

# Vitaminbildung durch milchwirtschaftlich relevante Fermentationsmikroorganismen

Robert Sieber und Ueli Bütikofer, Agroscope Liebefeld-Posieux, Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere und Milchwirtschaft (ALP), Bern

Eingegangen 23. Dezember 2003, angenommen 24. Juni 2004

Vitamine sind für den Menschen unentbehrliche Verbindungen, auf deren Zufuhr er über die Nahrung angewiesen ist. Das gleiche gilt zum Teil ebenfalls für Tiere. Die Pflanzen sind dagegen in der Lage, Vitamine selber zu synthetisieren. Auch von einzelnen Mikroorganismen ist eine Vitaminsynthese bekannt. Bereits in den 50er Jahren wurde der Frage nachgegangen, ob die im Darm vorhandenen Mikroorganismen Vitaminlieferanten sind. Dabei war man im speziellen an der beim Säugling vorherrschenden Bifidusflora interessiert (1, 2).

Die Möglichkeit, durch den Einsatz vitaminbildender Mikroorganismen bei der Herstellung den Wert fermentierter Lebensmittel wie Fleisch, Kohl, Soja, Wein zu erhöhen, ist deshalb nicht ausser Acht zu lassen. In Sauerkraut, Randensaft (Roter Rübensaft) und Salaten, denen neben den Milchsäure- auch Propionsäurebakterien zugefügt wurden, erhöhte sich der Gehalt an Cobalamin und Folsäure (3). In einem Sojadrink-Medium bildeten Laktobazillen unterschiedliche Mengen an Vitamin K (4). Auch Bifidobakterien wie *B. infantis* und *B. longum* konnten in Sojadrink die Vitamine Niacin, Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>) und Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>) beeinflussen (5). Bei der Vergärung von Tempeh waren Stämme von *Rhizopus* sp., *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* und *Streptococcus* ssp. in der Lage, Cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>), Nikotinsäure, Thiamin,  $\beta$ -Carotin, Ergosterol, nicht aber Tocopherol, Vitamin K<sub>1</sub> und Pyridoxin (Vitamin B<sub>6</sub>) zu bilden (6, 7).

Bereits mehrfach wurde auch in fermentierten Milchprodukten im Vergleich zur Milch ein erhöhter Gehalt an einigen Vitaminen festgestellt. So berichtete *Blanc* (8) über einen höheren Gehalt an Thiamin und Riboflavin sowie Niacin in Jogurt gegenüber Milch. *Alm* (9) untersuchte verschiedene fermentierte Milchprodukte auf deren Vitamingehalt. In diesen Milchprodukten war im Vergleich zur Ausgangsmilch der Gehalt an einigen Vitaminen wie Folsäure und Thiamin erhöht und an

anderen wie Pyridoxin, Biotin und Cobalamin erniedrigt (Tabelle 1). Reddy et al. (10) hatten bereits früher in Jogurt einen höheren Gehalt an den Vitaminen Folsäure und Niacin und einen tieferen für Biotin, Pantothensäure und Cobalamin festgestellt, was Hoppner und Lampi (11) in Jogurt für Folsäure, Pantothensäure und Biotin bestätigten. Nach einer kürzlich publizierten Arbeit sank in fermentierter Milch der Cobalamingehalt während der Vergärung bis zum Zeitpunkt des Abfüllens um 15 (Filmjöl) bis 25% (Jogurt) ab (12). Zudem nahm im Verlaufe der Lagerung fermentierter Milchprodukte der Gehalt an Vitaminen sukzessive ab (9, 10, 12). So war der Cobalamingehalt beim Verfallsdatum bei Filmjöl um 26% und bei Jogurt um 33% vermindert (12). In Kefir aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch war der Gehalt an Pyridoxin und Folsäure im Vergleich zur Ausgangsmilch erhöht, Thiamin aber nur in Kefir aus Schafmilch. Dagegen nahm der Gehalt an Riboflavin, Cobalamin, Niacin, Panthothensäure und Biotin während der Säuerung ab (13).

Tabelle 1  
Veränderungen des Vitamingehaltes in fermentierten Milchprodukten gegenüber der Ausgangsmilch (9)

Vit.	Milch	Jogurt	Kefir	Buttermilch	Ropymilch	Saure Buttermilch	Acidophilusmilch	Bifidusmilch
	<i>pro L</i> <i>Prozentuale Veränderungen</i>							
Veränderungen nach Tag		11	11	11	13	1	1	13
Thiamin (B <sub>1</sub> )	0,34 mg	±	±	±	±	↑20	↑30	±
Riboflavin (B <sub>2</sub> )	1,16 mg	±	±	±	±	±	±	±
Pyridoxin (B <sub>6</sub> )	0,38 mg	±	↓15	↓15	±	±	±	±
Pantothens.	2,6 mg	↓30	±	±	±	±	±	±
Biotin	14,0 µg	↓20	↓15	↓15	±	±	±	±
Folsäure	37,0 µg	↑120	↑40	↑140	↑200	↑100	±	↑100
Cobalamin (B <sub>12</sub> )	3,1 µg	↓20	↓15	↓15	↓20	±	±	±
Niacinäq.	5,8 mg	±	±	±	±	±	±	±

↑Zunahme; ↓Abnahme; ±geringe Zu- oder Abnahme

Diese Beobachtungen zum Vitamingehalt in fermentierten Milchprodukten müssen auf die Wirkung der verwendeten Mikroorganismen zurückgeführt werden, die aber die Vitamine nicht nur neu bilden, sondern auch für ihr Wachstum verwenden (14). Im Folgenden soll deshalb abgeklärt werden, welche milchwirtschaftlich relevanten Mikroorganismen in der Lage sind, Vitamine zu bilden. Über die verschiedenen Faktoren, welche die Vitaminbildung fermentierter Milch beeinflussen, hat bereits Kneifel berichtet (15). In diesem Zusammenhang ist noch zu erwähnen, dass sich ältere Publikationen vornehmlich auf mikrobiologische Vitaminanalysen abstützten, wobei dies eher mit der Vitaminverfügbarkeit und -verwertung zu tun hat. In neuerer Zeit werden zur Vitaminbestimmung HPLC- und Radioisotopenmethoden verwendet.

## Laktobazillen

Laktobazillen kommen in der Milchwirtschaft bei der Herstellung von Sauer-  
milchprodukten und von Käse zum Einsatz.

### Folsäure

Laktobazillenstämme bilden Folsäure in unterschiedlichen Konzentrationen (16). Unter diesen fiel ein *L. helveticus*-Stamm besonders auf, während ein anderer *L. helveticus*-Stamm wie auch ein *L. acidophilus*-Stamm praktisch keine Folsäure bildeten. *L. casei* und *L. casei* ssp. *bulgaricus*-Stämme brauchen dieses Vitamin für ihr Wachstum (Tabelle 2). Nach *Crittenden et al.* (18) waren die traditionellen Joghurtstarterkulturen wie *L. helveticus* biotyp *jugurti* CSCC 2815 und 2810, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CSCC 5212, 5168 und 2505 und auch probiotische Laktobazillen wie *L. rhamnosus* CSCC 5277 und GG, *L. reuteri* CSCC 5242, *L. fermentum* CSCC 5366, *L. casei* CSCC 5203, *L. johnsonii* La-1 und *L. acidophilus* La-5 in rekonstituierter Magermilch und nach *Friend et al.* (19) drei *L. bulgaricus*-Stämme in Magermilch nicht in der Lage, Folsäure zu bilden, sondern verwendeten wie *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CSCC 5168 und die probiotischen Laktobazillen die in der Milch vorhandene Folsäure für ihr Wachstum (18). Einzig *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CSCC 2505 vermochte etwas Folsäure zu bilden, was mit den Resultaten von Sybesma et al. (16) übereinstimmt (Tabelle 2). Nach *Rao et al.* (14) war in Magermilch eine Folsäurebildung durch *L. bulgaricus* nur am Anfang der Inkubation feststellbar, nach einer Inkubation während 48 Stunden sank der Folsäuregehalt deutlich ab. Dagegen hatten diese Autoren für *L. acidophilus* ATCC 4356 in Magermilch eine Folsäurebildung nach einer Inkubation von bis zu 48 Stunden (18,8 gegenüber 7,1 µg/l in der Kontrolle) festgestellt.

Über den Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Folsäurebildung durch Laktobazillen sind einige Daten vorhanden. Nach sechsstündiger Bebrütung mit den Stämmen von *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 448 und 449 sowie *L. acidophilus* N1 und ATCC 4356 im MRS-Medium erhöhte sich die Folsäuremenge von etwa 5 auf 20 bis 25 µg/l. Danach fiel sie bis zum Ende der Bebrütung (18 h) langsam ab. Auch in rekonstituierter Magermilch bildeten diese Stämme Folsäure (Tabelle 3). Wie im Medium nahm der Gehalt dieses Vitamins während der Lagerung der fermentierten Milch von drei Wochen ab (20). Die gleichen Autoren untersuchten sodann den Einfluss von Laktose (20 g/kg) und Kalziumchlorid (0,2 g/kg) in rekonstituierter Milch auf die Folsäurebildung mit zwei *L. bulgaricus*-Keimen (21). Sie fanden nach sechs Stunden Inkubation mit dem Laktosezusatz eine vergleichbare Folsäuremenge wie mit der Kontrolle. Nach 18 Stunden Bebrütung sank diese in der Laktosegruppe um bis zu 20%, in der Kontrolle jedoch deutlich. Mit Kalziumchlorid war die Vitaminbildung mit der Kontrolle vergleichbar (Tabelle 4).

Tabelle 2  
Folatbildung durch verschiedene Laktobazillen- und Propionsäurebakterienstämme

Stamm	WB <sup>1</sup>	Ursprung	extra- zellul.	intra- zellul. Folat µg/l	Total	Lit.
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	A	HP	14	81	95	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	A	E8	9	99	108	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	A	SK110	46	69	116	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	A	MG1363	8	87	94	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	A	KB23	6	84	90	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	AC	KB23	11	245	256	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	AC	NZ 9000	9	106	116	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	AC	NZ 9010	22	269	291	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	A	Silage	14	47	62	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	A	Silage	10	53	63	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	A	Silage	5	52	57	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	A	C17	21	77	98	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	A	Ru4	16	84	100	(16)
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	A	ZK	14	65	79	(16)
<i>L. plantarum</i>	B	WCFS-1	27	18	45	(16)
<i>L. helveticus</i>	B	ATCC 10797	-1	90	89	(16)
<i>L. helveticus</i>	B	Käse	3	-1	2	(16)
<i>L. acidophilus</i>	B	Ki	0	1	1	(16)
<i>L. casei</i>	B	Käse	-45	32	-13	(16)
<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	B	ATCC 7469	-98	34	-63	(16)
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	B	Rb	12	41	54	(16)
<i>S. thermophilus</i>	A	Jogurt	25	4	29	(16)
<i>S. thermophilus</i>	A	Jogurt	23	179	202	(16)
<i>S. thermophilus</i>	A	Sprühtrockner	40	80	120	(16)
<i>Leuconostoc lactis</i>	B	B911	37	7	45	(16)
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	B	B629	33	10	44	(16)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B360	25	18	43	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B363	82	-20	61	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B365	0	41	41	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B367	73	-2	70	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B369	78	-7	72	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B370	24	-6	17	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B371	73	-6	67	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B372	79	-14	64	(17)
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>sbermanii</i>		B373	93	-27	78	(17)
<i>Propionibacterium</i> sp.		B359	31	-22	9	(17)
<i>Propionibacterium</i> sp.		B366	13	16	29	(17)

<sup>1</sup>WB=Wachstumsbedingungen: A inkubiert im M17-Medium; B inkubiert im MRS-Medium; C aerob gewachsen

Tabelle 3

Folsäureakkumulierung durch Milchsäurebakterien nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C und Folsäurestabilität in fermentierter Milch nach dreiwöchiger Lagerung bei 4°C (20)

Stamm	Folsäuregehalt (mg/l)			
	am Anfang	nach 6 Std. Wachstum	frisch	nach 3 W. Lagerung
<i>L. acidophilus</i> N1	20,7±0,4	63,9±5,2	63,5±4,3	41,8±1,2
<i>L. acidophilus</i> 4356	22,4±1,8	53,9±4,6	52,8±2,5	46,5±1,5
<i>L. bulgaricus</i> 449	22,8±1,4	62,8±2,1	65,2±2,4	39,8±1,6
<i>L. bulgaricus</i> 448	22,9±3,9	68,5±1,8	71,6±3,9	53,2±3,1
<i>S. thermophilus</i> 573	22,8±1,5	46,7±5,0	47,8±4,7	38,7±2,1
<i>S. thermophilus</i> MC	23,3±2,1	59,6±2,3	58,2±1,0	51,1±0,1
<i>B. longum</i> B6	22,2±1,7	99,2±3,8	98,0±5,8	74,3±1,5
<i>B. longum</i> ATCC 15708	22,5±3,9	75,8±6,5	77,1±3,0	57,5±2,9

Tabelle 4

Einfluss von Laktose und Kalziumchlorid auf die Folsäurebildung von Laktobazillen und Streptokokken in rekonstituierter Magermilch (21)

Stamm	Inkubation 6 h			Inkubation 18 h		
	Kontrolle + Laktose + CaCl <sub>2</sub>			Kontrolle + Laktose + CaCl <sub>2</sub>		
	µg/l					
<i>L. bulgaricus</i> 449	62,8	64,5	56,1	22,8	55,0	14,9
<i>L. bulgaricus</i> 448	68,5	70,7	53,8	22,8	58,8	21,2
<i>S. thermophilus</i> 19258	46,7	50,1	48,6	19,4	57,9	27,1
<i>S. thermophilus</i> MC	59,6	62,2	52,1	45,2	50,4	29,6

### Vitamin K

In einer neueren Arbeit von japanischen Forschern (4) wurde über die Synthese von Vitamin K durch Laktobazillen berichtet. Diese Stämme wurden in rekonstituierter Magermilch inkubiert und waren praktisch nicht in der Lage, Vitamin K zu bilden (Tabelle 5).

Tabelle 5  
**Vitamin-K<sub>2</sub>-Bildung durch Milchsäurebakterien (4)**

Spezies oder Subspezies	Stamm <sup>1</sup>	K <sub>2</sub> /g lyophil. Zellen <sup>2</sup>	K <sub>2</sub> /g Milch <sup>3</sup>	K <sub>2</sub> /g Sojadrink <sup>4</sup>
nmol				
<i>L. acidophilus</i>	YIT 0168	nn		
<i>L. casei</i>	Shirota	nn		
<i>L. mali</i>	YIT 0243	11		
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>	YIT 2002	110		
	YIT 2007	362/348		0,99
	YIT 2011	297/534	2,19	2,58
	YIT 2012	600/467	0,70	1,51
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	YIT 2003	53		
	YIT 2008	150		
	YIT 2016	259		
	YIT 2027	230/717		0,75
	YIT 2052	125		
<i>Lc. plantarum</i>	YIT 2061	30		
<i>Lc. raffinolactis</i>	YIT 2062	648		
<i>S. thermophilus</i>	YIT 2001	nn		
<i>B. bifidum</i>	Yakult	nn		
<i>B. breve</i>	Yakult	nn		
<i>Leuc. lactis</i>	YIT 3001	44/173		2,60
<i>Leuc. mesenteroides ssp. cremoris</i>	YIT 3003	123		
<i>Leuc. mesenteroides ssp. dextranicum</i>	YIT 3028	nn		
<i>Ent. faecalis</i>	YIT 2031	194		

<sup>1</sup>Registrierungsnummer der Kulturensammlung des Yakult Central Institute for Microbial Research, Tokyo

<sup>2</sup>TLC-/HPLC-Bestimmung; nn=nicht nachgewiesen

<sup>3</sup>fermentierte, rekonstituierte Magermilch-Kultur

<sup>4</sup>fermentierte Sojadrink-Medium-Kultur

## Cobalamin

Ein *L. reuteri*-Stamm (CRL 1098), der aus Sauerteig isoliert wurde – *L. reuteri* wurde auch schon zur Herstellung fermentierter Milchprodukte eingesetzt – ist in der Lage, Cobalamin zu bilden. Dies konnte aus dem Wachstum von *L. delbrueckii ssp. lactis* (ATCC 7830) in einem Cobalamin-freien Medium, das mit einem Zellextrakt von *L. reuteri* supplementiert wurde, beobachtet werden. Letzterer bildete etwa 0,5 mg Cobalamin pro Liter (22). Für die Biosynthese dieses Vitamins sind in *L. reuteri* mindestens fünf Gene verantwortlich (23). Rao *et al.* (14) stellten zwar fest, dass *L. acidophilus* nicht in der Lage ist, Cobalamin zu bilden, doch zeigte sich nach einer Inkubation von 24 und 48 Stunden in Magermilch eine Cobalamingehalt von 5,3 und 4,6 µg/l im Vergleich zur Kontrolle von 3,7 und 3,0 µg/l. Dagegen verbrauchte *L. bulgaricus* das Cobalamin für sein Wachstum, was auch von Friend *et al.* (19) beobachtet wurde. Nach Sato *et al.* (24, 25) sank der Cobalamingehalt während der Fermentation von Milch und Molke durch die Wirkung von *L. helveticus* B-1 ab, wobei eine unidentifizierte Cobalaminverbindung aus den Zellen nicht extrahiert werden konnte.

## Andere Vitamine

Die Inkubation dreier *L. bulgaricus*- wie auch von *S. thermophilus*-Stämmen in Magermilch verminderte den Gehalt an Biotin und Niacin im Vergleich zu unfermentierter Milch (19).

## Streptokokken

Streptokokken werden bei der Herstellung von Sauermilchprodukten und Käse verwendet.

## Folsäure

Wie bei den Laktobazillen existieren auch bei den Streptokokken Stämme mit unterschiedlicher Folsäurebildung (16, 20). So unterschied sich bei zwei aus Jogurt isolierten Streptokokkenstämmen die totale Folsäuremenge um den Faktor sechs (Tabelle 2). In der Studie von *Lin* und *Young* (20) wurden neben den Laktobazillen noch zwei Streptokokkenstämmen untersucht, jedoch in einem anderen Medium (M17-Medium). Auch in diesem Falle erhöhte sich nach sechsständiger Inkubation der Folsäuregehalt von etwa 5 auf 16 bis 18 µg/l und fiel dann nach 18 Stunden auf etwa 10 bis 12 µg/l ab. Ebenso konnte in rekonstituierter Milch eine deutliche Folsäurebildung und während der dreiwöchigen Lagerung eine Verminderung nachgewiesen werden (Tabelle 3). Zu einer deutlichen Folsäurebildung von bis zu über 100% im Vergleich zu unfermentierter Magermilch waren drei *L. bulgaricus*-Stämme in der Lage (19). Wie bei den Laktobazillen wurde auch bei den Streptokokken der Einfluss von Laktose und Kalziumchlorid auf die Folsäurebildung untersucht (21). Wiederum war mit dem Laktosezusatz die Abnahme der Folsäure nach 18ständiger Bebrütung geringer als bei der Kontrolle oder mit dem Kalziumchloridzusatz (Tabelle 4). In Magermilch erhöhte sich der Folsäuregehalt nach einer Inkubation mit *S. thermophilus* (17,7 µg/l) um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (7,1 µg/l) und schwankte im Verlauf von fünf Tagen zwischen 15,4 und 25,0 µg/l (14).

## Vitamin K

Auch Streptokokken wurden in bezug auf eine Synthese von Vitamin K überprüft (4). Diese Stämme wurden in rekonstituierter Magermilch oder in einem Sojadrink-Medium gehalten und es zeigte sich je nach Stamm eine unterschiedliche Vitamin-K-Bildung (Tabelle 5).

## Cobalamin

Wie mit *L. acidophilus* stellten *Rao et al.* (14) auch bei *S. thermophilus* fest, dass dieser Keim nicht in der Lage ist, in Magermilch Cobalamin zu bilden, doch zeigte sich nach einer Inkubation von 24 und 48 Stunden ein Cobalamingehalt von 6,0 und 3,7 µg/l im Vergleich zur Kontrolle von 3,7 und 3,0 µg/l. Nach *Friend et al.* (19) verminderte sich der Cobalamingehalt in mit *S. thermophilus* inkubierter Magermilch um über 30%.

## Lactococcus und Leuconostoc

Nach Sybesma *et al.* (26) erwiesen sich verschiedene *Lactococcus (Lc.) lactis* ssp. *cremoris*- und *Lc. lactis* ssp. *lactis*-Stämme als wirkungsvolle Folsäurebildner (Tabelle 2). Die höchste Menge bildete ein anaerob wachsender *Lc. lactis*-Stamm, dessen Laktatdehydrogenase-System defekt war. *Leuconostoc lactis* B911 und *Leuconostoc paramesenteroides* B629 bildeten vor allem extrazelluläre Folsäure (16). Bei einem gentechnisch modifizierten *Lc. lactis*-Stamm konnte die Folsäurebildung erhöht werden (siehe unten) (26, 27). Eine Einzelkultur von *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* wie auch von *Lc. lactis* ssp. *cremoris* bildeten in fermentierter Milch und Rahm sowie Buttermilch teilweise Thiamin, Pyridoxin, Fol- und Pantothen-säure, während Riboflavin und Cobalamin reduziert wurden (28).

Nach Morishita *et al.* (4) bildeten Laktobazillen, Streptokokken und Bifidobakterien in rekonstituierter Magermilch oder in einem Sojadrink-Medium praktisch kein Vitamin K im Gegensatz zu Laktokokken und Leuconostoc, die dazu in der Lage waren. Dabei zeigte sich je nach Stamm eine unterschiedliche Vitamin-K-Bildung. Unter den untersuchten Mikroorganismen bildeten ein *Lc. lactis* ssp. *cremoris*- und ein *Lc. raffinolactis*-Stamm am meisten Vitamin K (Tabelle 5).

## Bifidobakterien

Bifidobakterien gelangen bei der Herstellung von Sauermilchprodukten wie auch von Käse zum Einsatz.

Nach Liebscher (1) bildeten die damals noch als *Lactobacillus (L.) bifidus* (heute *Bifidobacterium*) bezeichneten Stämme Thiamin, Riboflavin, Nikotinsäure, Pantothen-säure, Pyridoxin, Folsäure und Cobalamin, während nach Peter (2) von *L. bifidus* nur Thiamin, Nikotinsäure, Pyridoxin und Folsäure extrazellulär nachgewiesen werden konnte. Auch fehlte es nicht an Versuchen, bei Versuchstieren durch die Verabreichung von Humanmilch und bei Menschen durch Oligosaccharide die Bifidobakterienflora im Darm zu beeinflussen (29–31). Im ersten Falle gelang es, den Folsäurestatus zu erhöhen (29). Mit der Vitaminbildung verschiedener Bifidobakterien-Stämme beschäftigten sich bereits mehrere Arbeitsgruppen (4, 5, 18, 20, 32, 33).

## Folsäure

24 Bifidobakterien-Stämme menschlichen Ursprungs (vier *B. bifidum*, fünf *B. infantis*, fünf *B. breve*, fünf *B. adolescentis* und fünf *B. longum*) zeigten in einem Hefeextrakt-Medium eine unterschiedliche Folsäurebildung: deutlich mehr Folsäure durch die *B. bifidum*- und *B. infantis*- als durch die *B. breve*-, *B. longum*- und *B. adolescentis*-Stämme (32). Probiotische Bifidobakterien wie *Bifidobacterium* sp. CSCC 5128, *B. lactis* CSCC 5127, 5123 und Lafti B94, *B. animalis* CSCC 1941, *B. infantis* CSCC 5187, *B. breve* CSCC 5181 sind zu den Folsäurebildnern zu zählen. Der letztere Stamm bildete am meisten Folsäure, *B. animalis* und *lactis* verdoppelten den Folsäuregehalt in Magermilch (18). Im MRS-Medium bildeten nach sechsständiger Inkubation *B. longum* B6 und ATCC 15708 mehr Folsäure (30 bis



35 µg/l) als die bereits erwähnten Laktobazillen- und Streptokokken-Stämme. Auch in rekonstituierter Magermilch war das gleiche festzustellen, aber die Bifidobakterien-Stämme bildeten darin nach 6 Stunden mit 70 bis 100 µg/l deutlich mehr Folsäure als im MRS- oder M17- Medium. In fermentierter Milch war der Folsäuregehalt nach sechsstündiger Bebrütung mit den Bifidobakterien etwa gleich wie in rekonstituierter Milch. Während einer daran anschließenden Lagerung bei 4 °C verringerte er sich kontinuierlich (Tabelle 3). Im Vergleich zu den anderen verwendeten Bakterien bildeten die Bifidobakterien am meisten Folsäure (20).

### **Thiamin, Pyridoxin, Nikotinsäure**

In der Arbeit von *Deguchi et al.* (32) wurde neben der Folsäure auch die Bildung von Thiamin, Pyridoxin und Nikotinsäure durch Bifidobakterien-Stämme untersucht. Die *B. bifidum*- und *B. infantis*-Stämme wiesen eine deutlich höhere Thiaminbildung auf als die *B. breve* und *B. longum*-Stämme, während die *B. adolescentis*-Stämme praktisch kein Thiamin bildeten. Pyridoxin wurde von allen erwähnten Bifidobakterien-Stämme akkumuliert, einzig bei den *B. breve*-Stämmen war es nur etwa die Hälfte wie bei den anderen Bifidobakterien-Stämmen. Bei der Bildung von Nicotinsäure unterschieden sich die *B. bifidum*- und *B. infantis*-Stämme von den übrigen Bifidobakterien-Stämmen (*B. breve*, *longum*, *adolescentis*). Die ersteren bildeten mehr als 1 mg/kg Nicotinsäure, während die übrigen etwa 0,2 bis 0,6 mg/kg bildeten.

### **Vitamin K**

Nach einer Arbeit von japanischen Forschern (4) konnten *B. bifidum* und *breve* kein Vitamin K synthetisieren (Tabelle 5).

### **Biotin**

Fünf verschiedene Bifidobakterien-Stämme (*B. bifidum* A234-4, *B. adolescentis* M101-4, *B. longum* M101-2, *B. breve* I-53-8, *B. infantis* I-10-5) zeigten nach *Noda et al.* (33) ein starkes Wachstum auf einem modifizierten BL-Medium und eine Biotinbildung von 0,13 bis 0,33 µg/l. In einem Hefeextrakt-Medium war das Wachstum reduziert und die Biotinbildung betrug nur 0,03 bis 0,07 µg/l. Mit diesem Medium wurde der Einfluss von über 50 verschiedenen Kohlenstoffquellen auf das Wachstum und die Biotinbildung des Stammes *B. bifidum* untersucht. Dabei zeigten vor allem der Einsatz von Glukose, Laktulose, Isomalto- und Fruktooligosacchariden eine vermehrte Biotinbildung (Tabelle 6). Im weiteren wurden die oben erwähnten fünf Bifidobakterien-Stämme auf den Einfluss verschiedener Oligosaccharide untersucht. Dabei zeigte wiederum der Stamm *B. bifidum* mit dem Isomaltooligosaccharid die stärkste Biotinbildung (Tabelle 7).

Tabelle 6

**Biotinbildung durch *Bifidobacterium bifidum* A234-4 in Abhängigkeit der verwendeten Kohlenstoffquelle (33)**

	<i>C-Quelle</i>	<i>Wachstum</i> ( <i>OD</i> <sub>610nm</sub> )	<i>Biotin</i> µg/l
Polysaccharide	Ohne Zusatz	0,065	–
	Stärke	0,163	5,9
Oligosaccharide	Methylcellulose	0,150	31,9
	Isomaltooligosaccharid	0,590	66,7
Disaccharide	Fruktooligosaccharid	0,530	43,7
	D-Saccharose	0,460	–
Hexosen	D-Laktose	0,445	–
	Laktulose	0,400	50,4
	D-Glukose	0,453	80,6
Zuckeralkohole	D-Mannose	0,389	20,3
	Glycerin	0,260	9,4
	D-Arabitol	0,112	11,4
	Inositol	0,152	9,6
	Sorbitol	0,114	9,7
	Maltitol	0,207	8,5
Uronsäuren	D-Glukuronsäure	0,197	8,7
	L-Galakturonsäure	0,127	9,5
Glykoside	Amygdalin	0,166	11,9
	Salicin	0,202	8,5

Tabelle 7

**Biotinbildung durch verschiedene Bifidobakterien-Stämme in Abhängigkeit der verwendeten Oligosaccharide (33)**

<i>Oligosaccharide</i>	<i>B.bifidum</i> mg/l	<i>B.adolescentis</i>	<i>B.longum</i>	<i>B.infantis</i>	<i>B.breve</i>
Maltotriose	9,1	–	19,4	1,7	0,9
Maltotetraose	16,0	7,4	23,9	13,5	23,8
Isomaltooligosaccharid	158,0	27,4	–	–	–
Fruktooligosaccharid	10,8	–	43,4	15,4	–
Galaktooligosaccharid	9,6	37,0	3,8	13,8	36,9

### *Andere Vitamine*

Über die Bildung weiterer Vitamine durch Bifidobakterien sind unseres Wissens keine Daten vorhanden.

### **Propionsäurebakterien**

Propionsäurebakterien werden bei der Herstellung von Käse, im speziellen von Emmentaler, eingesetzt.

### *Folsäure*

*Hugenholtz et al.* (17) berichteten über die Folsäurebildung durch verschiedene Propionsäurebakterien. Sie stellten bei je einem Stamm von *P. thoenii*, *acidipropio-*

*nici*, *jensenii* sowie bei neun *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*- und zwei Propionsäurebakterien-Stämmen eine gesamt Folatproduktion von 9 bis 78 µg/l fest. Dabei bildeten diese Stämme intrazellulär zwischen 0 und 93 µg/l und extrazellulär zwischen -27 und 41 µg/l. (Tabelle 2). Dies deutet daraufhin, dass die Mehrzahl dieser Stämme Folsäure aus dem Medium aufnehmen. Durch die Verwendung von Propionsäurebakterien in rekonstituierter Milch, Kefirmilch, Streptokokken-fermentierter und Acidophilus-Milch erhöhte sich der gesamte Folsäuregehalt von 20 auf 38, von 50 auf 274, von 38 auf 66 und von 42 auf 65 µg/l (34).

### Cobalamin

Von den drei Mikroorganismen *Pseudomonas denitrificans*, *Bacillus megaterium* und *Propionibacterium* ist bekannt, dass sie für die kommerzielle Herstellung von Cobalamin verwendet werden (35, 36). Die ersten Beobachtungen zur Cobalaminbildung durch Propionsäurebakterien gehen auf russische Forscher zurück (zitiert nach 34) und wurden durch Arbeiten von Karlin (37, 38) bestätigt. In Kefir, dem nach 24 Stunden eine *P. shermanii*-Kultur zugegeben wurde, erhöhte sich nach zweitägiger Inkubation der Cobalamingehalt von 1,1 auf 64 µg/l (37). In rekonstituierter Vollmilch und Kefirmilch, die beide mit *P. shermanii* fermentiert wurden, konnte eine 54 resp. 28fache Anreicherung des Cobalamins festgestellt werden, während in mit Streptokokken fermentierter Milch, Jogurt, Acidophilus- und Bifidus-Milch unter gleichzeitiger Verwendung von Propionsäurebakterien nur dreibis sechsmal mehr Cobalamin gefunden wurde (34). Der Einsatz von *Propionibacterium shermanii*-Stämmen bei der Herstellung von Edamer und Tilsiter Käsen (39) wie auch von Edamer-ähnlichen Käsen (40) erhöhte den Cobalamingehalt im ersten Falle um über 80% (Tabelle 8) und im zweiten um etwa das Doppelte. Dabei zeigte sich einmal mehr, dass sich die eingesetzten Stämme in ihrem Vermögen unterscheiden, Cobalamin zu bilden.

Tabelle 8  
Beeinflussung des Cobalamingehaltes von Edamer und Tilsiter Käse durch den Einsatz von Propionsäurebakterien (39)

Käse	Zeitpunkt (Mt)	Edamer mg/kg	Zunahme in %	Tilsiter mg/kg	Zunahme in %
Kontrolle	0	15,0		17,4	
	3	22,8	41,0	24,6	32,2
<i>P. shermanii</i> I	0	16,1		18,0	
	3	28,8	49,5	27,7	45,0
<i>P. freudenreichii</i> 3	0	12,4		15,7	
	3	27,0	87,7	25,9	47,4
<i>P. freudenreichii</i> 13	0	13,8		17,6	
	3	25,8	51,2	26,7	36,1

Propionsäurebakterien bildeten Cobalamin intrazellulär und unter anaeroben Bedingungen und schieden dabei Propion- und Essigsäure aus, wobei speziell die Propionsäure deren Wachstum hemmte. Sie konnten aber unter Sauerstoffbedingungen ohne die Bildung von Propionsäure wachsen. So bildete *P. freudenreichii* IFO 12424 unter anaeroben Bedingungen 4,64 mg Cobalamin/l und bei Sauerstoffkonzentrationen von 1, 2 und 5 mg/l praktisch die gleiche Cobalaminkonzentration, während sich der Vitamingehalt bei unterschiedlicher Sauerstoffzufuhr auf 9,54 mg/l erhöhte (41).

## Enterokokken

*Enterococcus faecalis* war in der Lage, Vitamin K zu bilden (Tabelle 5) (4) und *Enterococcus faecium* CSCC 5140 Folsäure (18). Nach *Sybesma et al.* (16) waren Enterokokken, die aus Termitendarm isoliert wurden, auf Folsäure angewiesen.

## Starterkulturen

Zum Einfluss von zwei und mehr Mikroorganismen in einer Kultur, Vitamine zu bilden, liegen nur einige Angaben vor (12, 14, 28, 42, 43). Mit acht Starterkulturen wurde Jogurt hergestellt und das Vorkommen der Vitamine Thiamin, Riboflavin, Pyridoxin, Cobalamin, Nikotin-, Fol-, Pantothensäure und Biotin erfasst. Zwei Kulturen bildeten zwischen 30 und 40 % mehr Thiamin als in der entsprechenden Milch, von vier Kulturen eine etwa 60 % und drei über 120 % mehr Pyridoxin, eine Kultur zwischen 70 und 80 % mehr Folsäure und zwei Kulturen etwa 30 und gegen 80 % mehr Biotin. Eine Inkubation der Milch mit zwei Kulturen bei 42 °C während drei bis vier Stunden führte zu einer höheren Folsäurebildung und zu einer geringeren an Thiamin und Nikotinsäure als eine solche bei 30 °C während 14 bis 16 Stunden (42). Die gleiche Arbeitsgruppe (43) überprüfte 47 verschiedene handelsüblich erhältliche Starterkulturen zur Herstellung von Jogurt, jogurtähnlichen Produkten (enthaltend *L. acidophilus* und/oder Bifidobakterien) und Kefir auf deren Fähigkeit, Vitamine zu bilden. Bei etwa drei Viertel der Starterkulturen reicherten sich das Thiamin um 20 bis 60 % und das Pyridoxin um 20 bis 75 % an. Dagegen wurden Cobalamin von allen Kulturen, Riboflavin und Folsäure von zwei Drittel der Kulturen verbraucht. Nicotinsäure blieb praktisch unberührt. Eine Kultur bildete beinahe 200 % Thiamin, zwei Kulturen zwischen 50 und 75 % Riboflavin, eine ungefähr 50 % Nicotinsäure, zwei andere mehr als 100 % und vier Kulturen vom gleichen Hersteller zwischen 75 und 85 % Folsäure. 14 mesophile Misch-Starterkulturen, bestehend aus *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* oder *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, wurden zur Herstellung fermentierter Milch und Rahm sowie Buttermilch eingesetzt. Im Vergleich zur Milch wurden die Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, Folsäure und Panthothensäure gebildet, während Riboflavin und Nikotinsäure konstant blieben und Cobalamin reduziert wurde (28). Diese Beobachtung des Abbaus von Cobalamin wurde auch bei der Herstellung von Jogurt resp. Filmjölck mit *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* wie

auch eine Mischung von *Lactococcus*-Stämmen bestätigt (12). Im Verlaufe der Inkubation von *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* in Magermilch sank der Folsäuregehalt sukzessive ab und war nach fünf Tagen Lagerung nicht mehr nachweisbar. Mit diesen beiden Mikroorganismen konnte Cobalamin bereits nach einer Inkubation von 8 Stunden nicht mehr gefunden werden (14).

### Zusatzkulturen

Untersuchungen an Schweizer Käse ergaben in handelsreifem Tilsiter, Gruyère und Sbrinz Thiaminkonzentrationen im Bereich von 0,17 bis 0,21 mg/kg und in Emmentaler unterhalb von 0,02 mg/kg (unpublizierte Daten). Die Vermutung lag deshalb nahe, dass die bei der Herstellung von Emmentaler Käse zugesetzten Propionsäurebakterien für die Verminderung von Thiamin verantwortlich seien. In einem Käsereiversuch wurden bei Appenzeller-Käse vier Varianten (ohne Zusatzkultur, mit *L. casei*, mit Propionsäurebakterien und mit einem Gemisch der beiden Kulturen) hergestellt. In allen vier Varianten nahm der Gehalt an Thiamin bis zum Alter von 49 Tagen konstant zu (Abbildung 1). In den beiden Varianten ohne und mit Zusatz von *L. casei* blieb der Gehalt an Thiamin bis zum Alter von 90 Tagen nahezu konstant. In den beiden Varianten mit Propionsäurebakterien nahm dagegen der Gehalt bis zu 90 Tagen kontinuierlich ab.

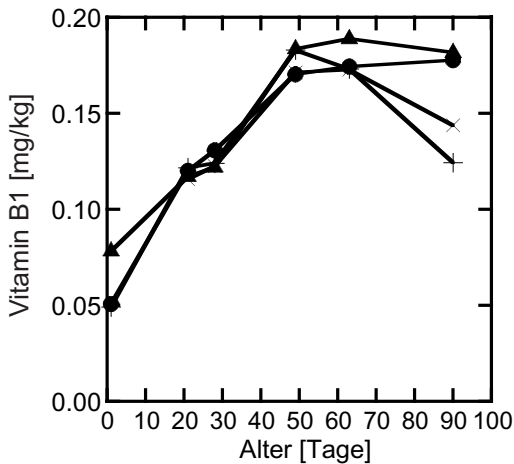


Abbildung 1 Veränderung des Thiamingehaltes von Appenzeller Käse während der Reifung mit verschiedenen Zusatzkulturen; ▲=ohne Zusatzkultur; ●=mit *L. casei*; +=mit Propionsäurebakterien; ×=mit Propionsäurebakterien und *L. casei*

## **Erhöhte Vitaminbildung durch gentechnologisch modifizierte Mikroorganismen**

Gentechnisch modifizierte Mikroorganismen lassen sich einsetzen, damit der Vitamingehalt eines fermentierten Lebensmittels erhöht werden kann, sofern die für die Vitaminbildung verantwortlichen Gene bekannt sind. Dass dies möglich ist, wurde kürzlich am Beispiel der Folsäurebildung durch *Lc. lactis* aufgezeigt (26). Im Stamm MG1363 wurden die fünf Gene gefunden, die an der Folsäurebiosynthese, vom GTP ausgehend, in folgender Reihenfolge beteiligt sind<sup>1</sup>: *folE* kodiert die GTP-Cyclohydrolase I, *folB* die Neopterinaldolase, *folKE* die 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridin Pyrophosphokinase, *folP* die Dihydropteroatsynthase, *folC* die Folatsynthase, *folA* die Dihydrofolatreduktase und *folC* die Folylpolyglutamatsynthetase. Von diesen wurde das Gen *folKE* im *Lc. lactis* überexprimiert und damit eine beinahe zehnfach erhöhte extrazelluläre und eine dreifach erhöhte gesamte Folatproduktion festgestellt, während sich letztere durch die Überexprimierung von *folA* um das Zweifache verminderte. Wurden *folKE* und *folC* kombiniert, führte dies zu einer intrazellulären Akkumulierung der Folsäure (26). Dabei wurden durch die Überexprimierung von *folC* die Polyglutamylfolat-Enden von normalerweise 4, 5 und 6 auf maximal 12 Glutamatreste erhöht (27). Der extrazelluläre Teil zeichnet sich durch kurze Polyglutamylfolat-Enden, also Monoglutamylfolat, aus (26). Die Bioverfügbarkeit dieser letzteren Substanz ist höher als diejenige von Polyglutamylfolaten (44).

## **Schlussfolgerungen**

Die verschiedenen durchgeführten Arbeiten zeigen auf, dass eine Bildung verschiedener Vitamine durch in der Milchwirtschaft eingesetzte Mikroorganismen möglich ist. Bei den davon betroffenen Vitaminen handelt es sich hauptsächlich um Folsäure und Cobalamin, in geringerer Masse auch um Vitamin K. Die dafür verantwortlichen Mikroorganismen sind Laktobazillen, Laktokokken, Bifido- und Propionsäurebakterien. Am vielversprechendsten ist die Folsäurebildung durch *Lc. lactis* ssp. *cremoris*- und *lactis*-Stämme wie auch die Folsäure- und Cobalaminbildung durch Propionsäurebakterien. Von *Sybesma et al.* (16) wird festgehalten, dass durch die Verwendung spezifisch ausgewählter hoch-folat-produzierender Stämme als Teil von Starterkulturen und in Kombination mit spezifischen Wachstumsbedingungen und mit den Methoden des «metabolic engineering» der gegenwärtige Folsäureanteil von Joghurt von 10 bis 20% an der täglichen mittleren Zufuhr substantiell erhöht werden könnte. Von *Hugenholtz* und *Smid* (17) wird in diesem Zusammenhang von einer Folsäurezufuhr von 100% gesprochen, die durch die Anwendung solcher Starterbakterien bei der Herstellung neuartiger fermentierter Milchprodukte erreicht werden könnten.

Der grosse Vorteil der Verwendung solcher vitaminbildender Mikroorganismen bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel liegt darin, dass es sich dabei um lebensmittelunbedenkliche, sog. food-grade Stämme handelt und dass diese Mikro-

organismen Vitamine im Lebensmittel selber produzieren können. Eine ausreichende Versorgung an Folsäure hat für die Ernährungswissenschaft insofern eine grosse Bedeutung (45), weil dadurch dem Auftreten von Neuralrohrdefekten bei Neugeborenen vorgebeugt werden kann (46). Im weiteren wird der Folsäure auch ein Schutz gegenüber verschiedenen Krebsformen zugesprochen (47). Auch kann dieses Vitamin einen hohen Homocysteingehalt im Blut beeinflussen (48) und damit auch koronaren Herzkrankheiten vorbeugen (49, 50).

Diese Übersicht zeigt, dass es durchaus möglich ist, in fermentierten Lebensmitteln durch den Einsatz ausgewählter Mikroorganismen den Gehalt an gewissen Vitaminen zu erhöhen. Nach Untersuchungen von *Eldmadfa et al.* (51) wurde jedoch bei erwachsenen gesunden Menschen durch den Verzehr eines probiotischen Joghurt der Vitamin-B<sub>1</sub>-, B<sub>2</sub>- und B<sub>6</sub>-Status nicht verändert.

## Zusammenfassung

Vitamine sind essentielle Nährstoffe in der menschlichen Ernährung. Zu einer verbesserten Versorgung können auch Lebensmittel, die mit Mikroorganismen hergestellt wurden, beitragen. Am Beispiel der fermentierten Milch wird hier gezeigt, welche Mikroorganismen an einer Bildung von Vitaminen beteiligt sind. *Lc. lactis* ssp. *cremoris*- und *lactis*-Stämme können in fermentierten Lebensmitteln den Gehalt an Folsäure und Propionsäurebakterien an Folsäure und Cobalamin erhöhen.

## Résumé

Les vitamines sont des nutriments essentiels dans la nutrition humaine. Les aliments qui sont produits avec des microorganismes peuvent contribuer à un ravitaillement amélioré. L'exemple du lait fermenté montre quels microorganismes participent à une formation des vitamines. Des souches du *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *lactis* peuvent élever le contenu de l'acide folique dans les aliments fermentés et les bactéries propioniques celui-ci de l'acide folique et du cobalamine.

## Summary "Vitamin formation through microorganisms used in fermented dairy products"

Vitamins are essential nutrients in the human diet. Foods fermented with microorganisms may contribute to an improved supply. The example of fermented milk shows which microorganisms are capable of producing vitamins. Strains of *Lc. lactis* ssp. *cremoris* and *lactis* can increase the content of folic acid and propionibacteria that of folic acid and cobalamin.

## Key words

Fermented milk, vitamin, formation, microorganism, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, bifidobacteria, propionibacteria, *Lactococcus*, *Leuconostoc*

## Literatur

- 1 *Liebscher S.*: Sind die im Darm des mit Muttermilch ernährten Säuglings vorherrschenden Bifidusbakterien als nützliche Vitaminlieferanten für den Säuglingsorganismus anzusehen? *Z. Kinderheilkunde* **85**, 265–276 (1961)
- 2 *Peter A.*: Die Bildung von extracellulär nachweisbaren B-Vitaminen durch *Lactobacillus bifidus*, *Escherichia coli* und *Aerobacter aerogenes*. *Vitamine Hormone* **8**, 421–430 (1960)
- 3 *Babuchowski A., Laniewska-Moroz L. and Warminska-Radyko I.*: Propionibacteria in fermented vegetables. *Lait* **79**, 113–124 (1999)
- 4 *Morishita T., Tamura N., Makino T. and Kudo S.*: Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **82**, 1897–1903 (1999)
- 5 *Hou J.W., Yu R.C. and Chou C.C.*: Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Res. Int.* **33**, 393–397 (2000)
- 6 *Denter J. and Bisping B.*: Formation of B-vitamins by bacteria during the soaking process of soybeans for tempe fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **22**, 23–31 (1994)
- 7 *Denter J., Rehm H.J. and Bisping B.*: Changes in the contents of fat-soluble vitamins and provitamins during tempe fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **45**, 129–134 (1998)
- 8 *Blanc B.*: Der Wert der Sauermilchprodukte in der modernen Ernährung. *Schweiz. Milchzeitung* **99**, 463–465 (1973)
- 9 *Alm L.*: Effect of fermentation on B-vitamin content of milk in Sweden. *J. Dairy Sci.* **65**, 353–359 (1982)
- 10 *Reddy K.P., Shabani K.M. and Kulkarni S.M.*: B-complex vitamins in cultured and acidified yogurt. *J. Dairy Sci.* **59**, 191–195 (1976)
- 11 *Hoppner K. and Lampi B.*: Total folate, pantothenic acid and biotin content of yogurt products. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.* **23**, 223–225 (1990)
- 12 *Arkbage K., Wittböft C., Fondén R. and Jägerstad M.*: Retention of vitamin B<sub>12</sub> during manufacture of six fermented dairy products using a validated radio protein-binding assay. *Int. Dairy J.* **13**, 101–109 (2003)
- 13 *Kneifel W. and Mayer H.K.*: Vitamin profiles of kefir made from milks of different species. *Int. J. Food Sci. Tech.* **26**, 423–428 (1991)
- 14 *Rao D.R., Reddy A.V., Pulusani S.R. and Cornwell P.E.*: Biosynthesis and utilization of folic acid and vitamin B<sub>12</sub> by lactic cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* **67**, 1169–1174 (1984)
- 15 *Kneifel W.*: Abbau und Synthese von Vitaminen während der Fermentation von Sauermilchprodukten. *Milchwirt. Berichte Wolfpassing Rotholz*, 110–115 (99) (1989)
- 16 *Sybesma W., Starrenburg M., Tijsseling L., Hoefnagel M.H. and Hugenholtz J.*: Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* **69**, 4542–4548 (2003)
- 17 *Hugenholtz J., Hunik J., Santos H. and Smid E.*: Nutraceutical production by propionibacteria. *Lait* **82**, 103–112 (2002)
- 18 *Crüttenden R.G., Martinez N.R. and Playne M.J.*: Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 217–222 (2003)
- 19 *Friend B.A., Fiedler J.M. and Shabani K.M.*: Influence of culture selection on the flavor, antimicrobial activity,  $\beta$ -galactosidase and B-vitamins of yogurt. *Milchwissenschaft* **38**, 133–136 (1983)
- 20 *Lin M.Y. and Young C.M.*: Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **10**, 409–413 (2000)
- 21 *Lin M.-Y. and Young C.-M.*: Biosynthesis of folates by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J. Food Drug Anal.* **8**, 195–199 (2000)
- 22 *Taranto M.P., Vera J.L., Hugenholtz J., De Valdez G.F. and Sesma F.*: *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J. Bacteriol.* **185**, 5643–5647 (2003)



- 23 Hugenboltz J., Sybesma W., Groot M.N., Wisselink W., Ladero V., Burgess K., van Sinderen D., Piard J.-C., Eggink G., Smid E.J., Savoy G., Sesma F., Jansen T., Hols P. and Kleerebezem M.: Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Leeuwenhoek* **82**, 217–235 (2002)
- 24 Sato K., Wang X.B., Mizoguchi K.: A modified form of a vitamin B<sub>12</sub> compound extracted from whey fermented by *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* **80**, 2701–2705 (1997)
- 25 Sato K., Muramatsu K., Amano S.: Application of vitamin B<sub>12</sub>-targeting site on *Lactobacillus helveticus* B<sub>1</sub> to vitamin B<sub>12</sub> assay by chemiluminescence method. *Anal. Biochem.* **308**, 1–4 (2002)
- 26 Sybesma W., Starrenburg M., Kleerebezem M., Mierau I., de Vos W.M. and Hugenboltz J.: Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3069–3076 (2003)
- 27 Sybesma W., van den Born E., Starrenburg M., Mierau I., Kleerebezem M., de Vos W.M. and Hugenboltz J.: Controlled modulation of folate polyglutamyl tail length by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7101–7107 (2003)
- 28 Kneifel W., Kaufmann M., Fleischer A. and Ulberth F.: Screening of commercially available mesophilic dairy starter cultures: biochemical, sensory, and microbiological properties. *J. Dairy Sci.* **75**, 3158–3166 (1992)
- 29 Krause L.J., Forsberg C.W. and O'Connor D.L.: Feeding human milk to rats increases bifidobacterium in the cecum and colon which correlates with enhanced folate status. *J. Nutr.* **126**, 1505–1511 (1996)
- 30 Alander M., Matto J., Kneifel W., Johansson M., Kogler B., Crittenden R., Mattila-Sandholm T. and Saarela M.: Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* **11**, 817–825 (2001)
- 31 Guigoz Y., Rochat F., Perruisseau-Carrier G., Rochat I. and Schiffrin E.J.: Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutr. Res.* **22**, 13–25 (2002)
- 32 Deguchi Y., Morishita T. and Mutai M.: Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 13–19 (1985)
- 33 Noda H., Akasaka N. and Ohsugi M.: Biotin production by bifidobacteria. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **40**, 181–188 (1994)
- 34 Cerna J. and Hrabova H.: Biologic enrichment of fermented milk beverages with vitamin B<sub>12</sub> and folic acid. *Milchwissenschaft* **32**, 274–277 (1977)
- 35 Hugenboltz J. and Smid E.J.: Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 497–507 (2002)
- 36 Humik J.H.: Process for the production of vitamin B<sub>12</sub>. United States Pat. 6492141, 1–11 (2002)
- 37 Karlin R.: Sur l'enrichissement du kéfir en vitamine B<sub>12</sub> par l'adjonction de *Propionibacterium shermanii*. *Int. Z. Vitaminforsch.* **35**, 358–364 (1965)
- 38 Karlin R.: Sur la teneur en vitamines du group B du kéfir et sur son enrichissement en vitamine B<sub>12</sub> par l'adjonction du *Propionibacterium shermanii*. *Ann. Nutr. Alimentaire* **20**, 103–110 (1966)
- 39 Janicki J., Pedziwilk F. und Kisza J.: Die Anwendung einiger Arten bzw. Stämme von Propionsäurebakterien zur Herstellung bestimmter Käsesorten mit hohem Vitamin B<sub>12</sub>-Gehalt. *Nahrung* **7**, 406–410 (1963)
- 40 Obrusiewicz T.: [Effect of different production characteristics on vitamin B<sub>12</sub> content and quality of Edam-type cheese]. *Roczniki Inst.Przemysl Mlecz.* **11**, 93–106 (1969), zitiert nach *Dairy Sci. Abstr.* **32**, 587 (1970)
- 41 Ye K.M., Shijo M., Jin S. and Shimizu K.: Efficient production of vitamin B<sub>12</sub> from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 484–491 (1996)

- 42 *Kneifel W., Holub S. and Wirthmann M.*: Monitoring of B-complex vitamins in yogurt during fermentation. *J. Dairy Res.* **56**, 651–656 (1989)
- 43 *Kneifel W., Erhard F. and Jaros D.*: Production and utilization of some water-soluble vitamins by yogurt and yogurt-related starter cultures. *Milchwissenschaft* **46**, 685–690 (1991)
- 44 *Gregory J.F.*: Case study: Folate bioavailability. *J. Nutr.* **131**, 1376S–1382S (2001)
- 45 *Bärlocher K., Eichholzer M., Lüthy J., Moser U. und Tönz O.*: Folsäure: Expertenbericht der eidgenössischen Ernährungskommission zur Prophylaxe von Neuralrohrdefekten. Bundesamt für Gesundheit, Bern (2000), abrufbar unter <http://www.bag.admin.ch/verbrau/aktuell/d/Bericht%20Folsaure%202002.pdf>
- 46 *Green N.S.*: Folic acid supplementation and prevention of birth defects. *J. Nutr.* **132**, 2356S–2360S (2002)
- 47 *Prinz-Langenobl R., Fobr I. and Pietrzik K.*: Beneficial role for folate in the prevention of colorectal and breast cancer. *Eur. J. Nutr.* **40**, 98–105 (2001)
- 48 *Jacques P.F., Selhub J., Bostom A.G., Wilson P.W.F. and Rosenberg I.H.*: The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *New Engl. J. Med.* **340**, 1449–1454 (1999)
- 49 *Riddell L.J., Chisholm A., Williams S. and Mann J.I.*: Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations. *Amer. J. Clin. Nutr.* **71**, 1448–1454 (2000)
- 50 *Rader J.I.*: Folic acid fortification, folate status and plasma homocysteine. *J. Nutr.* **132**, 2466S–2470S (2002)
- 51 *Elmadfa I., Heinzle C., Majchrzak D., Foissy H.*: Influence of a probiotic yoghurt on the status of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in the healthy adult human. *Ann. Nutr. Metab.* **45**, 13–18 (2001)

Korrespondenzadresse: Dr. Robert Sieber, Agroscope Liebefeld-Posieux, Eidg. Forschungsanstalt für Nutztiere und Milchwirtschaft (ALP), CH-3003 Bern, E-mail: [robert.sieber@alp.admin.ch](mailto:robert.sieber@alp.admin.ch)