Kochsalzlösung gelöst; die folgende Vorbereitung war für die gelösten, flüssigen und Fermentationsproben identisch.

Ein Teil der Probe (4 ml) wurde in ein bernsteinfarbenes Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zugabe von 50 µl 0,1%iger KCN-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) 10 min gekocht. Durch diese Behandlung werden die mikrobiellen Zellen aufgebrochen, das Cobalamin in den Extrazellulärraum freigesetzt und in seine stabilste Form, Cyanocobalamin, umgewandelt [1]. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4000 U/min (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland) wurde 1 ml des Überstands in 9 ml des Vitamin- B12 -Testmediums überführt, das durch Auflösen von 42,3 g/l des Testmediums (M036, HiMedia, Indien) unter Hitze hergestellt wurde. Falls der Überstand nach der Zentrifugation trüb war, wurde die Probe vor dem Überführen in das Testmedium durch einen Spritzenfilter (0,45 µm, PES 25 mm, WICOM, Heppenheim, Deutschland) gefiltert.

Nach dem Autoklavieren (121 °C, 15 min) und Abkühlen wurden die Proben mit 50 µL des gewaschenen und verdünnten Indikators beimpft.

2.5. Modifizierter mikrobieller Vitamin- B12- Test (MBA)

Für den modifizierten Vitamin- B12- Test wurde *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355 als Indikatorstamm verwendet, um das Cobalaminvorkommen in den Proben, der Mischkultur und den sequenziell isolierten Kulturen zu bestimmen. Der Indikatorstamm wird bei 80 °C gelagert und in 9 mL Mikroinokulumbrühe, bestehend aus 5,0 g Pepton, 2,0 g Hefeextrakt, 10 g D-(+)-Glucose, 2 g KH₂PO₄ und 0,1 g Tween 80 in 1000 mL demineralisiertem Wasser (alle Komponenten von Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), reaktiviert (30 °C, 48–72 h). Vor der Verwendung in den mikrobiologischen Untersuchungen wurde die Indikatorkultur dreimal in Kochsalzlösung (0,85 % NaCl, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen (4000 U/min, 5 min; Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland) und 10-fach verdünnt.

Mit einem Spektralphotometer (DR6000, Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland) wurde das Wachstum des Indikators bei λ = 600 nm (OD₆₀₀) nach 48-stündiger Inkubation bei 30 °C gemessen. Proben mit einer optischen Dichte von mindestens dem Doppelten des Leerwerts wurden als positiv für Vitamin B12 angesehen.

2.6. Wachstumsbedingungen und Bestimmung bioaktiver Formen von Vitamin B12

Für die LC-MS/MS-Analysen wurden die sechs Isolate in 200 mL des mMBA (1%-v/v Inokulum nach Anzucht auf drei Subkulturen in 9 mL des mMBA) in einem Erlenmeyerkolben für sieben Tage bei 30 °C kultiviert. *Acidipropionibacterium acidipropionici* DSM 20273 wurde identisch als Referenzstamm kultiviert. Die Probenpräparation erfolgte nach Literatur [28]. Hierzu wurde 15N-Cyanocobalamin als innerer Standard. Der Standard wurde von Lenz et al. [28] nach dem von Wang et al. [29] beschriebenen Schema hergestellt und bereitgestellt. Die Proben wurden mit Taka-Diastase aus *Aspergillus oryzae* und Papain aus Papaya-Latex (beide Enzyme von Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) vorverdaut. Die Reinigung erfolgte über Immunaффinitätssäulen (EASI-EXTRACT® Vitamin B12; R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland).

Die Unterscheidung zwischen dem beim Menschen aktiven Vitamin und dem Pseudovitamin wurde von den Autoren der Methode [28] mithilfe eines UHPLC- Systems (Ultrahochdruck-Flüssigkeitschromatographie), das an ein Ionenfallen-Massenspektrometer gekoppelt war, sichergestellt.

2.7. Identifizierung der isolierten Produktionsstämme Eine

Analyse der Isolate erfolgte mittels MALDI-TOF MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption-Ionisation-Flugzeit-Massenspektren) durch DSMZ Services, Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland.

A. orientalis wurde erstmals 2001 von Lisdiyanti et al. beschrieben [30]. Der Stammtyp der Art ist 21F-2T (= NRIC 0481T = IFO 16606T = JCM 11195T), isoliert aus Canna-Blüten.

Der Stamm produziert 2-Keto-D-gluconsäure aus Glucose, jedoch keine 5-Keto-D-gluconsäure oder 2,5-Diketo-D-gluconsäure und wächst zwischen einem pH-Wert von 3,5 und 8,0 [30].

A. malorum wurde erstmals 2002 von Cleenwerck et al. beschrieben [31]. Der Stammtyp der Art ist LMG 1746T (= DSM 14337T), isoliert aus faulen Äpfeln. Er produziert 2-Keto-D-gluconsäure aus Glucose, jedoch keine 5-Keto-D-gluconsäure. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 4,5 und 7,0 [32].

Berichte über die Arten *A. orientalis* und *A. malorum* sind selten und keine davon steht mit der Vitamin-B12-Synthese in Zusammenhang. Die PubMed-Suche nach „*Acetobacter orientalis*“ liefert 20 Ergebnisse, während die Suche nach „*Acetobacter malorum*“ 23 Ergebnisse liefert.

2.8. Prüfung auf Wachstum bei niedrigem pH-Wert in Apfelsaft

Die Bestimmung der Wachstumskapazität bei niedrigem pH-Wert wurde mit Apfelsaft durchgeführt, der auf verschiedene pH-Werte eingestellt wurde (pH 2,85, 3,05, 3,30 (ursprünglicher pH-Wert des Apfelsafts), 3,55 und 3,80). Apfelsaft wurde gewählt, weil es sich um ein regionales Produkt handelt, das weltweit konsumiert wird und das ganze Jahr über zu einem relativ niedrigen Preis erhältlich ist. Darüber hinaus hemmt der niedrige pH-Wert das Wachstum der meisten Bakterien und stellt daher ein anspruchsvolles Medium dar. Diese pH-Werte wurden gewählt, um die unteren Grenzen der Wachstumskapazität und des Produktbildungspotenzials zu untersuchen, da man davon ausgehen würde, dass dies die Essigsäurebakterien von den LAB und PAB unterscheidet. Der Apfelsaft wurde in einem örtlichen Supermarkt („rio d'oro“, Aldi Süd, Fulda, Deutschland) gekauft und der pH-Wert mit Salzsäure oder Natriumhydroxid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingestellt. Vor dem Autoklavieren (121 °C, 15 min) wurden 30 ml des zubereiteten Apfelsafts in 100-ml-Laborglasflaschen aliquotiert. Die beimpften Proben wurden in Dreifachbestimmung und die Leerproben in Zweifachbestimmung durchgeführt.

Vor der Inokulation wurden die Kulturen aus der Lagerung (−80 °C, Glycerin) in Apfelsaft mit 5 g/l Hefeextrakt und einem auf 5,6 eingestellten pH-Wert von 5,6 reaktiviert (72 h, 30 °C). Die reaktivierten Kulturen wurden zweimal mit 0,1 L auf 9,9 mL reinem Apfelsaft (pH 3,30, 72 h, 30 °C) subkultiviert, bevor 300 µL (1 %-v/v) auf 30 mL des Fermentationsmediums übertragen wurden. Subkulturen des Apfelsafts wurden durchgeführt, um eine Anpassung an den niedrigen pH-Wert des Apfelsafts zu ermöglichen. Die Kulturen wurden 7 Tage bei 30 °C in einem linearen Schüttelwasserbad (1083, GFL, Burgwedel, Deutschland) inkubiert. Die optische Dichte OD600 (DR6000, Hach Lange, Düsseldorf, Deutschland), der pH-Wert (InLab Flex-Micro und SevenExcellence, Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) und die Vitamin-B12-Konzentration (MBA) wurden nach der Inkubation bestimmt.

2.9. Quantifizierungsverfahren mittels mikrobieller Vitamin-B12-Analyse (MBA)

Zur Quantifizierung wurde das mikrobiologische B12-Testmedium von Millipore (B3801, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Anweisungen des Herstellers wurden mit einigen Modifikationen befolgt.

Insgesamt wurden 20 ml der Proben und 50 µl KCN (1 %) mit 50 ml der Aufschlusspufferlösung (1,29 g Dinatriumhydrogenphosphat, 1,1 g Zitronensäure und 1,0 g Natriummetabisulfit in 100 ml destilliertem Wasser) gemischt und dann autoklaviert (121 °C, 15 min). Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert auf 6,0 eingestellt und das Volumen mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Insgesamt wurde 1 ml der zentrifugierten (4000 U/min, 10 min) Probe in 5 ml des Testmediums überführt und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Die Kalibrierungskonzentrationen des Vitamin-B12-Standards (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden auf 25, 50, 75, 100, 125, 150 und 175 pg/ml eingestellt.

Vor dem Waschen, Verdünnen und Inokulieren wurde 1 ml der Indikatorkultur inkubiert in 9 ml des Testmediums für 48 Stunden, um die Kultur von Cobalamin zu befreien.

Die Bestimmung wurde für die Proben und Standards in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Die optische Dichte (OD600) der Proben wurde gegen Wasser gemessen. Die Probenkonzentration wurde anhand der halblogarithmischen Auftragung der optischen Dichte über der Standardkonzentration ermittelt .

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung von Cobalaminproduzenten Sieben

der sechzehn Produktproben reagierten beim ersten MBA positiv (Tabelle 1), darunter alle Milchproben (n = 4), der Brottrunk, ein Probiotikum, eine Probe aus selbst fermentiertem Sauerteig sowie die positive Kontrolle. Bei der Überprüfung der mikrobiellen Gemeinschaft dieser Proben war nur die Sauerteigprobe positiv auf Cobalamin.

Das Eliminieren einiger Proben im Stadium der mikrobiellen Gemeinschaft war für die meisten Produktkategorien keine Überraschung.

Tabelle 1. Zusammenfassung der von MBA in den verschiedenen Isolierungsphasen positiv und negativ gescreenten Proben .

Indikator	Wachstum	Anzahl der Produkte	Mikrobielle Gemeinschaft	Isolate
Negativ		9	6	15
Positiv		7	1 (Sauerteig)	
		L. reuteri DSM 20016	L. reuteri DSM 20016	6 L. reuteri DSM 20016

Vitamin B12 in der Milch wird von der Pansenmikrobiota der Kuh synthetisiert und im Gewebe akkumuliert [1]. Es ist noch umstritten, ob die Milchdrüse ein steriles Organ ist, ob Mikroorganismen in der Rohmilch durch Kontamination bei der Probenentnahme entstehen oder ob es ein Milchmikrobiom gibt [33]. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass die Zusammensetzung des Pansenmikrobioms vielfältiger ist und sich deutlich von den Mikroorganismen in der Milch unterscheidet [34]. Die Bestimmung von Cobalamin in der Milch wurde erwartet, die Ermittlung der verantwortlichen Hersteller jedoch nicht. Das eine Probiotikum („Darmflora plus select“), das positiv auf Cobalamin getestet wurde, ist mit 2,5 µg Vitamin B12 pro Kapsel ergänzt . Das positive Ergebnis der mikrobiellen Gemeinschaft des fermentierten Brottrunks war zu erwarten, da auf der Flasche ein Vitamin- B12- Gehalt von 1,36 µg/L angegeben ist . Das Vitamin wird durch Sauerteigstarter produziert , die im Endprodukt nicht deaktiviert werden. Die für die Vitamin- B12- Bildung im Brottrunk verantwortlichen Mikroorganismen konnten sich in der zweiten Phase allerdings nicht so stark durchsetzen, dass Vitamin B12 messbar war.

Da nur die mikrobielle Gemeinschaft eines Sauerteigs positiv für das Vitamin war, wurden nur Kolonien dieser Proben auf Agarplatten isoliert. Sechs der einundzwanzig zufällig gesammelten Kolonien waren bei der MBA-Analyse positiv und wurden daher von der DSMZ nach Bestimmung der vorhandenen Vitamin- B12- Form identifiziert.

3.2. Identifizierung der isolierten Stämme Die

Analyse der sechs an die DSMZ eingesandten Isolate ergab, dass sich fünf Isolate stark ähneln und der Art *Acetobacter malorum* zugeordnet werden können. Das sechste Isolat hingegen wird als *Acetobacter orientalis* HFD 3031 identifiziert. Demnach ist davon auszugehen, dass es sich bei den Isolaten von *Acetobacter malorum* um einen einzigen Stamm handelt, der mehrfach isoliert wurde. Daher wird in den folgenden Betrachtungen nur ein Stamm, *A. malorum* HFD 3141, betrachtet.

3.3. LC-MS/MS-Nachweis der Vitamin B12 -Bildung

Mittels LC-MS/MS wurde die vorliegende Form des Vitamin B12 bestimmt . Die Fragmentierungsmuster des Vitamin B12 lassen sich in der Massenspektrometrie deutlich von denen des Pseudovitamins unterscheiden (Abbildung 2).

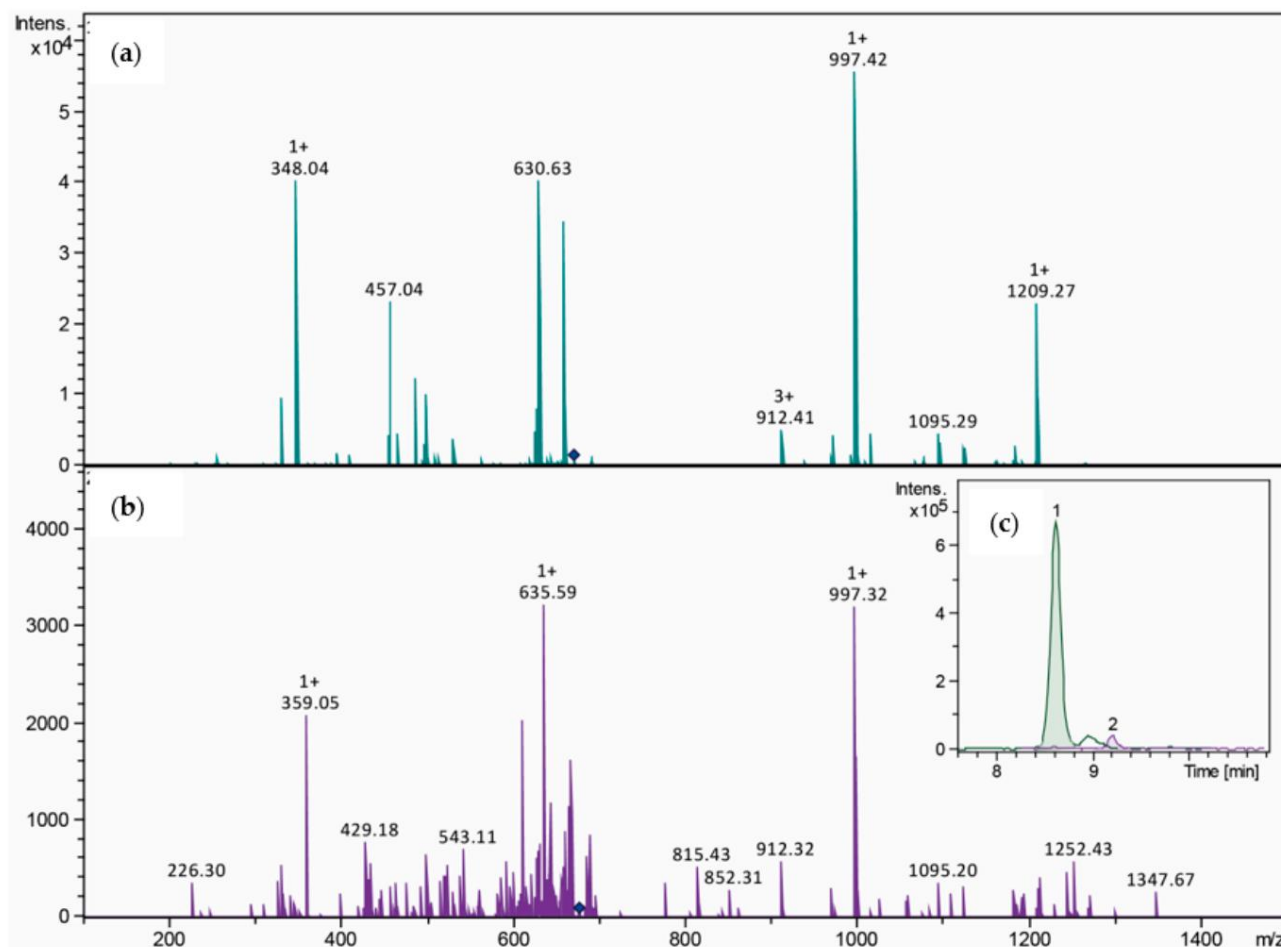
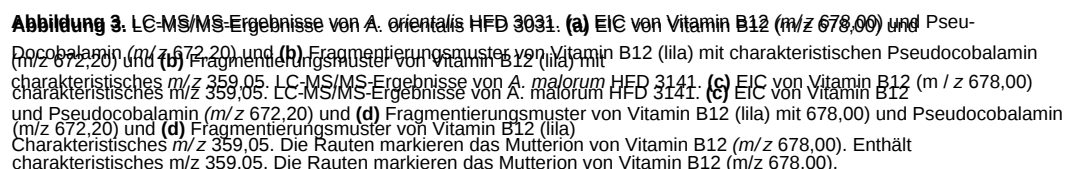


Abbildung 2. Cobalamin (a) und Vitamin B12 (b) MS/MS-Spektren sowie (c) EIC von Vitamin B12.

Cobalamin (grün) mit charakteristischem m/z 348,04 und (b) Vitamin B12 (lila) mit charakteristischem m/z 359,05. Die Rauten markieren das jeweilige Elution der beiden Cobalaminformen mit m/z 678,00 (Vitamin B12) und m/z 672,20 (Pseudocobalamin). (c) EIC von Vitamin B12 (m/z 678,00, violett) und Pseudocobalamin (m/z 672,20, grün) mit ihren Retentionszeitunterschieden.

Während m/z 997 sowohl in der Pseudo- als auch in der aktiven Form zu finden ist (Abbildung 2a,b), ist das Vorhandensein von m/z 997 sowohl in der Pseudo- als auch in der aktiven Form zu finden (Abbildung 2a,b), ist das Vorhandensein von der Fragmentierungsmuster m/z 348,04 + Zucker + PO₃ (Pseudocobalamin) und m/z 359,05 + DMBI + Zucker + PO₃ (Vitamin B12) ist ein klarer Marker für die Vorhandensein von Vitaminform, da es sich um die charakteristischen niedrigeren Liganden handelt [23]. Retentionszeiten für Pseudocobalamin (Peak 1) bei 8,7 min (Peak 1) und Vitamin B12 (Peak 2) bei 9,2 mal für min. Beide Retentionszeiten von 0,5 min konnten keine Peak nachgewiesen werden (Abbildung 3a,c), aber beide Isolate zeigten einen Peak bei 9,2 min von EIC. Weder die Probe von *A. malorum* HFD 3141 zeigte einen Peak noch *A. orientalis* HFD 3033 isolierte. Das Pseudocobalamin- und Vitamin B12-Fragmentierungsmuster (Abbildung A. orientalis 3b,d) von m/z 678,00 zeigt das charakteristische m/z 359,05 für den niedrigeren Liganden DMBI. Es hat daher daher wurde gezeigt, dass beide Isolate Vitamin B12 produzieren können, jedoch nicht die aktive Form. aktive Form der B-Vitamin in Fermentationsbedingungen.



Die Ergebnisse der pH-Toleranztests sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die OD₆₀₀-Werte entsprechen den korrigiert durch den Trübungseintrag des Mediums, d. h. abzüglich des Blindwertes, und der pH-Wert korrigiert durch den Änderungswert der Titrationskurve. Bei der pH-Bestimmung wurde das pH-Meter mit HFD 3031 und A. pH-Änderung vom Anfangswert HFD 3114 kann nur bei pH-Werten zwischen 6,0 und 6,5 bestimmt werden. Bei pH-Werten unter 6,0 oder über 6,5 muss die Toleranzgrenze über niedrigeren pH-Werten bei beiden Stämmen ähnlich.

A. orientalis HFD 3031 A. orientalis HFD 3031					A. malorum HFD 3141 A. malorum HFD 3141				
Anfangs-pH-Wert		Vitamin B12			Anfangs-pH-Wert		Vitamin B12		
Anfangs-pH-Wert	γOD600	γpH	γOD600	γpH	B12	γOD600	Vitamin	γpH	Vitamin B12
					[μg/L]	γOD600	[μg/L]		[μg/L]
2,85	0,068 ± 0,24	γ0,05	2,85	0,068 ±	0,90	0,000 ± 0,008	0,35 ±	γ0,05	<LOD *
	0,24	γ0,05	0,193 ± 0,42	γ0,05	0,000 ± 0,008	0,35 ±	0,90	γ0,05	<LOD *
3,05	0,193 ± 0,42	γ0,05	3,30 (Original)	0,248 ± 0,063	2,68 ± 0,92	0,059 ± 0,018	3,19 ± 0,13	γ0,08	0,89 ± 0,92
3,05	γ0,07	3,30 (Original)	0,248 ±		0,059 ± 0,018	3,19 ± 0,13	0,069 ±	γ0,08	0,89 ± 0,92
0,063	γ0,07	3,55	0,349 ± 0,064	γ0,26	3,55	0,349 ± 0,064		γ0,08	0,21 ± 0,96
γ0,26	3,80	0,438 ± 0,026	γ0,33	0,438 ± 0,026	γ0,33	* Wert		γ0,18	3,81 ± 1,42
unterhalb der Nachweisgrenze (LOD).					± 0,008	1,89 ± 2,33	0,181 ± 0,024	γ0,22	7,97 ± 1,56
3,80					± 2,33	0,181 ± 0,024		γ0,38	7,97 ± 1,56

Ein leichter Anstieg der OD600 wurde bei pH 2,85 für *A. orientalis* HFD 3031 beobachtet und bei pH 3,05 für *A. malorum* HFD 3141. Da dieser Anstieg zusammen mit großen Standardabweichungen in OD600 und Vitamin-B₁₂-Konzentrationen, dies die Schwelle der Mindesttoleranz der jeweiligen Stämme. Der Toleranzbereich für die beiden Isolate beträgt daher 3,05 bzw. 3,30. Der Toleranzbereich für die beiden Isolate wird daher als 3,05 bzw. 3,30 definiert. Mit steigendem Ausgangs-pH-Wert ändert sich der pH-Wert steigt die Veränderung der optischen Dichte, des pH-Abfalls und der Vitamin- B₁₂- Konzentration. Die höchste optische Dichte, der pH-Abfall und die Vitamin- B₁₂- Konzentration steigen. Das höchste Wachstum und die höchste Produktsynthese wurden bei dem höchsten pH-Ausgangswert für beide beobachtet und die Produktsynthese wurde bei beiden Isolaten beim höchsten pH-Ausgangswert beobachtet. Bei

Isolate. Bei einem pH-Wert von 3,80 produziert *A. orientalis* 18,89 µg/l Vitamin B12 und *A. malorum* 7,97 µg/l. Eine weitere Steigerung des Wachstums und der Vitamin- B12 -Synthese bei höheren Ausgangs-pH-Werten kann angenommen werden, da der optimale pH-Wert von *Acetobacter* sp. bei 5,0–6,5 liegt [35]. Der pH-Abfall während der Fermentation ist wahrscheinlich auf die Bildung von Gluconsäure aus Glucose zurückzuführen [30,31]. Trotz der ungünstigen Wachstumsbedingungen im Apfelsaft (niedriger pH-Wert und schlechte Aminosäurezusammensetzung) konnten beide Stämme auch beim ursprünglichen pH-Wert wachsen und beträchtliche Mengen des Vitamins produzieren.

4. Diskussion

Es wurde nachgewiesen, dass die Verwendung eines Vitamin- B12-freien Mediums zur Isolierung von Cobalaminbildnern aus komplexen Fermentationsprodukten praktikabel ist. Obwohl die Anreicherungs- und Isolierungsexperimente auf PAB und LAB abzielten, wurden zwei neue potente Vitamin- B12- Stämme isoliert, die zu AAB gehören. Diese Stämme wurden durch MALDI-TOF MS als *A. malorum* und *A. orientalis* identifiziert. Die Identifizierung von AAB ist jedoch aufgrund des hohen Ähnlichkeitsgrads zwischen den 16S-rRNA-Gensequenzen eng verwandter Arten besonders schwierig. Wieme et al. (2014) konnten *A. malorum* LMG 1746-Stämme nicht von *Acetobacter cerevisiae* -Stämmen durch MALDI-TOF-MS-Analyse unterscheiden [36]. Selbst ein Vergleich der 16S rRNA von *A. malorum* und *A. cerevisiae* reicht nicht aus, um diese Arten eindeutig zu identifizieren. Folglich werden in der Literatur andere Methoden zur Identifizierung von AAB empfohlen, wie etwa die ITS-Region (internal transcribed spacer) zwischen den 16S- und 23S-rRNA-Genen. Mit dieser Technik kann man zwischen diesen eng verwandten Arten unterscheiden [37]. Folglich ist es möglich, dass die aktuellen Isolate, wenn sie durch besser auf AAB zugeschnittene Methoden identifiziert werden, neu klassifiziert werden müssen. Wenn ähnliche Versuche durchgeführt werden sollten, sollte das Versuchsprogramm mit Essigsäure fermentierte Nahrungsmittelquellen und speziell für AAB entwickelte Fermentationsmedien wie das dafür vorgesehene Medium mit einem pH-Wert von 3,5 umfassen [38]. Obwohl eine Isolierung und Identifizierung über das Vitamin B12-freie Medium möglich ist, ist eine anschließende Analyse zur Bestimmung der vorhandenen Cobalaminform erforderlich, um eine Pseudocobalaminsynthese auszuschließen.

Der Grund, warum vor unserer Veröffentlichung nur zwei weitere AAB [7,8] identifiziert wurden, liegt darin, dass die gescreenten Isolate vor dem Screening nach Gattung oder sogar Art vorselektiert werden. Die Vorauswahlschritte umfassen die Verwendung leicht genotypisch identifizierter Stämme (PAB und LAB) [6,20], Gram-Färbung [9,20,22], morphologisches Erscheinungsbild unter dem Mikroskop [9,22], Katalase-Aktivität [20,22] und den Nachweis von Milchsäure- und Ethanolbildung [9]. PAB sind Gram-positiv, nicht beweglich, anaerob bis aerotolerant [39] und Katalase- positiv. LAB sind Gram-positiv, fakultativ anaerob und Katalase-negativ [40]. Da AAB Gram-negativ, Katalase-positiv und obligat aerob sind und Essigsäure durch Ethanolverwertung produzieren [41], werden sie vorab herausgefiltert. Das bevorstehende Screening leicht isolierbarer AAB-Stämme oder die gezielte Isolierung aus Lebensmittelmatrizen mit den oben genannten Strategien (z. B. Vitamin -B12-freie Medien und *cbiK*- oder *bluB/cobT2*-Gene als Marker) wird wahrscheinlich zur Identifizierung weiterer Cobalaminproduzenten innerhalb der AAB-Gruppe führen. Das Screening nach den spezifischen Genen, die an der Vitaminsynthese beteiligt sind, sollte idealerweise die Sequenzvariationen der Homologen berücksichtigen. Es wurde gezeigt, dass Sequenzvariationen in den *cobU/T*-ähnlichen Homologen für die Selektivität verschiedener niedriger Liganden verantwortlich sind, die in das Cobamid eingebaut werden [42–44]. Obwohl DMBI allgemein bevorzugt wird, können je nach vorhandenem Homolog und Umgebungsbedingungen auch andere niedere Liganden in das Cobamid eingebaut werden [43]. Wenn DMBI nicht durch das Fermentationsmedium oder die Produktionsstämme bereitgestellt wird, können daher Cobamide gebildet werden, die beim Menschen keine Vitamin- B12- Funktion erfüllen. Screening und Identifizierung auf der Grundlage des Vorhandenseins der spezifischen Enzyme der Vitamin -B12- Synthese sollten daher Kenntnisse über die Synthese von DMBI und die Selektivität der Homologen umfassen.

Die Bioanreicherung von Lebensmitteln durch *Acetobacter* sp. bietet ein hohes Potenzial für traditionelle Lebensmittelfermentationen. Da die Stoffwechselkapazitäten weniger eingeschränkt sind als die von LAB, können sie in weniger nährstoffreichen Medien wachsen, haben eine hohe Toleranz gegenüber niedrigem pH-Wert und Pseudocobalamin wurde in unseren Proben nicht nachgewiesen. Diese Eigenschaften qualifizieren *A. orientalis* HFD 3031 und *A. malorum* HFD 3141 für die Anreicherung von Vitamin B12 in Fermentationsmedien

für andere Produzenten ungeeignet. Ihre Fähigkeit, in Apfelsaft zu wachsen und Vitamin B12 zu produzieren, wurde in dieser Arbeit erfolgreich nachgewiesen. Die für gesundheitsbezogene Angaben ausreichende Konzentration von 1,9 µg/L wurde von *A. orientalis* HFD 3031 (3,19 µg/L) beim ursprünglichen pH-Wert von Apfelsaft und von *A. malorum* HFD 3141 bei pH 3,55 mit 3,81 µg/L überschritten. Die Wachstums- und Endkonzentrationen waren jedoch relativ gering, und Maßnahmen zur Erhöhung der Konzentrationen sollten untersucht werden. In Experimenten zur Anreicherung von Vitamin B12 durch *L. reuteri* in Furu (fermentiertem Tofu) [25,45] und Sojamilch [25] wurden Konzentrationen von 141,7 µg/kg Frischgewicht bzw. 132,2 µg/L erreicht. Bei der Fermentation von reifem Kokoswasser mit *L. plantarum* DW12 konnte eine Vitamin B12-Konzentration von 14 µg/mL erreicht werden [46]. Durch die Ko-Kultivierung von *P. freudenreichii* und *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* erreichte der Vitamin B12-Gehalt in Sojamilch bis zu 8,93 µg/L, während bei der Einzelkulturfermentation von *P. freudenreichii* 5,72 µg/L nachgewiesen wurden [47]. Die Fermentation von solubilisierter Weizenkleie mit *P. freudenreichii* führte durch Ko-Fermentation mit Milchsäurebakterien und Hefen zur Produktion von 55 µg/L Vitamin B12 [48].

Die von uns erreichten Vitaminkonzentrationen entsprechen in den meisten Fällen den in der Literatur bei der Anreicherung von Lebensmitteln angegebenen Werten, auch wenn in einigen Fällen deutlich höhere Werte gefunden werden. Die durchgeführten Versuche zur pH-Toleranz der Isolate im niedrigen Bereich deuten jedoch darauf hin, dass das maximale Potenzial für die Vitamin- B12- Synthese noch nicht erreicht ist. Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um den Einfluss unterschiedlicher Fermentationsparameter wie höherer pH-Wert, unterschiedliche Fruchtsaftsarten, Fermentationstemperaturen und Belüftungsraten auf die Synthese zu ermitteln. Studien darüber, ob die Zugabe von Vorstufen (DMBI, Riboflavin, Nicotinamid usw.) einen ähnlich fördernden Effekt wie PAB hat [49], würden ebenfalls einen tieferen Einblick in die Syntheseigenschaften der Stämme liefern.

Die Anreicherung pflanzlicher Lebensmittel durch Fermentation kann in veganen und vegetarischen Diäten relevante Konzentrationen liefern. Die Verwendung von Stämmen ohne die Fähigkeit, Analoga zu produzieren, stellt eine zuverlässige Quelle der physiologisch aktiven Form dar. Die Einbeziehung von *A. malorum* HFD 3141 und *A. orientalis* HFD 3031 in Fermentationsstarterkulturen, die natürlicherweise AAB enthalten, ist vielversprechend. Soby (Kombucha), Kefirkörner (Kefir und Wasserkefir), Essigmutter (Essig) [50] und Sauerteig [51] könnten Beispiele für die Anwendung der isolierten Stämme sein. Da AAB bereits Teil dieser Fermentationsprozesse ist, sollten die Produkteigenschaften nicht drastisch verändert werden. Darüber hinaus sollten diese aufgeführten mit AAB fermentierten Lebensmittel auf ihren Vitamin-B12-Gehalt getestet werden, da die verfügbaren Daten in diesem Bereich als unzureichend angesehen werden.

Diese Studie zeigt, dass die Suche nach potenziellen Stämmen für die Bioanreicherung von Lebensmitteln mit Vitamin B12 ausgeweitet werden muss. Frühere Autoren konzentrierten sich auf das Screening von LAB und PAB auf ihre Fähigkeit zur Cobalaminbildung. Unsere Ergebnisse sowie die von Bernhardt et al. [7] und Keto et al. [7,8] lassen vermuten, dass die Entdeckung weiterer Vitamin- B12-Produzenten innerhalb der AAB-Gruppe wahrscheinlich ist. Die Isolierung weiterer AAB wird eine größere Vielfalt an Produktionsmerkmalen ermöglichen, wie z. B. unterschiedliche Lebensmittelarten, Erträge, pH-Toleranz, Zuckerverwertung und Nährstoffbedarf.

Beiträge der Autoren: Konzeptualisierung, LS; Methodik, LS; Validierung, LS; formale Analyse, LS; Untersuchung, LS; Ressourcen, LS; Datenkuratierung, LS; Schreiben – Vorbereitung des Originalentwurfs, LS; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, LS, SS und AC; Visualisierung, LS; Überwachung, SS und AC; Projektverwaltung, SS, AC und LS; Mittelbeschaffung, N/A. Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und ihr zugestimmt.

Finanzierung: Diese Forschung erhielt keine externe Finanzierung.

Erklärung des Institutional Review Board: Nicht zutreffend.

Datenverfügbarkeitserklärung: Die in der Studie vorgestellten Originalbeiträge sind im Artikel enthalten, weitere Anfragen können an den/die entsprechenden Autor(en) gerichtet werden.

Interessenkonflikte: Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Verweise

1. Watanabe, F.; Bitto, T. Vitamin B12 -Quellen und mikrobielle Interaktion. *Exp. Biol. Med.* **2018**, *243*, 148–158. [\[CrossRef\]](#)
2. Waldmann, A.; Koschizke, JW; Leitzmann, C.; Hahn, A. Ernährungsgewohnheiten und Lebensstilfaktoren einer veganen Bevölkerung in Deutschland: Ergebnisse der deutschen Veganstudie. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2003**, *57*, 947–955. [\[CrossRef\]](#)
3. EFSA NDA-Gremium. Wissenschaftliches Gutachten zu diätetischen Referenzwerten für Cobalamin (Vitamin B12). *EFSA J.* **2015**, *13*, 4150. [\[CrossRef\]](#)
4. Gomes Soares, M.; Bevilacqua, GC; Marcondes Tassi, É.M.; Reolon Schmidt, VC Fermentierte Lebensmittel und Getränke: Eine mögliche in situ Vitamin B12 Biofortifizierung – Eine Literaturübersicht. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2023**, *74*, 655–667. [\[CrossRef\]](#)
5. Fang, H.; Kang, J.; Zhang, D. Mikrobielle Produktion von Vitamin B12: Ein Überblick und Zukunftsperspektiven. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 15. [\[CrossRef\]](#)
6. Hugenschmidt, S.; Schwenninger, SM; Gnehm, N.; Lacroix, C. Screening einer natürlichen Biodiversität von Milchsäure- und Propionsäurebakterien zur Folat- und Vitamin-B12-Produktion in ergänztem Molkenpermeat. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 852–857. [\[CrossRef\]](#)
7. Bernhardt, C.; Zhu, X.; Schütz, D.; Fischer, M.; Bisping, B. Cobalamin wird von *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509 produziert. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 3875–3885. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Kato, K.; Hayashi, M.; Kamikubo, T. Isolierung von 5,6-Dimethylbenzimidazolcobamid-Coenzym als Cofaktor für Glutamat Bildung aus *Acetobacter suboxydans*. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *165*, 233–237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Masuda, M.; Ide, M.; Utsumi, H.; Niino, T.; Shimamura, Y.; Murata, M. Produktionsstärke von Folsäure, Vitamin B12 und Thiamin durch aus japanischen Pickles isolierte Milchsäurebakterien. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 2061–2067. [\[CrossRef\]](#)
10. De Angelis, M.; Bottacini, F.; Fosso, B.; Kelleher, P.; Calasso, M.; Di Cagno, R.; Ventura, M.; Picardi, E.; van Sinderen, D.; Gobbetti, M. *Lactobacillus rossiae*, ein Vitamin- B12 -Produzent, stellt eine metabolisch vielseitige Art innerhalb der Gattung *Lactobacillus* dar. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Ranaei, V.; Pilevar, Z.; Khaneghah, AM; Hosseini, H. Propionsäure: Produktionsmethode, aktueller Stand und Perspektiven. *Lebensmitteltechnolog. Biotechnol.* **2020**, *58*, 115–127. [\[CrossRef\]](#)
12. Falentin, H.; Deutsch, S.-M.; Jan, G.; Loux, V.; Thierry, A.; Parayre, S.; Maillard, M.-B.; Dherbécourt, J.; Cousin, FJ; Jardin, J.; et al. Das vollständige Genom von *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, einem robusten Actinobacterium mit Anwendungen in der Nahrungsmittel- und Probiotikabranche. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11748. [\[CrossRef\]](#)
13. Piwowarek, K.; Lipińska, E.; Hać-Szymańczuk, E.; Kot, AM; Kieliszek, M.; Bonin, S. Verwendung des Stamms *Propionibacterium freudenreichii* T82 für die effektive Biosynthese von Propionsäure und Trehalose in einem Medium mit Apfeltresterextrakt und Kartoffelabwasser. *Molecules* **2021**, *26*, 3965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Rehberger, JL; Glatz, BA Reaktion von *Propionibacterium*-Kulturen auf Säure und niedrigen pH-Wert: Toleranz und Hemmung. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 211–216. [\[CrossRef\]](#)
15. Thierry, A.; Deutsch, S.-M.; Falentin, H.; Dalmaso, M.; Cousin, FJ; Jan, G. Neue Erkenntnisse zur Physiologie und zum Stoffwechsel von *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *149*, 19–27. [\[CrossRef\]](#)
16. Teusink, B.; Molenaar, D. Systembiologie von Milchsäurebakterien: Für Nahrung und Gedanken. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **2017**, *6*, 7–13. [\[Querverweis\]](#)
17. König, H.; Berkelmann-Löhnertz, B. Erhaltung weinassoziierter Mikroorganismen. In *Biologie der Mikroorganismen auf Trauben, in Most und in Wein*; König, H., Uden, G., Fröhlich, J., Hrsg.; Springer: Berlin/Heidelberg, Deutschland, 2009; S. 451–468, ISBN 9783540854623.
18. Banerjee, R.; Ragsdale, SW Die vielen Gesichter von Vitamin B12: Katalyse durch Cobalamin-abhängige Enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 209–247. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Shelton, AN; Seth, EC; Mok, KC; Han, AW; Jackson, SN; Haft, DR; Taga, ME Ungleichmäßige Verteilung der Cobamid- Biosynthese und -Abhängigkeit in Bakterien, vorhergesagt durch vergleichende Genomik. *ISME J.* **2019**, *13*, 789–804. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Bhushan, B.; Tomar, SK; Mandal, S. Phänotypisches und genotypisches Screening von *Lactobacilli* menschlichen Ursprungs auf Vitamin B12- Produktionspotenzial: Prozessvalidierung durch Mikroassay und UFLC. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 6791–6803. [\[CrossRef\]](#)
21. Okada, N.; Chettanachitara, C.; Daengsubha, W. Screening von Vitamin B12 produzierenden Bakterien aus Tua-Nao in Thailand. *Jpn. Int. Res. Cent. Agric. Sci.* **1995**, *2*, 49–57.
22. Ribeiro, M.; Maciel, C.; Cruz, P.; Darmancier, H.; Nogueira, T.; Costa, M.; Laranjeira, J.; Morais, RMSC; Teixeira, P. Nutzung potenzieller probiotischer Milchsäurebakterien, isoliert aus *Chlorella vulgaris*-Photobioreaktoren, als vielversprechende Vitamin-B12-Produzenten. *Lebensmittel* **2023**, *12*, 3277. [\[CrossRef\]](#)
23. Dudko, D.; Milker, S.; Holtmann, D.; Buchhaupt, M. Identifizierung von Vitamin B12 produzierenden Bakterien anhand der Anwesenheit von bluB/cobT2 Homologe. *Biotechnol. Lett.* **2023**, *45*, 563–572. [\[CrossRef\]](#)
24. Deptula, P.; Kylli, P.; Chamlagain, B.; Holm, L.; Kostianen, R.; Piironen, V.; Savijoki, K.; Varmanen, P. Die Aktivität des BluB/CobT2-Fusionsenzym enthüllt die Mechanismen, die für die Produktion der aktiven Form von Vitamin B12 durch *Propionibacterium freudenreichii* verantwortlich sind. *Microb.* **2015**, *14*, 186. [\[CrossRef\]](#)
25. Kumari, M.; Bhushan, B.; Kokkiligadda, A.; Kumar, V.; Behare, P.; Tomar, SK Vitamin B12-Biofortifizierung von Sojamilch durch optimierte Fermentation mit extrazellulären B12-produzierenden *Lactobacillus*-Isolaten menschlichen fäkalen Ursprungs. *Curr. Res. Food Sci.* **2021**, *4*, 646–654. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Raux, E.; Thermes, C.; Heathcote, P.; Rambach, A.; Warren, MJ Eine Rolle für *Salmonella typhimurium* *cbiK* in Cobalamin (Vitamin B12) und Siroheme-Biosynthese. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 3202–3212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, CMAP; Harris, HMB; Mattarelli, P.; O'Toole, PW; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. Eine taxonomische Anmerkung zur Gattung *Lactobacillus*: Beschreibung von 23 neuen Gattungen, verbesserte Beschreibung der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck 1901 und Vereinigung von *Lactobacillaceae* und *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858. [[Querverweis](#)]
28. Lenz, T.; Maxones, A.; Pichner, R.; Birringer, M. Bestimmung von Vitamin B12 in kommerziellen Pepsinpräparaten mittels Immunaффinitätschromatographie und LC-MS/MS. *Appl. Res.* **2023**, *2*, e202200112. [[CrossRef](#)]
29. Wang, M.; Asam, S.; Chen, J.; Ehrmann, M.; Rychlik, M. Produktion von vier 15N-markierten Cobalaminen durch Biosynthese unter Verwendung *Propionibacterium freudenreichii*. Vorderseite. *Mikrobiol.* **2021**, *12*, 713321. [[CrossRef](#)]
30. Lisdiyanti, P.; Kawasaki, H.; Seki, T.; Yamada, Y.; Uchimura, T.; Komagata, K. Identifizierung von aus indonesischen Quellen isolierten *Acetobacter*-Stämmen und Vorschläge für *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov. und *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2001**, *47*, 119–131. [[CrossRef](#)]
31. Cleenwerck, I.; Vandemeulebroecke, K.; Janssens, D.; Swings, J. Neuuntersuchung der Gattung *Acetobacter* mit Beschreibungen von *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. und *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2002**, *52*, 1551–1558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Es-Sbata, I.; Lakhilfi, T.; Yatim, M.; El-Abid, H.; Belhaj, A.; Hafidi, M.; Zouhair, R. Screening und molekulare Charakterisierung neuer thermo- und ethanoltoleranter *Acetobacter malorum*-Stämme, isoliert aus zwei Biomen marokkanischer Kaktusfrüchte. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2021**, *68*, 476–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rainard, P. Mammary Microbiota von Milchwiederkäuern: Fakt oder Fiktion? *Vet. Res.* **2017**, *48*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Williamson, JR; Callaway, TR; Lourenco, JM; Ryman, VE Charakterisierung der Pansen-, Stuhl- und Milchkrobiota bei laktierenden Milchkühe. Vorderseite. *Microbiol.* **2022**, *13*, 984119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gomes, RJ; Borges, MdF; Rosa, MdF; Castro-Gómez, RJH; Spinosa, WA Essigsäurebakterien in der Lebensmittelindustrie: Systematik, Eigenschaften und Anwendungen. *Food Technol. Biotechnol.* **2018**, *56*, 139–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wieme, AD; Spitaels, F.; Aerts, M.; de Bruyne, K.; van Landschoot, A.; Vandamme, P. Auswirkungen des Wachstumsmediums auf matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektren: Eine Fallstudie von Essigsäurebakterien. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 1528–1538. [[CrossRef](#)]
37. Valera, MJ; Laich, F.; González, SS; Torija, MJ; Mateo, E.; Mas, A. Vielfalt der in gesunden Weintrauben vorkommenden Essigsäurebakterien von den Kanarischen Inseln. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 105–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Yamada, Y.; Hosono, R.; Lisdiyanti, P.; Widyastuti, Y.; Saono, S.; Uchimura, T.; Komagata, K. Identifizierung von aus indonesischen Quellen isolierten Essigsäurebakterien, insbesondere von Isolat der Gattung *Gluconobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1999**, *45*, 23–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gonzalez-Garcia, R.; McCubbin, T.; Navone, L.; Stowers, C.; Nielsen, L.; Marcellin, E. Mikrobielle Propionsäureproduktion. *Fermentation* **2017**, *3*, 21. [[CrossRef](#)]
40. Amelia, R.; Philip, K.; Pratama, YE; Purwati, E. Charakterisierung und probiotisches Potenzial von Milchsäurebakterien, die aus Dadiah isoliert und in Westsumatra beprobt wurden. *Food Sci. Technol.* **2021**, *41*, 746–752. [[CrossRef](#)]
41. Malimas, T.; Thi Lan Vu, H.; Muramatsu, Y.; Yukphan, P.; Tanasupawat, S.; Yamada, Y. Systematik der Essigsäurebakterien. In *Essigsäurebakterien*; Sengun, IY, Hrsg.; Serie: Food biology series|Ein Buch eines Wissenschaftsverlags; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; S. 3–43, ISBN 9781315153490.
42. Crofts, TS; Seth, EC; Hazra, AB; Taga, ME Die Cobamid-Struktur hängt sowohl von der Verfügbarkeit niedrigerer Liganden als auch von CobT ab Substratspezifität. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1265–1274. [[CrossRef](#)]
43. Hazra, AB; Tran, JLA; Crofts, TS; Taga, ME Analyse der Substratspezifität in CobT-Homologen zeigt weitverbreitete Präferenz für DMB, den unteren axialen Liganden von Vitamin B12. *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1275–1285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sokolovskaya, OM; Mok, KC; Park, JD; Tran, JLA; Quanstrom, KA; Taga, ME Kofaktorselectivität in Methylmalonyl- Coenzym-A-Mutase, einem Modell-Cobamid-abhängigen Enzym. *mBio* **2019**, *10*, e01303-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bao, X.; Xiang, S.; Chen, J.; Shi, Y.; Chen, Y.; Wang, H.; Zhu, X. Wirkung von *Lactobacillus reuteri* auf Vitamin B12-Gehalt und Mikrobiota Zusammensetzung der Furu-Fermentation. *LWT* **2019**, *100*, 138–143. [[CrossRef](#)]
46. Kantachote, D.; Ratanaburee, A.; Hayisama-ae, W.; Sukhoom, A.; Nunkaew, T. Die Verwendung des potenziellen Probiotikums *Lactobacillus plantarum* DW12 zur Herstellung eines neuartigen funktionellen Getränks aus reifem Kokoswasser. *J. Funct. Foods* **2017**, *32*, 401–408. [[Querverweis](#)]
47. Tindjau, R.; Chua, J.-Y.; Liu, S.-Q. Die Ko-Kultivierung von *Propionibacterium freudenreichii* und *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* verbessert den Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren und Vitamin B12 in Sojamilch. *Food Microbiol.* **2024**, *121*, 104525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Chamlagain, B.; Edelmann, M.; Katina, K.; Varmanen, P.; Piironen, V. Vitamin B12 -Produktion in solubilisiertem Proteinextrakt von Bioverarbeitete Weizenkleie mit *Propionibacterium freudenreichii*. *LWT* **2024**, *192*, 115731. [[CrossRef](#)]
49. Chamlagain, B.; Deptula, P.; Edelmann, M.; Kariluoto, S.; Grattepanche, F.; Lacroix, C.; Varmanen, P.; Piironen, V. Wirkung der unteren Ligandenvorstufen auf die Vitamin-B12-Produktion durch lebensmitteltaugliche *Propionibakterien*. *LWT* **2016**, *72*, 117–124. [[CrossRef](#)]

-
50. Yassunaka Hata, NN; Surek, M.; Sartori, D.; Vassoler Serrato, R.; Aparecida Spinosa, W. Rolle von Essigsäurebakterien in Lebensmitteln und Getränken. *Lebensmitteltechnologie. Biotechnologie*. **2023**, *61*, 85–103. [\[CrossRef\]](#)
51. Landis, EA; Oliverio, AM; McKenney, EA; Nichols, LM; Kfoury, N.; Biango-Daniels, M.; Shell, LK; Madden, AA; Shapiro, L.; Sakunala, S.; et al. Die Vielfalt und Funktion von Sauerteigstarter-Mikrobiomen. *Elife* **2021**, *10*, e61644. [\[CrossRef\]](#)

Haftungsausschluss/Anmerkung des Herausgebers: Die in allen Veröffentlichungen enthaltenen Aussagen, Meinungen und Daten sind ausschließlich die der einzelnen Autoren und Mitwirkenden und nicht die von MDPI und/oder den Herausgebern. MDPI und/oder die Herausgeber lehnen jegliche Verantwortung für Personen- oder Sachschäden ab, die aus den im Inhalt erwähnten Ideen, Methoden, Anweisungen oder Produkten resultieren.