

Aus der Universitätsfrauenklinik  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau

## **Einfluss von Vitamin C auf das Wachstum von Hefepilzen**

Inaugural Dissertation  
zur  
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät  
der Albert-Ludwigs-Universität  
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2004  
von  
Gülcan Anbarci  
geboren in  
Gökcebey/Zonguldak (Türkei)

Dekan: Prof. Dr. med. J. Zentner

1. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Daschner

2. Gutachter: PD Dr. med. A. Clad

Jahr der Promotion: 2004

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abbildungsverzeichnis .....	4
1. Einleitung und Fragestellung.....	5
2. Ascorbinsäure als Substanz .....	5
2.1 Pharmakologische Eigenschaften/Physiologie und Pathophysiologie.....	6
3. Hefepilze und die Rolle der Ascorbinsäure in ihrem Stoffwechsel in der Literatur .....	9
3.1 Ergebnisse von anderen Studien (nach Erscheinungsjahr sortiert) .....	10
4. Einfluss von Vitamin C auf das Wachstum von Hefepilzen/Eigene Experimente .....	17/18
4.1 Methoden und Materialien .....	18
5. Ergebnisse .....	21
5.1 Bewertung der Ergebnisse.....	31
6. Diskussion .....	32
7. Zusammenfassung .....	36
8. Literaturverzeichnis.....	37
Danksagungen .....	44
Lebenslauf .....	45

## Abbildungsverzeichnis

Versuchsreihe 1, <b>Abb. 1a/b</b> : <i>Candida albicans</i> : 0 mg, 1mg, 10 mg, 100 mg.....	22
Versuchsreihe 1, <b>Abb. 2a/b</b> : <i>Candida glabrata</i> : 0 mg, 1mg, 10 mg, 100 mg.....	23
Versuchsreihe 1, <b>Abb. 3/b</b> : <i>Saccharomyces cer.</i> : 0 mg, 1 mg, 10 mg, 100 mg.....	24
Versuchsreihe 2, <b>Abb. 4a/b</b> : <i>Candida albicans</i> : 0 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg.....	25
Versuchsreihe 2, <b>Abb. 5a/b</b> : <i>Candida glabrata</i> : 0 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg.....	26
Versuchsreihe 2, <b>Abb. 6a/b</b> : <i>Saccharomyces cer.</i> : 0 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg.....	27
Versuchsreihe 3, <b>Abb. 7a/b</b> : <i>Candida albicans</i> : 0 mg, 300 mg.....	28
Versuchsreihe 3, <b>Abb. 8a/b</b> : <i>Candida glabrata</i> : 0 mg, 300 mg.....	29
Versuchsreihe 3, <b>Abb. 9a/b</b> : <i>Saccharomyces cer.</i> : 0 mg, 300 mg.....	30

## 1 Einleitung und Fragestellung

Eine neuartige Therapieform bei Aminvaginose bzw. gestörter Vaginalflora ist die Behandlung mit Vagi-C<sup>®</sup>. Es ist eine Vaginaltablette, welches Vitamin C (250mg/Tabl.) enthält und eine Alternative zu den klassischen Behandlungsformen wie Desinfektiva oder Antibiotika darstellt.

Vor allem bei Schwangeren ist es eine gute Alternative da es hierbei um eine langfristige Behandlung geht. Bei den bisherigen Studien fiel auf, dass bei einigen Frauen Pilzinfektionen auftraten [Antalfy 2. (2001), Gutmann 16. (1993), Petersen 48. (2000)].

Dieses Phänomen welches auch nach Antibiotikatherapie vorkommt warf einige Fragen auf.

War Vitamin C der Grund für die Pilzinfektionen oder gibt es andere Gründe ? Welchen Einfluss hat Vitamin C auf das Wachstum von Hefen ? Stellt Vitamin C ein Substrat für Hefepilze dar ? Wachsen diese unter Vitamin C besser und wie reagieren Hefepilze auf unterschiedliche Konzentrationen von Vitamin C ?

Um diesen und anderen Fragen nachzugehen wurde diese Arbeit erstellt und enthält neben einer mikrobiologischen Laborarbeit auch wissenschaftliche Recherchen zu diesem Thema.

Um den Rahmen überschaubar zu halten wurden für diese Arbeit Hefepilzarten verwendet, welche bei gynäkologischen Pilzinfektionen am häufigsten anzutreffen sind. Dazu gehören *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae* [Petersen 43. (1992)].

## 2 Ascorbinsäure als Substanz

Vitamin C, chemisch auch Ascorbinsäure oder acidum ascorbicum genannt, hat die Summenformel  $C_6H_8O_6$  und ist ein (5R-5-[(S)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-2(5H)-furanon (2,3-Endiol-L-Gulonsäure-?-Lacton). Weiterhin ist es ein weißes bis fast weißes kristallines Pulver, welches sich an der Luft und bei Feuchtigkeit geruchlos oder fast geruchlos verfärbt. Leicht löslich in Wasser und löslich in Ethanol, praktisch unlöslich in Chloroform und Ether. Die Substanz schmilzt bei etwa 190°C unter Zersetzung. Ascorbinsäure ist in der belebten Natur weit verbreitet, sowohl in pflanzlichem als auch im tierischen Organismus.

Im letzteren ist sie in fast allen Organen anzutreffen, am reichlichsten in der Nebennierenrinde, aber auch Augenlinse, Erythrozyten, Hypophyse und Corpus luteum weisen einen hohen Gehalt an Ascorbinsäure auf. [DAB Hartke et al. 19. (1991)]

Reichstein und Grüssner beschrieben 1933 zum ersten Mal den Weg der industriellen Herstellung der Ascorbinsäure. Ausgangssubstanz ist die D-Glucose. Auch heute noch wird Vitamin C auf diese Art hergestellt. [Hancock et Viola 17. (2001), 18. (2002); DAB Hartke et al. 19. (1991)]

Der Säurecharakter der Ascorbinsäure wird durch die zwei OH-Gruppen mit den pKs-Werten,  $pK_{s1} = 4,17$  und  $pK_{s2} = 11,57$  dargestellt und definiert sich somit als eine mittelstarke Säure. Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure bilden im Organismus ein reversibles Redoxsystem, welches von großer physiologischer Bedeutung ist. Sie fungieren als Protonen bzw. Elektronendonator und -acceptor. Für die Dehydroascorbinsäure sind sechs Isomere möglich. Dehydroascorbinsäure besitzt volle Vitamin C Wirksamkeit und kann in vitro mit  $H_2S$  zur Ascorbinsäure reduziert werden. [Forth, Henschler, Rummel 13. (2001); DAB Hartke et al. 19. (1991)]

Von der Ascorbinsäure existieren vier Isomere. Unter diesen sind nur die offizinelle L-xylo-Ascorbinsäure voll wirksam. Von den anderen drei Isomeren, D-xylo-Ascorbinsäure, L-arabo-Ascorbinsäure und D-arabo-Ascorbinsäure hat die letztere in manchen Ländern, z.B. den USA, eine gewisse Bedeutung als Antioxidans und Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie. Sie ist dort als Isoascorbinsäure oder Erythroascorbinsäure (D-erythro-2-Oxo-hexonsäure-gamma-lacton) bekannt. [DAB Hartke et al. 19. (1991)]

## **2.1 Pharmakologische Eigenschaften**

### **Physiologie und Pathophysiologie**

Vitamin C gehört zu den biochemischen Redoxsystemen und spielt im Stoffwechsel eine vielfältige Rolle. Das Elektronendonator bzw.-acceptor-System besteht aus L-Ascorbinsäure, der sehr reaktionsfähigen, radikalischen L-Semidehydroascorbinsäure und L-Dehydroascor-

binsäure, die miteinander im Redoxgleichgewicht stehen. Vitamin C ist an der Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin beteiligt, das für die Bildung von Interzellularsubstanz und Kollagen unentbehrlich ist. Es ist weiterhin für die Biosynthese von NNR-Hormonen, Hydroxylierung von Dopamin zu Noradrenalin sowie für die Umwandlung von Tryptophan in Serotonin und Folsäure zu Tetrahydrofolsäure wichtig.

Weiterhin fördert es die Blutgerinnung durch Thrombinaktivierung und verbessert auch die Eisenresorption. Ebenfalls bei der Metabolisierung von Pharmaka und körperfremden Substanzen in den Mikrosomen der Leberzellen spielt Vitamin C eine Rolle.

Bei der Hydroxylierung von Aminosäuren fungiert L-Ascorbinsäure möglicherweise als Elektronendonator. Für den Abbau cyclischer Aminosäuren ist sie ebenfalls von Bedeutung, insbesondere für den Abbau des Thyrosins, und zwar für die Spaltung des Ringes der Homogentisinsäure. Das spielt bei Säuglingen eine Rolle, die mit Kuhmilch versorgt werden. Die dabei auftretenden Störungen beim Abbau cyclischer Aminosäuren können durch Ascorbinsäure normalisiert werden. [Forth, Henschler, Rummel 13. (2001)]

Der tägliche Bedarf liegt für Kinder und Jugendliche bei etwa 40 mg, für Erwachsene bei etwa 60-80mg. Erhöhter Bedarf besteht während der Schwangerschaft und Stillzeit (100-200 mg/Tag). Auch Rauchen, schwere körperliche Anstrengungen, Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen, Röntgenbestrahlung und maligne Tumoren steigern den Vitamin-C-Verbrauch. Er übersteigt jedoch nicht die Menge von 300 mg/Tag. [DAB Hartke et al. 19. (1991)]

Die klassische Vitamin-C-Mangel-Erkrankung, der Skorbut, zeichnet sich durch abnorme Müdigkeit, Muskelschwäche, Blutung in Haut, Schleimhäuten, inneren Organen und Muskulatur, Hyperkeratose, Veränderungen am Zahnhalteapparat und erhöhte Infektanfälligkeit aus. Beim Säugling führt Vitamin-C-Mangel zu Verzögerung des Knochen- und Zahnwachstums sowie subperiostale Blutungen (Müller-Barlowsche Erkrankung). Beide Erkrankungen treten nur noch selten auf, häufiger sind dagegen C-Hypovitaminosen, infolge Fehlernährung oder mangelnder Resorption (z.B. bei anacider Gastritis oder Leberzirrhose), die sich in Ermüdung, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Muskelschmerz und Zahnfleischbluten zeigen können. [Forth, Henschler, Rummel 13. (2001); DAB Hartke et al. 19. (1991)]

**Pharmakokinetik:** Oral zugeführtes Vitamin C wird in physiologischen Dosen vor allem im oberen Dünndarm rasch und ohne wesentliche Verluste mit Hilfe eines aktiven Transports

aufgenommen, wobei der prozentuale Anteil der resorbierten Menge mit steigender Dosis sinkt. So werden von einer oralen Dosis von 100 mg etwa 70 % resorbiert, bei einer Dosis von 1,5 g nur noch 50 % und bei 12 g rund 16 % der Dosis. Die absolut resorbierten Mengen jedoch nehmen dabei ständig zu: rund 125 mg bei der Dosis von 180 mg, 750 mg bei der Dosis von 1,5 g und fast 2 g bei der Dosis von 12 g. Der nicht resorbierte Anteil wird von der Dickdarmflora überwiegend zu CO<sub>2</sub> und organischen Säuren abgebaut.

Die Serumkonzentrationen liegen bei guter Vitamin-C-Versorgung zwischen 1,2-1,8 mg/ml. Der Gesamtkörperbestand liegt bei 1,5-2g. [DAB Hartke et al. 19. (1991)]

Als brauchbares Maß für die Beurteilung der Versorgung des Organismus gilt die Konzentration der L-Ascorbinsäure in Leukocyten: 30 mg/100 g Zellen gelten als Norm.

Die Plasmaeiweißbindung beträgt 25 %, die totale Clearance 80 ml/min, die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  beträgt 12 Stunden, die extrarenale Eliminationsfraktion (der Bruchteil der resorbierte Menge, der metabolisiert wird)  $Q_0$  dagegen 0,05. [Forth, Henschler, Rummel 13. (2001)]

Vitamin C wird in Hypophyse, Nebennieren, Augenlinsen und weißen Blutkörperchen stark angereichert. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend durch die Nieren und schwankt in Abhängigkeit vom Versorgungsstatus des Organismus. Nennenswerte Mengen werden erst ausgeschieden, wenn die Nierenschwelle, die bei einer Plasmakonzentration von 1,4 mg/100 ml liegt, überschritten wird.

Neben L-Ascorbinsäure, Dehydro-L-Ascorbinsäure, 2,3-Diketo-L-gulonsäure ist vor allem Oxalsäure im Harn nachzuweisen, deren Ausscheidung auch oberhalb eines Gesamtumsatzes an Ascorbinsäure von 80-120 mg/Tag mit 40-50 mg relativ stabil bleibt. Bei Menschen mit einer entsprechenden Disposition sind bei täglichen Dosen von 4 g L-Ascorbinsäure Oxalatsteine in den ableitenden Harnwegen beobachtet worden. Deshalb ist bei diesen Menschen bei Dosen von mehr als 2-3 g/Tag Vorsicht geboten. Ohne eine entsprechende Anamnese oder familiärer Belastung werden derartige Dosen von Gesunden problemlos vertragen. Die Oxalsäure bei Patienten, die an einer Hyperoxalurie leiden, stammt nur zum geringsten Teil aus dem L-Ascorbinsäure-Stoffwechsel. [DAB Hartke et al. 19. (1991)]

**Indikationen:** Prophylaxe und Therapie von Skorbut, Präskorbut und Möller-Barlowsche Krankheit. Zur Deckung eines erhöhten Bedarfs in der Schwangerschaft, Stillzeit und im Wachstumsalter.

Therapie von Methämoglobinämie. Weiterhin unterstützt Ascorbinsäure die Eisenresorption bei der Therapie der Eisenmangelanämie. Bei Erkältungskrankheiten zeigte Ascorbinsäure (0,2-0,5 g/Tag) im kontrollierten klinischen Versuch eine gewisse Schutzwirkung. Die Bedeutung dieser Beobachtung für die praktische Therapie ist nach wie vor umstritten.

Erwähnenswert ist, dass die Zahl von Carcinomen und anderen neoplastischen Erkrankungen negativ mit dem Ascorbinsäuregehalt der Nahrung korreliert; das trifft z.B. für das Colocarcinom oder das Cervixcarcinom zu.

Die Überlebenszeit von Krebspatienten konnte durch hochdosiertes L-Ascorbinsäure-Zulagen (4-10 g/Tag) verlängert werden. Da Ascorbinsäure zu den wirksamsten Inhibitoren der N-Nitrosierung gehört, wird erwartet, dass Tumoren die durch Nitrosamine ausgelöst werden, verringert werden könnten. [Forth, Hentschler, Rummel 13. (2001)]

**Dosierung:** Prophylaktisch täglich 50-225 mg oral ; therapeutisch täglich 225-1000 mg oder 500-1000 mg parenteral. Bei akuter toxisch bedingter Methämoglobinämie einmalig 500-1000 mg i.v. (evtl. Wiederholung).

**Unerwünschte Wirkungen und Wechselwirkungen:** L-Ascorbinsäure wird bemerkenswert gut vertragen. Vereinzelt können bei hoher Dosierung leichte Übelkeit und Diarrhoe auftreten. Bei prädisponierten Menschen besteht die Möglichkeit der Oxalatsteinbildung. Bei Patienten mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel können Megadosen von L-Ascorbinsäure (10-100 g/tgl.) eine Hämolyse bewirken.

Aus toxikologischer Sicht ist L-Ascorbinsäure unbedenklich. [DAB Hartke et al. 19. (1991)]

### 3 Hefepilze und die Rolle der Ascorbinsäure in ihrem Stoffwechsel in der Literatur

Als Hauptenergiequelle für Pilze dienen neben Eiweißen und Fetten vor allem Kohlenstoffverbindungen. Nicht nur Monosaccharide wie Glucose sondern auch Disaccharide und sogar Polysaccharide werden aus der Umgebung aufgenommen und dann umgesetzt [Müller/Loeffler 34. (1992)].

Häufigste und die typische Kohlenstoffquelle ist jedoch die Glucose, welches direkt verwertet werden kann, andere Hexosen gelangen erst nach einer Phosphorylierung auf den Abbauweg. Aus einfachen Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen synthetisieren Pilze auch Aminosäuren, diese werden zum Aufbau von Proteinen und Vitaminen wie Panthotensäure, Nucleotiden und Alkaloiden verbraucht, in andere Aminosäuren umgewandelt, zur Energiegewinnung ähnlich wie Kohlenhydrate oder Fette abgebaut und unter Umständen wieder ins Medium ausgeschieden.

Im tierischem wie auch menschlichem Körper gehören Vitamine zu den Stoffen, die nicht selbst synthetisiert werden können und somit mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Da Vitamine als Coenzyme fungieren und ihnen eine gewisse Bedeutung im Stoffwechsel zuteil wird, ist verständlich dass viele Pflanzen und darunter auch einige Pilze ihren Vitaminbedarf durch Eigenproduktion decken. Andere Pilze wiederum sind auf die Aufnahme von außen angewiesen, dies trifft z.B. für manche Arten auf einen oder mehrere B-Vitamine zu.

Einige Autoren, z.B. [Müller/Loeffler 34. (1992)] meinen, dass Vitamin C, wie fettlösliche Vitamine auch, für Pilze oder Hefepilze keine Bedeutung besitzt, d.h. dass Hefepilze Vitamin C nicht verwerten könnten und dass Vitamin C in ihrem Stoffwechsel keine Rolle spielt.

Aber es gibt auch Studien von Wissenschaftlern wie Hancock und Viola [Hancock et Viola 17. (2001), 18. (2002)], die sich genauer mit diesem Thema befasst haben und andere Ergebnisse liefern.

### **3.1 Ergebnisse von anderen Studien (nach Erscheinungsjahr sortiert)**

**Juni 1986, Lucia Costamagna und Iolanda Rosi, Universität Perugia, Italien, Canadian Journal of Microbiology,**

**Und Isabella Garuccio und Oreste Arrigoni, Universität Bari, Italien**

**“Ascorbic acid utilisation by some yeasts”**

Bei dieser Arbeit wurden insgesamt 180 Stämme von Hefepilzen untersucht, welche zu 17 Gattungen und 53 Spezies gehören.

Hefepilze wurden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, auf L-Ascorbinsäure(AA) und oder Iso-Ascorbinsäure (D-Erythroascorbinsäure) (iso-AA) zu wachsen, als Kontrollmedium diente Nährlösung mit 2 %-Glucose-Zusatz (GL).

Die Nährlösungen beinhalteten neben YNB (Difco yeast nitrogen base) mit 2 % Glucose, 0,5 % Ascorbinsäure in medium AA, 0,5 % Iso-Ascorbinsäure in medium iso-AA und 2 % Glucose im Kontrollmedium (medium GL).

Die Keime wurden nach 24 stündiger Bebrütung in der Nährlösung mit den oben erwähnten Zusätzen für das jeweilige medium für weitere 3 Tage bebrütet und die Keimsuspensionen nach Trocknung bei 105°C in mg abgewogen. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> (Methoden abgekürzt)

Ergebnisse : (ein Auszug aus dem Gesamtergebnis)

Spezies	Stamm	Wachstum nach 3 Tagen		
		AA	iso-AA	GL
<i>Candida blankii</i>	CBS1898	100	k.W.	700
<i>Candida curvata</i>	CBS570	100	80	160
<i>Candida humicola</i>	CBS1896	80	100	140
<i>Cryptococcus albidus</i>	CBS4192	120	80	280
<i>Cryptococcus haveanensis</i>	CBS140	160	100	180
<i>Cryptococcus luteolus</i>	CBS953	180	80	200
<i>Cryptococcus skinneri</i>	UCD60-82	120	100	140
<i>Cryptococcus terreus</i>	CBS1895	100	60	220

Die Ergebnisse sind in mg Trockengewicht pro100 ml angegeben. k.W.= kein Wachstum.

Von den insgesamt 180 getesteten Hefestämmen und Spezies, worunter auch *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* dazu gehörten, wuchsen 6 auf AA aber nicht auf iso-AA, 17 wuchsen sowohl auf AA als auch auf iso-AA.

Unter den Hefen, die auf Ascorbinsäure wuchsen gehörten drei der Candida Gruppe an, zwei wuchsen auch auf Iso-ascorbinsäure. Allerdings handelte es sich da um *Candida blankii*, *Candida curvata* und *Candida humicola*, jedoch nicht um *Candida albicans*.

Auch *Saccharomyces cerevisiae* wuchs nicht auf AA oder iso-AA, jedoch einige *Cryptococcus*-Arten u.a.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Hefepilze durchaus Ascorbinsäure oder Iso-Ascorbinsäure verwerten können. Wenn auch nicht alle Hefepilze dazu fähig sind, gibt es Spezies, die gut oder auch genauso gut auf Ascorbinsäure wachsen wie auf einer Kohlenwasserstoffquelle, wie Glucose.

Insgesamt allerdings konnten von den 180 getesteten Stämmen nur 23 Spezies auf Ascorbinsäure wachsen.

**1989 Journal of Antimicrobial Chemotherapie, Janina Brajtburg, Svetlana Elberg, Georg S. Kobayashi, Gerald Medoff, Washington University, School of Medicine, St.Louis, USA. "Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B"**

In dieser Arbeit geht es darum, dass Vitamin C die antimykotische Wirkung von Amphotericin B verstärkt.

“Ohne Zusatz von Vitamin C besteht eine Wachstumshemmung der Keime *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* durch Amphoterin B um 10 %, mit Zusatz von Vitamin C jedoch eine Wachstumshemmung um 67 %. Vitamin C fungiert hier als Antioxidans, d. h. es verhindert die Autooxidation des Amphotericin B und erhöht somit die Wirksamkeit des Antimykotikums, andererseits hat Vitamin C wohl auch eine Wirkung als Prooxidans. Es existiert wohl ein Gleichgewicht zwischen der Wirkung des Vitamin C als Prooxidans und der als Antioxidans.“

Amphotericin B wurde in variablen Mengen in mg/l und Vitamin C in einer Menge von vier mmol zugegeben.

Diese Ergebnisse könnten für die Pharmaindustrie von großem Nutzen sein. Wenn durch den Zusatz von Vitamin C die antimykotische Wirkung eines Antimykotikums derart gesteigert werden kann, würden in Zukunft niedrigere Konzentrationen dieses und vielleicht auch

anderer Antimykotika mit Kombination mit Vitamin C ausreichen, um die gleiche Wirkung zu erzielen.

Auf die Frage ob Vitamin C hier eine eigene antimykotische Wirkung hat wird in dieser Arbeit nicht eingegangen.

**1994, Won-Ki Huh, Kap-Seok Yang, Yeong-Jae Seok, Yung Chil Hah, Sa-Ouk Kang,  
National University, Republic of Korea**

**“Characterisation of D-Arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231”**

„Heick et al berichteten, dass L-Ascorbinsäure in einer Reihe von Hefepilzen gefunden wurde, u.a. in *Lypomyces starkeyi* und *Saccharomyces cerevisiae*. Nicht L-Ascorbinsäure, sondern Erythroascorbinsäure wird in diesen Hefepilzen produziert.

L-Erythroascorbinsäure entsteht im tierischen Organismus während der L-Ascorbinsäuremetabolismus. Mukarawa et al. entdeckten, dass die Erythroascorbinsäurebiosynthese in *Candida*-Arten folgendermaßen abläuft : D-Arabinose -> D-Arabinono-1,5-lacton -> D-Arabinono-1,4lacton -> D-Erythroascorbinsäure.

Der letzte Schritt der Biosynthese wird in *Candida albicans* durch das Enzym D-Arabinono-1,4-lacton-Oxidase katalysiert.“

**1996, Biochimica et Biophysica Acta 1297(1996) 1-8,**

**Seong-Tae Kim, Won-Ki Huh, Joo-Yeop Kim, Sung-Wook Hwang, Sa-Ouk Kang,  
Seoul National University, South Korea**

**“D-Arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*“**

„D-Erythroascorbinsäure welches der L-Ascorbinsäure in seiner Struktur sehr ähnlich ist wurde in verschiedenen Hefepilzen gefunden, darunter in *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lipomyces starkeyi* und *Candida*-Arten.

D-Arabinose, D-Arabinono-1,4-lacton und D-Arabinat sind gute Substrate für die Bildung von D-Erythroascorbinsäure, seine Biosynthese wird z.B. in *Candida utilis* auf diese Art vermutet.

Erythroascorbinsäure scheint wegen seiner physiochemischen Eigenschaften und seiner biologischen Aktivitäten der L-Ascorbinsäure sehr ähnlich zu sein. Sie spielt wohl in niederen Organismen die gleiche Rolle wie L-Ascorbinsäure in höheren Lebewesen.

Wir isolierten das Enzym D-Arabinono-1,4-lacton Oxidase, welches in den mitochondrialen Fraktionen des *Candida albicans* die Umwandlung von D-Arabinono-1,4-lacton zu D-erythroascorbinsäure katalysiert.“

**1998, Can. J. Microbiol. 44 866-871, Gregor Reid, Foad Soboh, Andrew W. Bruce, Marc Mittelman**

**“Effect of nutrient composition on the in vitro growth of urogenital lactobacilli and uropathogens”**

In dieser Arbeit geht es um Nährstoffe und andere Zusätze, welche das Wachstum von uropathogenen Keimen und Lactobacillen in vitro beeinflussen. Dabei heißt es, dass Frauen beim Gebrauch von Spermiziden oder nach Antibiotikatherapie leicht an Pilzinfektionen im Genitalbereich oder Harnwegsinfekten erkranken.

Es wurden dabei einige uropathogene Keime, darunter *Escherichia coli* Hu 734, *Enterococcus faecalis* 1131, *Candida albicans* F3, *Proteus mirabilis* F1, *Staphylococcus aureus* F2 untersucht, aber auch Lactobacillen, wie *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 und *Lactobacillus fermentum* B-54. Diese Keime wurden unterschiedlichen Nährmedien ausgesetzt, welche neben 11 Vitaminen, 24 Aminosäuren, Salzen und Zuckern, Zuckeralkoholen, Mineralien, Magermilch, Tween 80, Glykogen und Estriol beinhalten.

**Medium A** neben den oben genannten Zusätzen **mit** Zusatz von **Aminosäuren** (genauere Angaben sind bei Interesse aus der ang. Arbeit zu entnehmen)

**Medium B** neben den genannten Zusätzen **ohne** Zusatz von **Aminosäuren**

**Medium C** neben den genannten Zusätzen weiterhin 1 % Magermilch (**Lactose**)

**Medium D** Difco **Lactobacillen** Medium MRS

**Medium D1** wie Med.D, zusätzlich 0,1 % **Vitamin C**

**Medium D2** wie Med.D, zusätzlich 0,001 % **EDTA**

**Medium E** neben Panthotensäure 0,0001 %, Glycogen 1 %, p-Aminobezoensäure 0,2µg, 0,001mg Nicotinsäureamid, 500mg Lactose und 0,03 mg **Estriol** (in Alkohol gelöst)

Ergebnisse in Tabellenform :

### Wachstum nach 24 Stunden

Medium	Lr	Lf	Ec	Ef	Pm	Sa	Ca
Medium A	+	+	+	-	+	-	+
Medium B	++	+	+	-	+	-	+
Medium C	++	++	+	-	+	-	++ (mit Lactose)
Medium D	++	++	-	-	-	-	+
<b>Medium D1</b>	++	++	-	-	-	-	++ <b>(mit Vit.C)</b>
Medium D2	++	++	-	-	-	-	++ (mit EDTA)
Medium E	++	++	-	-	-	-	+ (mit Estriol)

Lr = Lactobacillus rhamnosus, Lf = Lactobacillus fermentum, Ec = Escherichia coli, Ef = Enterococcus faecalis, Pm = Proteus mirabilis, Sa = Staphylococcus aureus, Ca = Candida albicans.

Das Gesamtwachstum der Mikroorganismen ist zwischen 0 Stunden und 24 Stunden bewertet worden.

(+) mehr lebensfähige Organismen in 24 Std. als in Stunde Null.

(++) >1 log mehr lebensfähige Organismen in 24 Std. als in Stunde Null

(-) weniger lebensfähige Organismen in 24 Std. als in Stunde Null.

In **Medium C** unter Zusatz von Lactose wuchsen nicht nur die Lactobacillen sondern auch in gleichem Maße Candida albicans und in geringem Maße auch E.coli und P.mirabilis.

In **Medium D1** mit Zusatz von Vitamin C wuchsen sowohl die Lactobacillen als auch Candida albicans gut, die anderen Keime aber nicht; gleiches Ergebnis in **Medium D2** mit zusätzlich EDTA. In Medium E (mit **Estriol**) hingegen gutes Wachstum der Lactobacillen und mäßiges Wachstum für Candida albicans.

Diese Ergebnisse zeigen zwar, dass Candida albicans, welches eines der Hauptkeime für Vaginalcandidosen ist, unter Zusatz von Vitamin C besser wächst, aber auch, dass das Wachstum der "guten" Keime, wie Lactobacillen, in gleichem Maße gefördert wird.

Außerdem wurde das Wachstum der uropathogenen Keime unterdrückt (nicht so in Medium A, B und C).

**2001, Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 567-576**

**R. D. Hancock, R. Viola**

**“The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production : current status and future perspectives”**

„L-Ascorbinsäure wird seit über 60 Jahren industriell aus Glucose hergestellt, dabei kommen fast 80000 Tonnen pro Jahr auf den weltweiten Markt für mehr als 600 Millionen Dollar.

Seit 1933 wird Vitamin C nach der Reichstein Methode auf sieben Syntheseschritten mit Zuhilfenahme von *Acetobacter suboxidans*, einem Bakterium, hergestellt.

Wirtschaftskonzerne und die amerikanische Regierung sind daran interessiert Vitamin C effektiver und wirtschaftlicher herstellen zu lassen“, zumal Vitamin C nicht nur immer breiter werdende Einsatzmöglichkeiten bietet sondern auch seine Bedeutung in allen Bereichen immer deutlicher wird.

„Bis zu 50 % des Vitamins werden in Vitaminpräparaten, ca. 25 % in Nahrungsmitteln, 15 % in Getränken und 10 % in Tierfutter verwendet, dabei hat in den letzten Jahren auch die Kosmetikindustrie Vitamin C entdeckt“ und dieses in etliche Produkte integriert.

„Ziel der Überlegungen ist es Vitamin C mit Hilfe von Mikroorganismen in weniger Syntheseschritten viel effektiver und kostengünstiger herzustellen. Dazu eignen sich neben Bakterien auch Hefepilze, von denen man weiß, dass sie die der L-Ascorbinsäure verwandten, allerdings ein fünf kohlenstoffkettiges Molekül, die Erythroascorbinsäure herstellen können.“

Wie schon bereits vorher erwähnt wird Erythroascorbinsäure auch in der Lebensmittelindustrie als Antioxidans oder Zusatzstoff verwendet. Allerdings besitzt Erythroascorbinsäure keine volle Vitamin C Wirksamkeit, d.h. seine Wirkung ist etwas abgeschwächt und sie hat keinerlei antiscorbutische Eigenschaften.

„Allerdings haben diverse Wissenschaftler herausgefunden, dass je nach Substrat-Angebot *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage sind neben Erythroascorbinsäure, welches in ihrem Stoffwechsel eine wichtige Rolle zu spielen scheint, auch L-Ascorbinsäure zu produzieren.

Die Synthese der Erythroascorbinsäure beinhaltet in Hefepilzen nur drei Schritte. Ausgangssubstrat ist die D-Arabinose, diese wird über D-Arabinono-1,4-lacton zu D-Erythroascorbinsäure.

Bei anderen Substratangeboten, wie L-Galactono-1,4-lacton oder L-Gulono-1,4-lacton produzieren *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* L-Ascorbinsäure, Vitamin C.“

Die Tatsache, dass Hefepilze Vitamin C selbst synthetisieren können, bedeutet zum Einen, dass Vitamin C oder sein Abkömmling, die Erythroascorbinsäure eine wichtige Rolle in ihrem Stoffwechsel spielt. Man vermutet, dass sie ähnliche Funktionen hat wie das Vitamin C im Stoffwechsel höherer Lebewesen , wie dem Menschen [Hancock et Viola 17. (2001); Huh et al. 24. (1994); Kim et al. 27. (1996)].

Zum anderen aber drängt sich die Frage auf, wenn Vitamin C so essentiell für Hefepilze ist oder sein soll, ob Vitamin C auch als Substrat für sie in Frage kommt.

An dieser Stelle müssen zwei Begriffe erklärt werden. Auxothrophie und Prototrophie.

Einige Hefepilze sind für einige Vitamine oder Substrate auxothroph, d.h.sie sind darauf angewiesen diese von außen aufzunehmen, weil sie diese Substrate oder Vitamine nicht selbst herstellen können. Prototroph sind hingegen Hefepilze, die für ihren Stoffwechsel nötigen Vitamine selbst synthetisieren können [Müller/Loeffler 34.(1992)].

Für viele B-Vitamine z.B. ist das bei Hefepilzen schon bekannt, einige sind für gewisse B-Vitamine auxothroph, andere prototroph. Über Vitamin C hingegen gibt es keine verlässlichen Daten oder Studien, somit kann man nur spekulieren, dass diejenigen Hefepilze, die Vitamin C oder Erythroascorbinsäure selbst herstellen nicht darauf angewiesen sind diese von außen aufzunehmen.

## **4 Einfluss von Vitamin C auf das Wachstum von Hefepilzen**

Welchen Einfluss Vitamin C auf das Wachstum von Hefepilzen hat konnte mit der ausführlichen Literaturrecherche nicht befriedigend genug beantwortet werden.

Von allen Studien und in vitro Untersuchungen gibt vor allem die Studie aus Italien aus dem Jahre 1986 eine Antwort auf diese Frage (s. S. 10). Hier konnte gezeigt werden, dass von 180 getesteten Hefepilzstämmen lediglich 23 auf Ascorbinsäure wachsen. *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* gehörten allerdings nicht dazu.

## **Eigene Experimente**

Um dieser Frage weiterhin auf den Grund zu gehen und um den Einfluß von unterschiedlichen Vitamin C-Konzentrationen auf Hefepilzwachstum zu eruieren wurde die folgende in vitro Arbeit gefertigt. Dabei wurden nur drei Hefepilze untersucht welche in der Vagina am häufigsten vorkommen. Diese sind *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae*.

### **4.1 Methoden und Materialien**

#### **Teststämme**

Für die Versuche wurden Hefepilze verwendet, die von Patientinnen aus der Vagina isoliert worden sind. Es handelt sich dabei, wie oben erwähnt, um *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **Kulturmedien**

Um die Hefen quantitativ erfassen zu können wurden Sabouraud-Agarplatten und für die Ansätze Sabouraud-Bouillon verwendet. Vitamin C ist als Reinsubstanz in Pulverform den einzelnen Nährlösungen (Sab.-Bouill.) in unterschiedlichen Mengen zugesetzt worden.

#### **Kulturmedien und Reagenzien im Einzelnen:**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnr</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Sabouraud-Agar	Firma Difco	0747/17	Bactoneopepton	10g/l
			Bactodextrose	20g/l
			Bactoagar	20g/l
			Streptomycin	40mg/l
			Penicillin	20mg/l
Sabouraud-Bouill.	Firma Difco	0747/17	Bactoneopepton	10g/l
			Bactodextrose	20g/l
			Streptomycin	40mg/l
			Penicillin	20mg/l

Vitamin C	Caesar & Loretz	2006a	Ascorbinsäure	100%
Aqua-dest.	Milli-Q-Wasser		autoklaviert	

### Materialien

Spectrophotometer (Coleman)	Perkin-Elmer
PH-Meter	MultiCal
Vortex	Bender und Hobein AG
Brutschrank	Heraeus (37°)+ Luftfeuchtigkeit
PS-Röhrchen	Greiner Best.-Nr.: 1631
Eppendorf-Hütchen	Greiner Best.-Nr.: 616201

### Methodik

Am Photometer wurde bei einer optischen Dichte von 415 nm mit einer Extinktion von 0,220 nm eine Keimzahl von  $10^7$  KBE/ml eingestellt.

In einer Verdünnungsreihe wurde die Keimzahl auf  $10^2$  KBE/ml erniedrigt. In den Probeansätzen waren jeweils Sabaroud-Bouillon und unterschiedliche Konzentrationen von Vitamin C enthalten. Als Leerkontrolle ist einem Röhrchen kein Vitamin C zugesetzt worden. Nachdem den Ansätzen 20µl der Keimsuspension beigemischt worden waren, wurden nach null, drei, sechs, acht, und vierundzwanzig Stunden den Proben je nach Keimzahl und Verdünnungsfaktor 10µl-100µl entnommen und auf Sabaroud-Agarplatten ausgespatelt.

Die Probeansätze und die Agarplatten wurden im Brutschrank bei 36°C +/-1° in Normalatmosphäre inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Agarplatten ausgezählt.

### Durchführung

Von allen drei Hefen wurde eine Keimsuspension hergestellt. Nach dem Einstellen des Leerwertes ist am Photometer die Keimzahl durch schrittweises Pipettieren auf  $10^7$  KBE/ml verdünnt worden.

Zwischen den einzelnen Schritten ist immer wieder gemischt worden. Um die Keimzahl auf  $10^2$  KBE/ml zu erniedrigen wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. In Eppendorf-Hütchen wurden die Keimsuspensionen 1:100 verdünnt.

Von den nun  $10^5$  KBE/ml wurden jeweils 20 µl Keime in 2 ml Sabouroud-Bouillon zugesetzt.

Vitamin C ist in mg abgewogen und in unterschiedlichen Mengen den Ansätzen zugegeben worden. Dabei betragen die Vitamin C-Konzentrationen 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml, und 300 mg/ml.

Ein Röhrchen enthielt als Leerkontrolle kein Zusatz von Vitamin C. Von diesen Ansätzen wurde zur Stunde Null jeweils 100µl auf Sabouraud-Agar ausgespatelt und bei 37° C in den Brutschrank gestellt.

Dieses Vorgehen wurde nach drei, sechs, acht, vierundzwanzig Stunden wiederholt.

Nach sechs und acht Stunden wurden wegen der höheren Keimzahl nur 50µl, bzw. 20µl oder nur 10µl ausgespatelt.

Nach vierundzwanzig Stunden wurden die Keimsuspensionen 1:10<sup>4</sup> verdünnt und jeweils 20µl ausgespatelt und wieder in den Brutschrank gestellt.

Nach zwei Tagen der Bebrütung wurden die Agarplatten ausgezählt. Um die absolute Keimzahl zu bestimmen wurden die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und somit die Keimbildenden Einheiten pro ml (KBE/ml) ermittelt. Um die Ergebnisse mit anderen Studienergebnissen vergleichbar machen zu können wurde bei jedem Versuchsansatz der PH Wert gemessen.

## 5 Ergebnisse

Zur vereinfachten Darstellung der Wachstumskurven der jeweiligen Hefepilze wurden die absoluten Zahlen (KBE/ml) in 10er Logarithmen umgerechnet (**obere Tabelle**).

Zur besseren Übersicht und Beurteilbarkeit wurden zwei Diagrammtypen gewählt. In der ersten Abbildung wird die Wachstumskinetik in einem Verlaufsdiagramm (**Abb. a**), in der zweiten Abbildung in einem Säulendiagramm (**Abb. b**) dargestellt. Die Abbildung a zeigt die Wachstumskinetik detaillierter innerhalb des Zeitverlaufs, die Abbildung b zeigt die Wachstumskinetik anschaulicher in Bezug auf die Quantität der Keimzahlen (KBE/ml).

Es wurden insgesamt 3 Versuchsreihen angesetzt. Dabei wurden bewusst vorerst sehr niedrige Vitamin-C-Konzentrationen gewählt, um zu schauen, ob Vitamin C als Substrat für die Hefepilze in Frage kommt. Bei den Vorversuchen wurden Vitamin-C-Konzentrationen von 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml und 50 mg/ml eingesetzt. Als sich bei den Ergebnissen keine nennenswerten Unterschiede in der Wachstumskinetik zeigten, nämlich kein vermehrtes Wachstum im Vergleich zur Leerkontrolle (ohne Zusatz von Vitamin C), wurden für die weiteren Versuche die Vitamin-C-Konzentrationen von 5 mg/ml und 50 mg/ml verworfen. Die weiteren Versuche wurden dann mit höheren Vitamin-C-Konzentrationen durchgeführt.

Die nächste Überlegung zielte auf eine mögliche Wachstumshemmung; dabei wurde die Vitamin-C-Konzentration bis zu einer Höchstmenge von 300 mg/ml zugesetzt. Noch höhere Konzentrationen waren nicht möglich, da ansonsten die Löslichkeitsgrenze von Ascorbinsäure überschritten worden wäre.

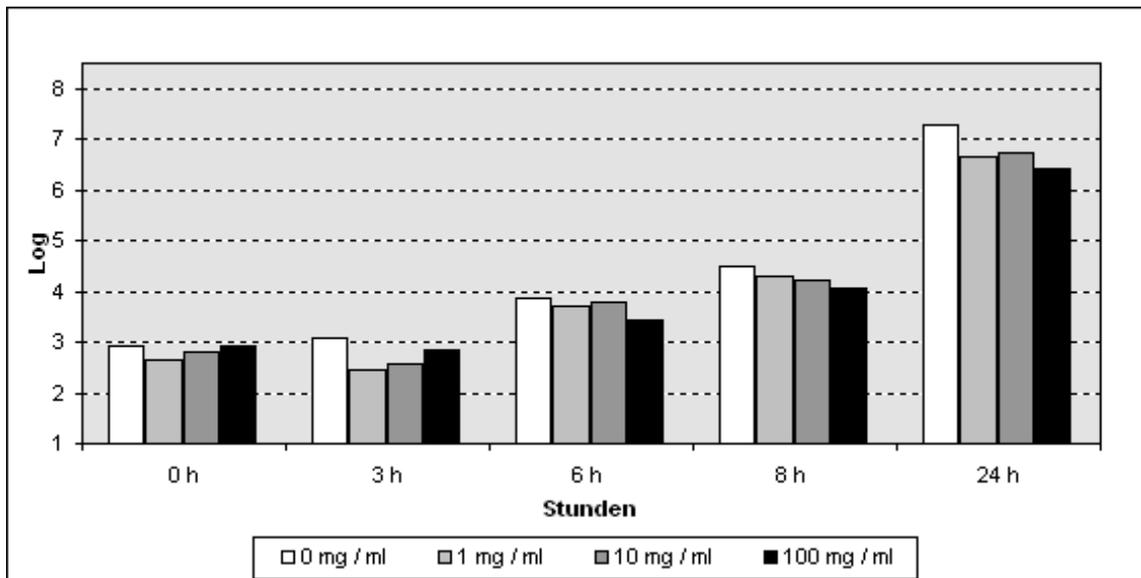
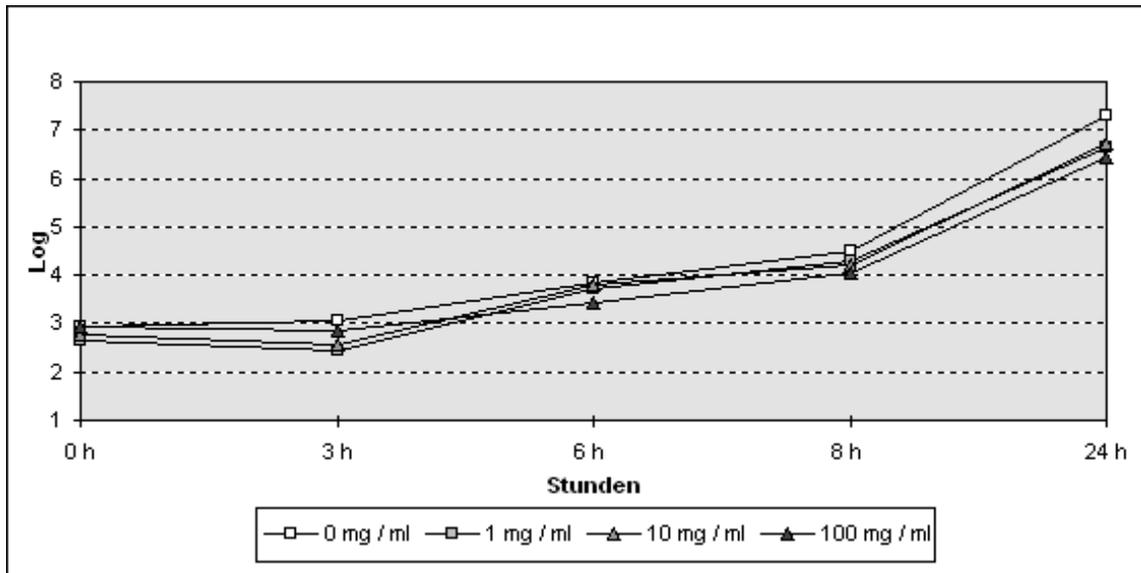
**Bei den Versuchsreihen wurden die Hefen *C. albicans*, *C. glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae* gleichzeitig untersucht. Dabei bezieht sich die Nummerierung der Versuchsreihen auf die steigenden Vitamin-C-Konzentrationen.**

## Versuchsreihe 1 mit *Candida albicans*

Vitamin-C-Konzentrationen von 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml und der Leerkontrolle ohne Vitamin C-Zusatz

Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,94	3,07	3,85	4,48	7,28	5,4
<b>1 mg / ml</b>	2,66	2,45	3,71	4,28	6,66	4,6
<b>10 mg / ml</b>	2,79	2,58	3,78	4,21	6,73	3,6
<b>100 mg / ml</b>	2,92	2,86	3,45	4,05	6,43	2,7



**Abb. 1a/b:** Wachstumskinetik von *Candida albicans* unter Einfluß von Vitamin C in Versuchsreihe 1

## Versuchsreihe 1 mit *Candida glabrata*

Vitamin-C-Konzentrationen von 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml und der Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,75	3,3	4,06	4,47	7,28	5,4
<b>1 mg / ml</b>	2,83	3,25	4,1	4,5	7,52	4,6
<b>10 mg / ml</b>	2,67	2,99	3,88	4,19	7,41	3,6
<b>100 mg / ml</b>	2,72	2,56	2,86	2,71	3,94	2,7

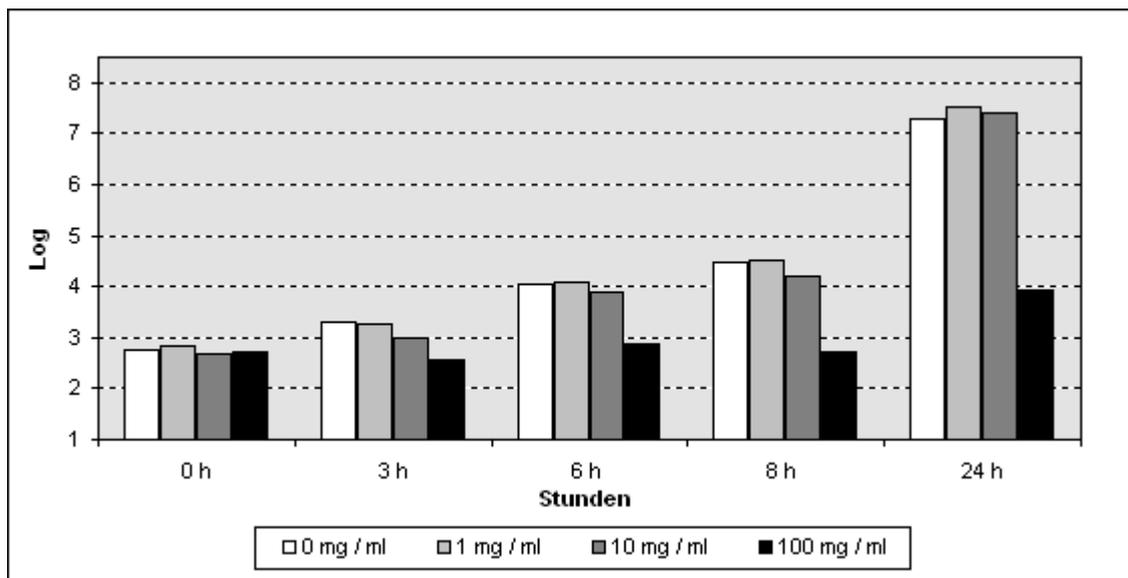
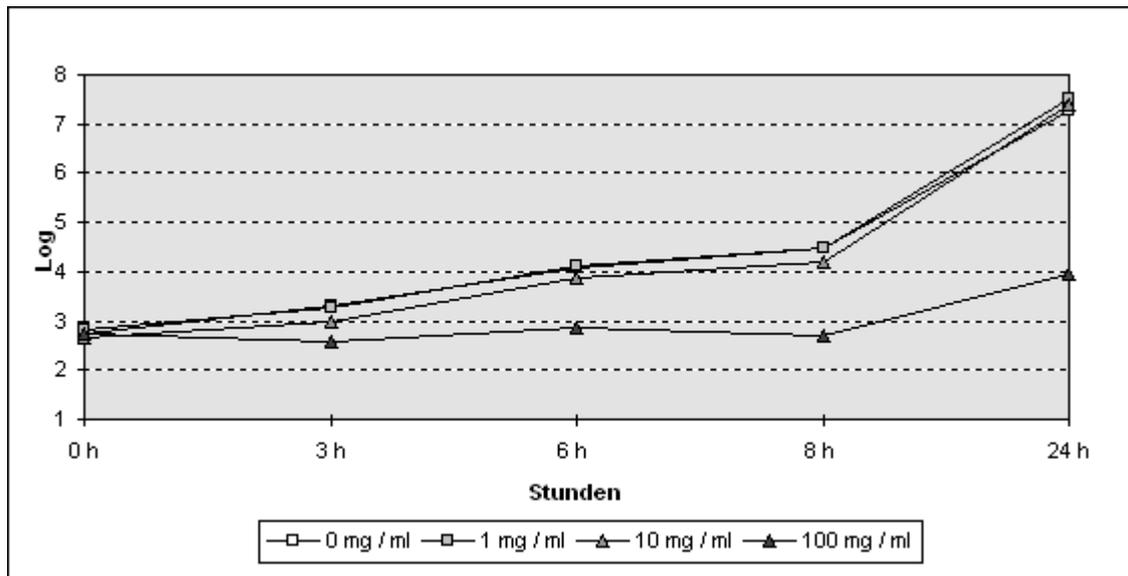


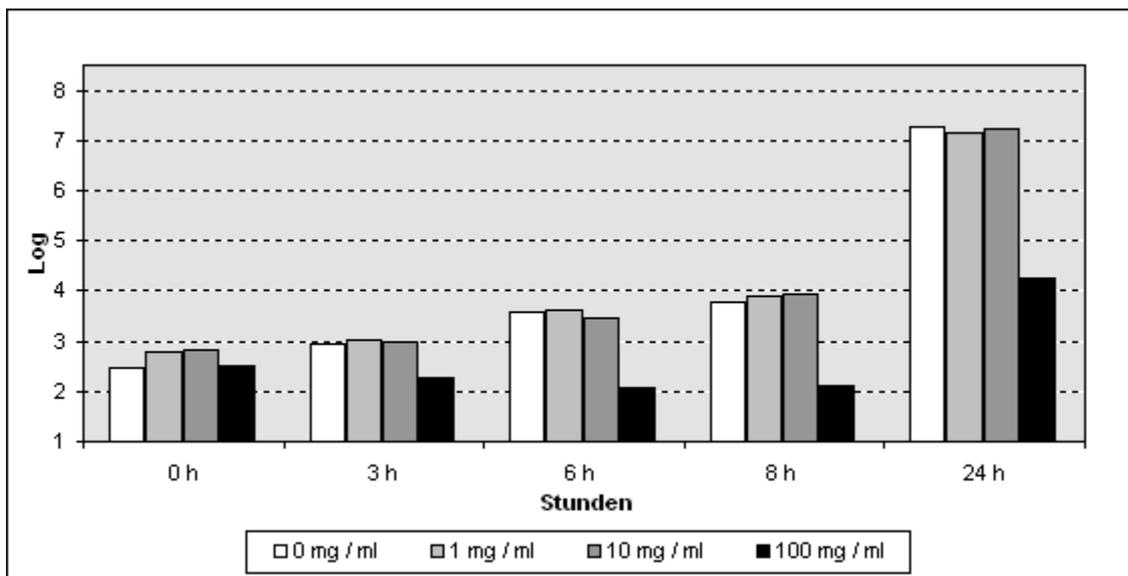
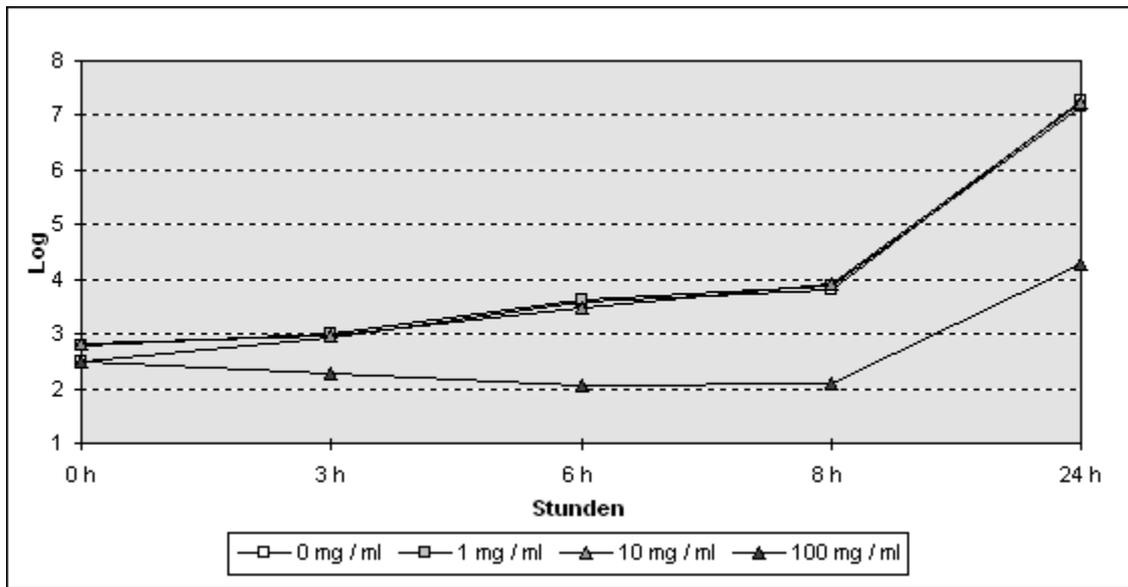
Abb. 2a/b: Wachstumskinetik von *Candida glabrata* unter Einfluß von Vitamin C in Versuchsreihe 1

## Versuchsreihe 1 mit *Saccharomyces cerevisiae*

Vitamin-C-Konzentrationen von 1 mg/ml, 10 mg/ml, 100 mg/ml und der Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,48	2,94	3,58	3,79	7,28	5,4
<b>1 mg / ml</b>	2,79	3,02	3,63	3,89	7,15	4,6
<b>10 mg / ml</b>	2,83	2,98	3,48	3,92	7,25	3,6
<b>100 mg / ml</b>	2,49	2,28	2,06	2,1	4,27	2,7



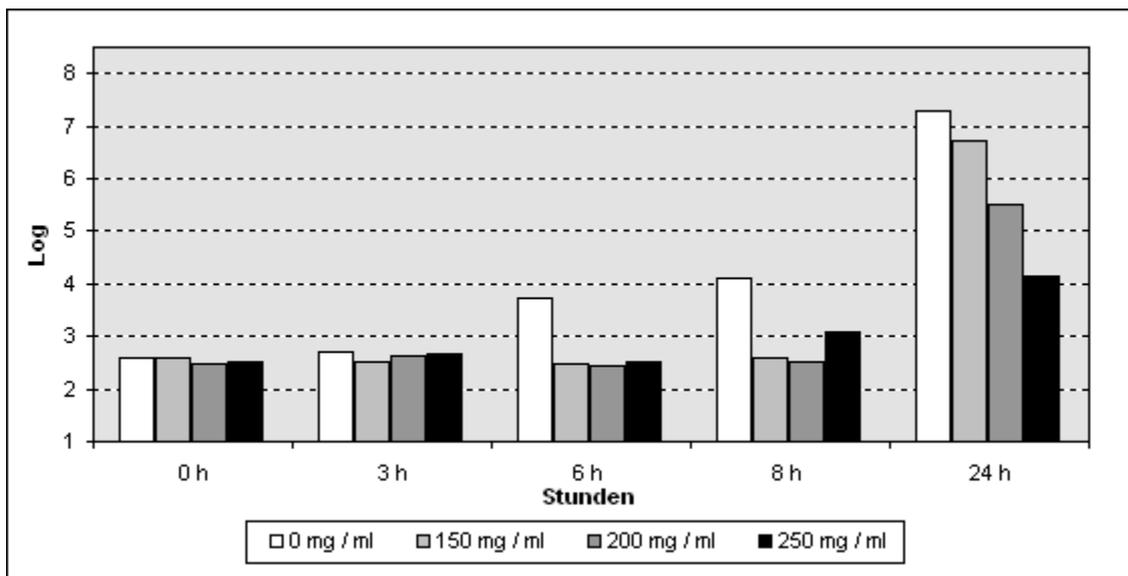
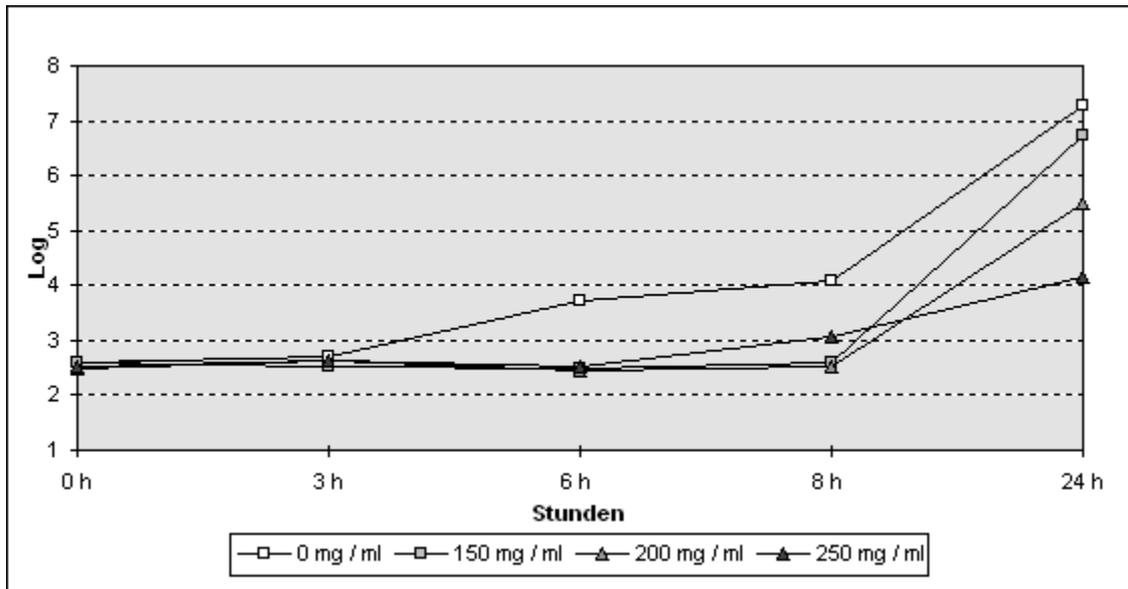
**Abb. 3a/b:** Wachstumskinetik von *Saccharomyces cerevisiae* unter Einfluß von Vitamin C in Versuchsreihe 1

## Versuchsreihe 2 mit *Candida albicans*

Vitamin-C-Konzentrationen von 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml und der  
Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,59	2,69	3,71	4,09	7,28	5,5
<b>150 mg / ml</b>	2,6	2,52	2,47	2,59	6,72	2,5
<b>200 mg / ml</b>	2,49	2,62	2,45	2,52	5,49	2,4
<b>250 mg / ml</b>	2,52	2,65	2,53	3,08	4,16	2,4



**Abb. 4a/b:** Wachstumskinetik von *Candida albicans* unter Einfluß von Vitamin C in  
Versuchsreihe 2

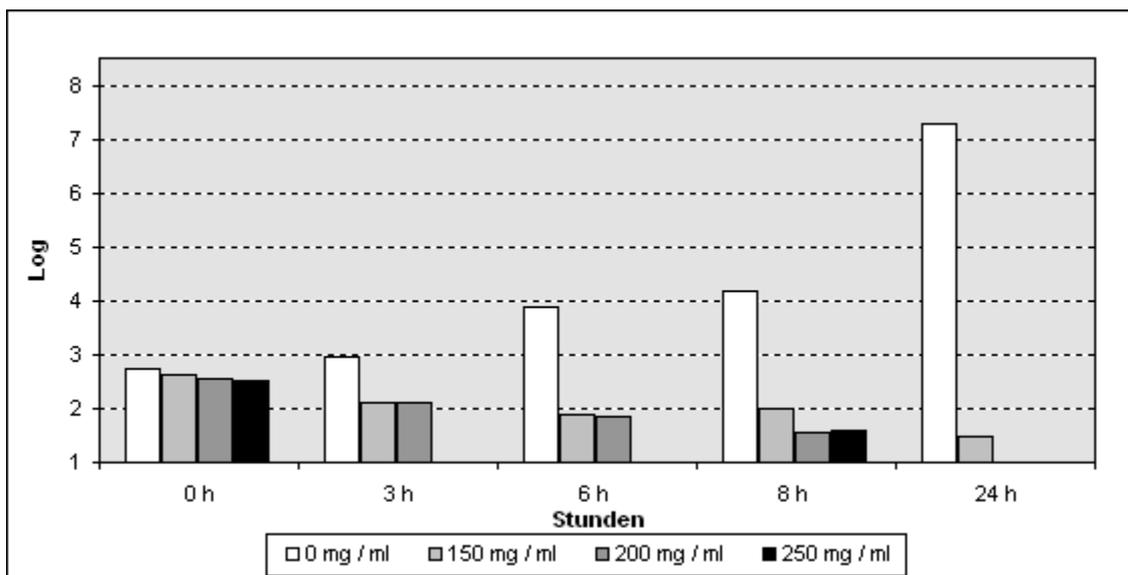
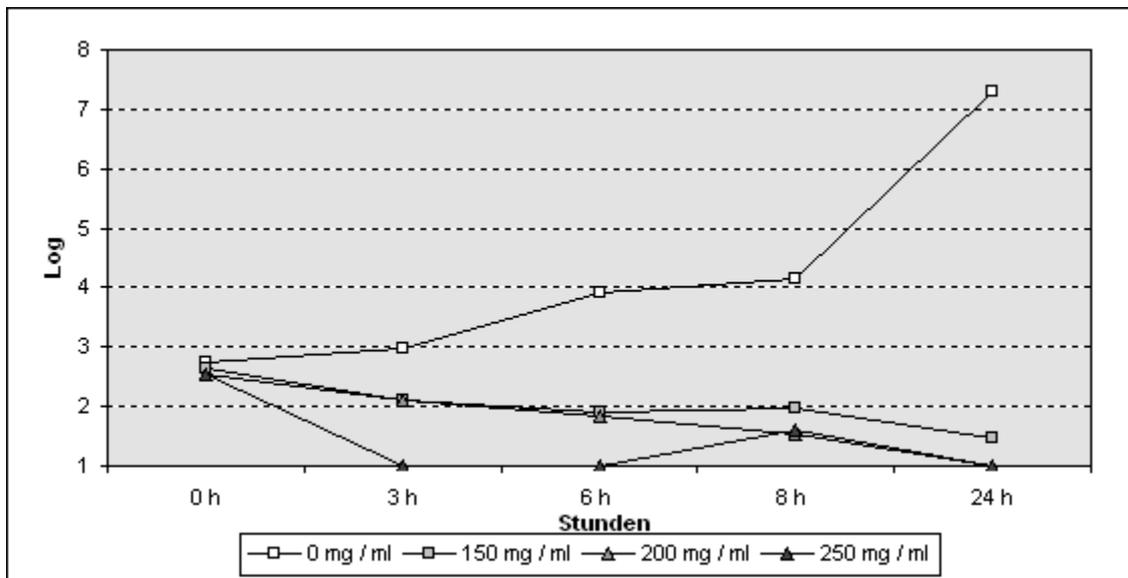
## Versuchsreihe 2 mit *Candida glabrata*

Vitamin-C-Konzentrationen von 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml und der  
Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

### Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,73	2,97	3,9	4,16	7,28	5,5
<b>150 mg / ml</b>	2,63	2,09	1,9	1,98	1,48	2,5
<b>200 mg / ml</b>	2,55	2,09	1,84	1,54	1	2,4
<b>250 mg / ml</b>	2,53	1	1	1,6	1	2,4

$\log 1 < 10$  KBE/ml (Nachweisgrenze)



**Abb. 5a/b:** Wachstumskinetik von *Candida glabrata* unter Einfluß von Vitamin C in  
Versuchsreihe 2

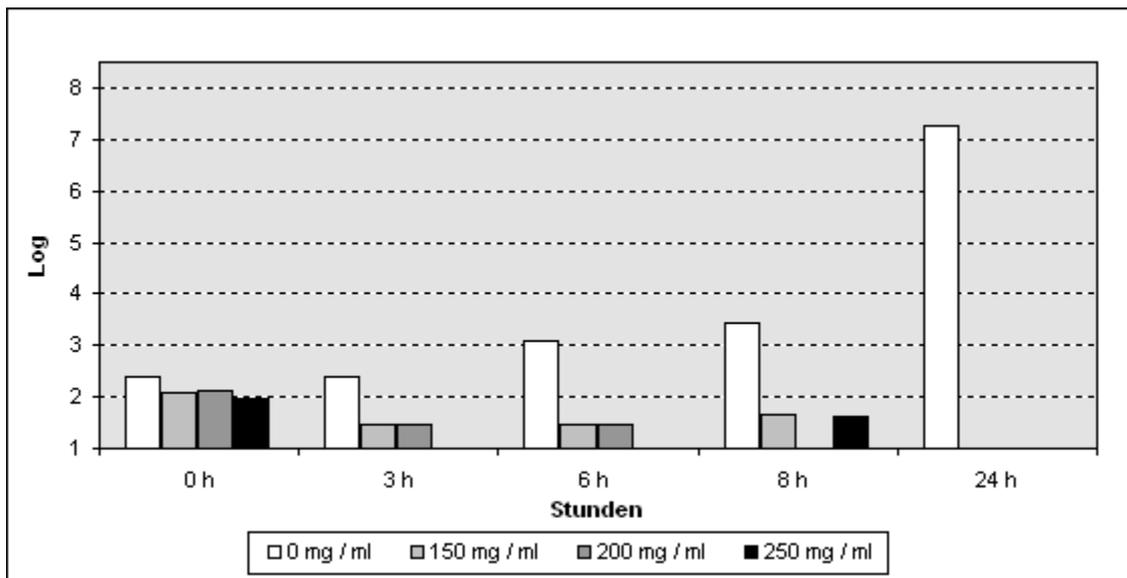
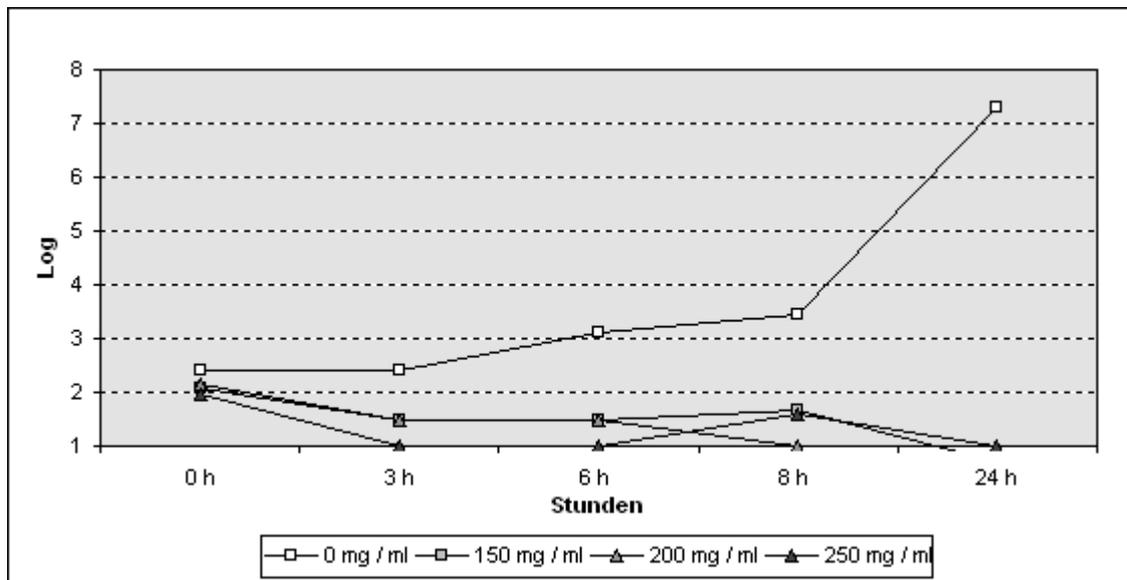
## Versuchsreihe 2 mit *Saccharomyces cerevisiae*

Vitamin-C-Konzentrationen von 150 mg/ml, 200 mg/ml, 250 mg/ml und der  
Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

### Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,4	2,4	3,1	3,43	7,28	5,5
<b>150 mg / ml</b>	2,09	1,47	1,47	1,65	0,69	2,5
<b>200 mg / ml</b>	2,13	1,47	1,47	1	1	2,4
<b>250 mg / ml</b>	1,95	1	1	1,6	1	2,4

$\log 1 < 10$  KBE/ml (Nachweisgrenze)



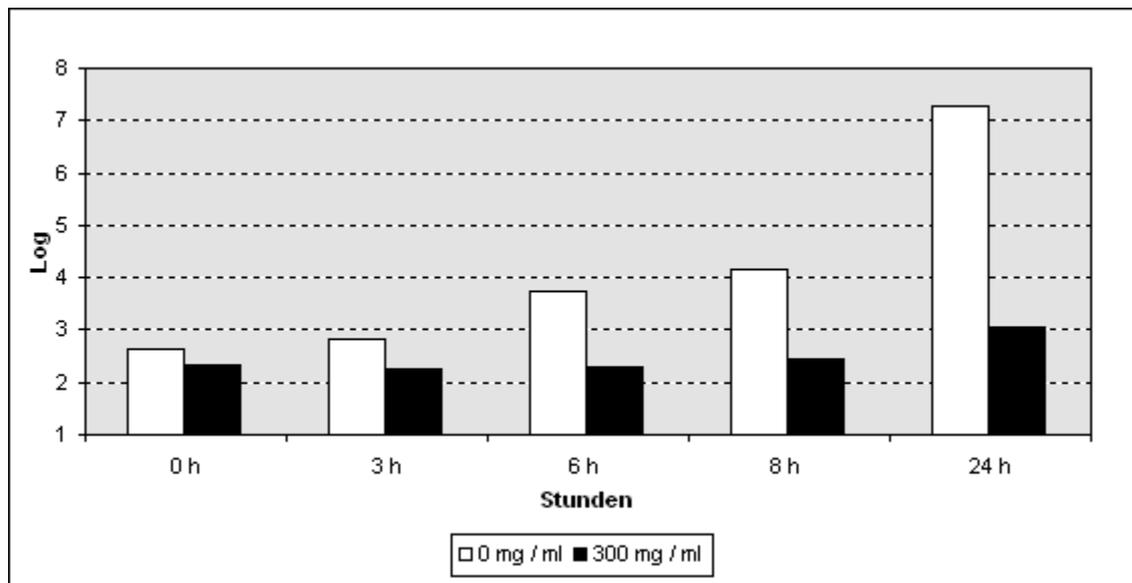
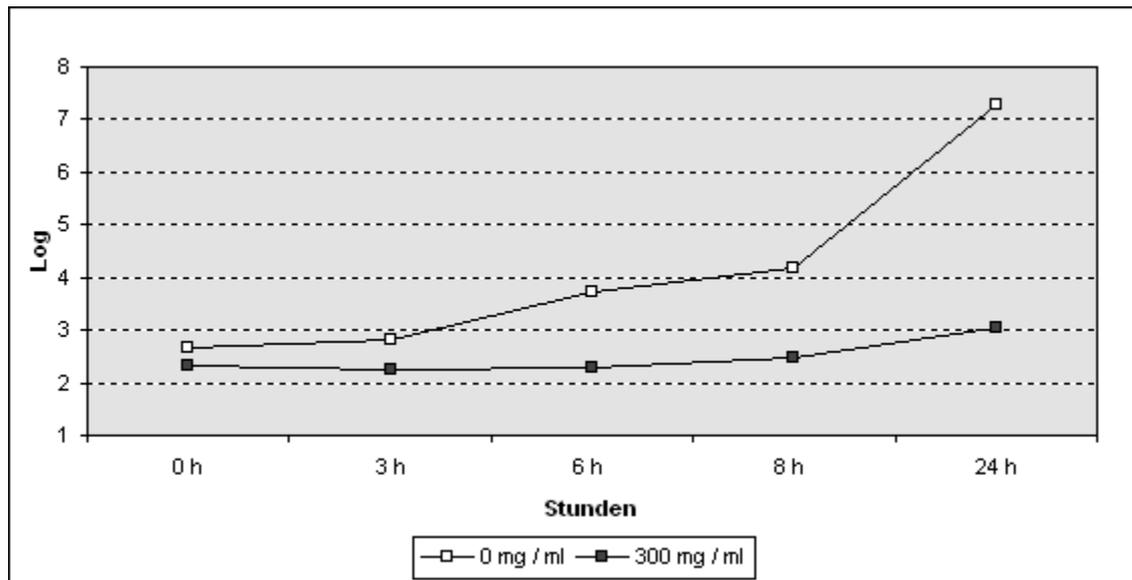
**Abb. 6a/b:** Wachstumskinetik von *Saccharomyces cerevisiae* unter Einfluß von Vitamin C in  
Versuchsreihe 2

### Versuchsreihe 3 mit *Candida albicans*

Vitamin-C-Konzentrationen von 300 mg/ml und der Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,65	2,81	3,74	4,16	7,28	5,3
<b>300 mg / ml</b>	2,34	2,25	2,28	2,46	3,04	2,3



**Abb. 7a/b:** Wachstumskinetik von *Candida albicans* unter Einfluß von Vitamin C in Versuchsreihe 3

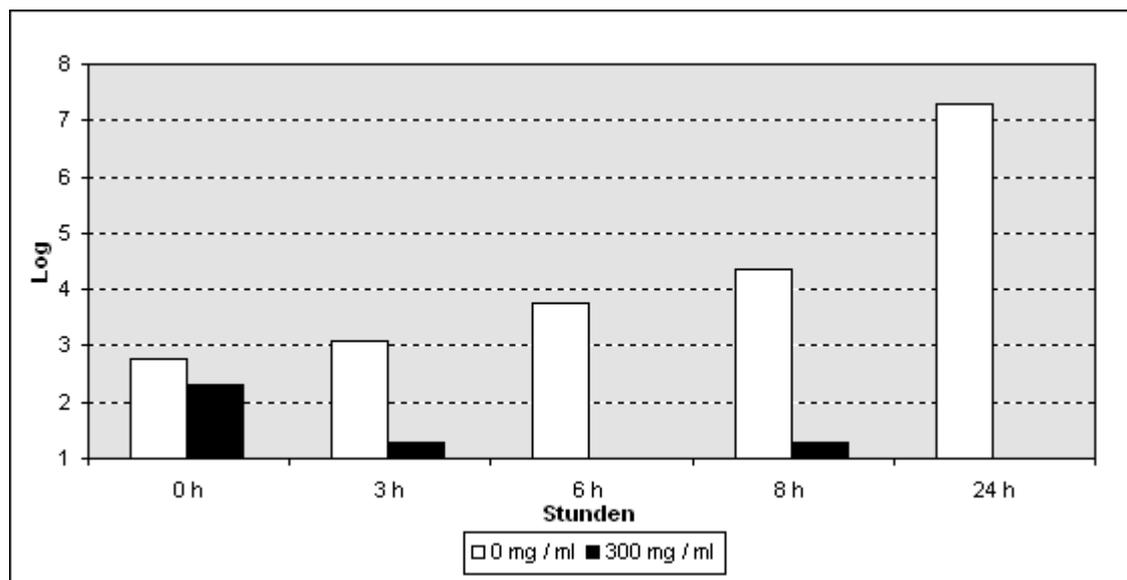
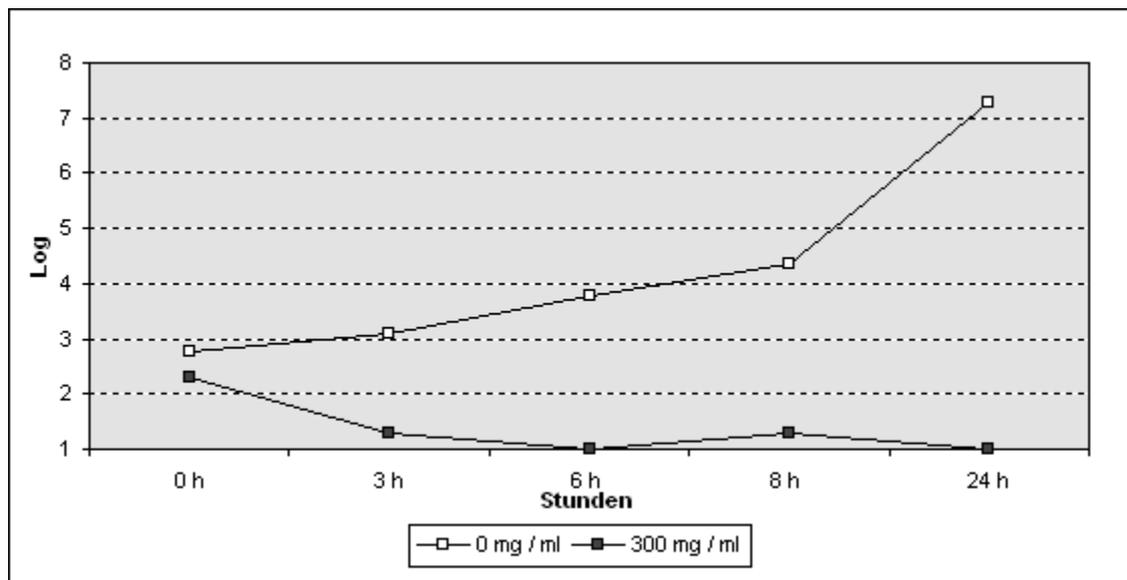
### Versuchsreihe 3 mit *Candida glabrata*

Vitamin-C-Konzentrationen von 300 mg/ml und der Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,78	3,1	3,77	4,37	7,28	5,3
<b>300 mg / ml</b>	2,3	1,3	1	1,3	1	2,3

log 1 < 10 KBE/ml (Nachweisgrenze)



**Abb. 8a/b:** Wachstumskinetik von *Candida glabrata* unter Einfluß von Vitamin C in Versuchsreihe 3

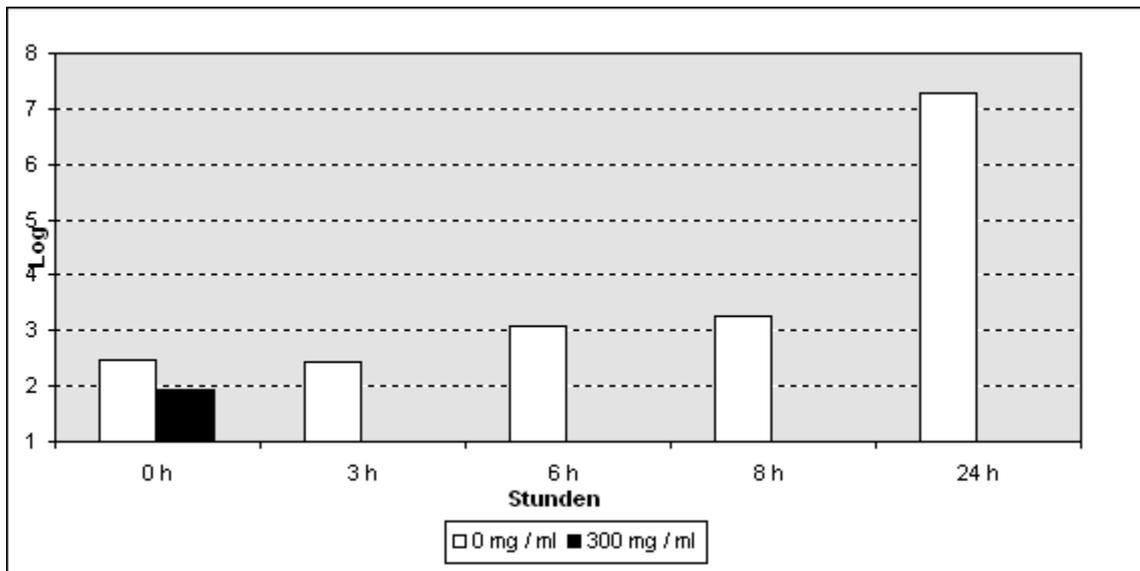
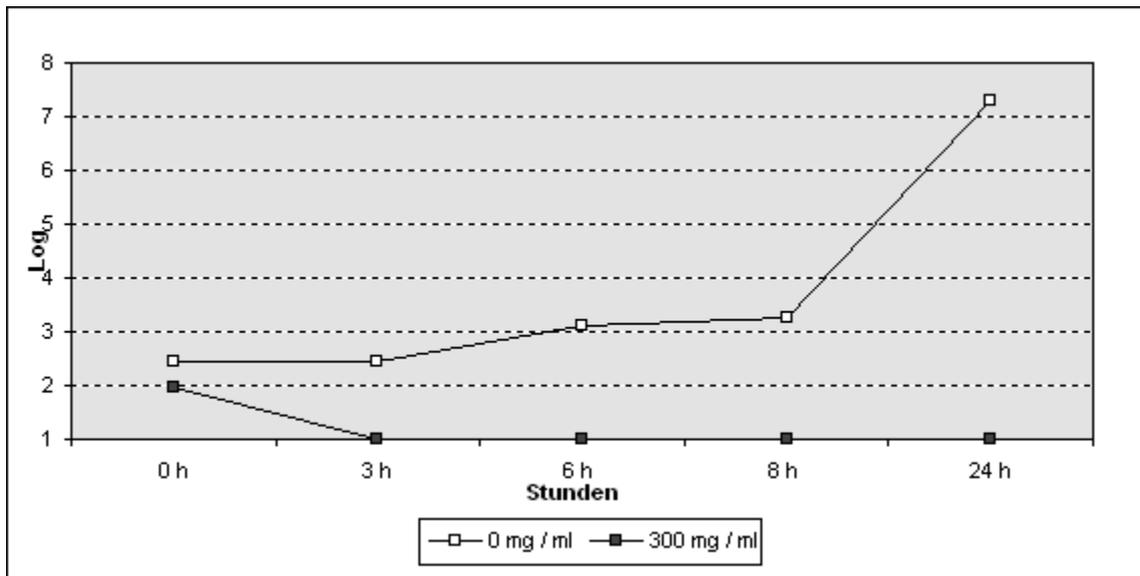
### Versuchsreihe 3 mit *Saccharomyces cerevisiae*

Vitamin-C-Konzentrationen von 300 mg/ml und der Leerkontrolle ohne Vitamin-C-Zusatz

#### Datenreihe 10er Logarithmus

	0 h	3 h	6 h	8 h	24 h	PH-Wert
<b>Vit.-C-Konz.</b>						
<b>0 mg / ml</b>	2,46	2,44	3,1	3,25	7,28	5,3
<b>300 mg / ml</b>	1,95	1	1	1	1	2,3

$\log 1 < 10$  KBE/ml (Nachweisgrenze)



**Abb. 9a/b:** Wachstumskinetik von *Saccharomyces cerevisiae* unter Einfluß von Vitamin C in Versuchsreihe 3

## 5.1 Bewertung der Ergebnisse

Um die Validität der Ergebnisse gewährleisten zu können, wurde jeder Versuch viermal durchgeführt. Aus den Mittelwerten wurden die Endergebnisse erstellt.

In der Versuchsreihe 1, mit der geringsten Vitamin C-Konzentration von 1 mg/ml, sieht man in der Wachstumskinetik im Vergleich zum Leerwert, in dem kein Vitamin C zugesetzt ist, bei allen drei Hefearten keinen Unterschied.

In so geringerer Konzentration scheint Vitamin C weder eine Wachstumsförderung noch eine Wachstumshemmung zu bewirken. Gleiches Ergebnis auch bei einem Zusatz von 10 mg Vitamin C pro ml Nährlösung. Erst bei einer Konzentration von 100 mg/ml Vitamin C zeigt sich vor allem bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida glabrata* eine Wachstumshemmung. Bei *Candida albicans* dagegen ist die Wachstumshemmung in dieser Konzentration sehr gering.

Bei steigender Vitamin C-Konzentration jedoch zeichnet sich bei allen drei Hefen eine zunehmende Wachstumshemmung ab. Dabei fällt auf, dass *Saccharomyces cerevisiae* am empfindlichsten auf steigende Vitamin C-Konzentrationen reagiert, gefolgt von *Candida glabrata*. Als unempfindlichster und zähester Keim stellt sich *Candida albicans* dar.

Eine deutliche Wachstumshemmung erfährt *Candida albicans* erst ab einer Vitamin C-Konzentration von 250 mg/ml. Aber eine Keimtötung findet hier nicht statt, auch bei der Höchstdosis von 300 mg/ml Vitamin C befinden sich bei *Candida albicans*, nach 24 stündiger Bebrütung noch 1100 KBE/ ml (in 10er log = 3,04 KBE /ml).

In der Versuchsreihe 2 hingegen zeichnet sich bei einer Dosis von 200 mg/ml Vitamin C bei *Saccharomyces cerevisiae* schon nach 8 Stunden eine Fungizidie aus, bei *Candida glabrata* dagegen nach 24 Stunden. Bei einer Vitamin C-Konzentration von 250 mg/ml fällt die Keimzahl bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida glabrata* schon innerhalb der ersten drei Stunden unterhalb die Nachweisgrenze.

Ähnliches Ergebnis auch in der Versuchsreihe 3 mit 300 mg/ml Vitamin C.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Vitamin C ab einer Konzentration von 100 mg/ml eine wachstumshemmende Wirkung hat, vor allem auf *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae* weniger auf *Candida albicans*.

Eine fungizide Wirkung jedoch besitzt Vitamin C nur auf *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae* und diese erst ab einer Konzentration von 200 mg/ml Vitamin C.

## 6 Diskussion

### **Vitamin C - ein Substrat für Hefepilze ? Probleme bei den Experimenten**

Ausgangssubstrat für die Herstellung von Vitamin C ist Glucose. Und da Glucose eines der Hauptsubstrate für Hefepilze ist, lag die Vermutung nahe, dass auch Vitamin C ein Substrat für Hefepilze sein könnte. Die Überlegung ging dahin, dass Enzyme im Stoffwechsel der Hefepilze aus weniger verwertbarem oder schlechter verdaulichem Vitamin C durch enzymatische Prozesse die gutverdauliche Glucose herstellen.

Aus diesem Grund wurden bei den Versuchsreihen anfangs kleinste Vitamin C Konzentrationen verwendet um eventuelles Mehrwachstum ausfindig machen zu können. Als dieses kein Mehrwachstum ergab, lag folgende Erklärung nahe: Problematisch bei den Versuchen waren die Nährmedien. Diese enthielten Glucose in ausreichender Konzentration um Hefewachstum zu fördern.

Da Glucose leicht verdaulich ist und das Vitamin C erst durch Enzymprozesse in mehreren Schritten verdaulich gemacht werden muss, war klar, dass der Glucose als Substrat der Vorzug gewährt wird. Um zu beweisen, dass auch Vitamin C als Substrat verwertet werden kann, wenn denn keine Glucose vorhanden ist, musste ein anderer Ansatz gewählt werden.

Daher entstand die nächste Idee, den Glucoseanteil durch Vitamin C zu ersetzen, um zu schauen, ob die Hefen auch nur mit Vitamin C wachsen können. Leider konnten diese Versuche nicht durchgeführt werden, da es sich als problematisch erwies die Nährmedien speziell, d.h. glucosefrei, herstellen zu lassen.

### **Vitamin C - ein Substrat für *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae* ?**

Vitamin C, L-Ascorbinsäure, wird je nach Substratangebot von einigen Hefen, darunter *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae*, selbst synthetisiert. Ob diese Tatsache zwangsläufig bedeutet, dass für diese Hefepilze Vitamin C auch als Substrat in Frage kommt ist fraglich. Lediglich in einer Studie [Costamagna 9. (1986)] wurden zahlreiche Hefepilze auf diese Eigenschaft hin überprüft. Das Ergebnis zeigt, dass von insgesamt 53 getesteten Spezies nur 23 auf Ascorbinsäure wachsen, davon einige *Candida*-Arten und einige *Cryptococcus*-Arten, aber nicht die Spezies *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae*.

**Fazit:** Vitamin C wird von einigen Hefepilzen als Substrat verwendet, nicht jedoch von den Hefepilzen, die bei Vaginalcandidosen eine Rolle spielen oder in der Vagina vorkommen wie *Candida albicans*, *Candida glabrata* oder *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Wann wird Vitamin C im Stoffwechsel einiger Hefepilze synthetisiert ?**

Die Vitamin C-Synthese in den folgenden Hefen ist substratabhängig. Sie entsteht im Stoffwechsel von *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* nur dann, wenn als Substrat L-Galactono-1,4-lacton oder L-Gulono-1,4-lacton vorhanden ist.

Ist aber als Ausgangssubstrat D-Arabinose vorhanden synthetisieren Hefepilze Erythroascorbinsäure, welches für den Stoffwechsel der Hefepilze die gleiche Bedeutung zu haben scheint wie Ascorbinsäure für den Stoffwechsel höherer Lebewesen, wie dem Menschen. Allerdings ist scheinbar nicht Ascorbinsäure sondern vielmehr die Erythroascorbinsäure im Stoffwechsel der Hefepilze von Bedeutung, zumal auch D-Arabinose als Ausgangssubstrat vorherrschend zur Verfügung steht [Hancock et Viola 18. (2002)].

### **Mögliche Gründe für die Beobachtung gehäufter Pilzinfektionen unter Vitamin C**

Pilzinfektionen im vaginalen Bereich (oder auch systemische Pilzkrankungen) können vielfältige Ursachen haben, neben Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, angeborene Immunerkrankungen, Immunschwäche, wie z.B. bei konsumierenden Erkrankungen, Arzneimittelwirkungen und Nebenwirkungen; insbesondere bei Antibiotikatherapie; um nur Einige von Ihnen aufzuzählen. Meist finden sich keine Risikofaktoren. Auch sind viele Frauen (bis zu 15 %) [Petersen/Distler 46. (1999)] asymptomatisch mit *Candida albicans* kolonisiert.

Da Pilze oder Hefepilze relativ anspruchslose Keime sind, die gut auf einem feucht-warmen Milieu mit mäßigem Substratangebot wachsen können und diese Bedingungen in vulvovaginalem Bereich optimal sind, ist es nicht verwunderlich wenn eine oder mehrere begünstigende Faktoren zusammenkommen, die dann zu einer Pilzinfektion führen.

In vitro konnte gezeigt werden, dass Vitamin C das Hefewachstum nicht fördert. Warum kommt es in vivo zu gehäuften Pilzinfektionen ?

Es kommen mehrere Gründe hierfür in Betracht. In jeder Vaginaltablette sind jeweils 250 mg Vitamin C enthalten, daneben auch Siliconharz, Lactose-Monohydrat, Hydroxypropylmethylcellulose und Magnesiumstearat.

Das Präparat Vagi-C<sup>®</sup> wurde entwickelt, um vor allem schwangeren Frauen eine gut verträgliche Alternative zur Antibiotikatherapie bei bakteriellen Störungen der Vaginalflora in der Schwangerschaft zu bieten, da sie ein erhöhtes Frühgeburtsrisiko [Petersen 47.(1999), 48.(2000), Antalffy 2. (2001)] haben.

Vagi-C<sup>®</sup> wird aber auch bei nichtschwangeren Frauen, die an rezidivierender Aminvaginose (bakterieller Vaginose, unspezifischer Kolpitis) leiden, verordnet; oder aber zur Normalisierung einer gestörten Vaginalflora, bzw. zur Verbesserung des vaginalen pH-Wertes.

Einige Frauen entwickeln nach einer Therapie mit Vagi-C<sup>®</sup> wie erwähnt eine Pilzinfektion. In der Dissertationsarbeit von Gabriele Gutmann (1993) waren das 6 von 32 Patientinnen, die eine Pilzinfektion entwickelten. In der Dissertationsarbeit von Katalin Antalffy (2001) "Einfluß von vaginal appliziertem Vitamin C auf den Schwangerschaftsverlauf" waren das insgesamt 21,6 % der Frauen, die unter der Therapie mit Vagi-C<sup>®</sup> in der Schwangerschaft eine Pilzinfektion hatten. In der Kontrollgruppe ohne Vagi-C<sup>®</sup> wiesen nur 10,2 % der Frauen eine Pilzinfektion auf.

Bei bis zu 30 % aller Schwangeren können Pilze im Flour angezüchtet werden. Ursache hierfür sind steigende Oestrogenkonzentrationen in der Gravidität [Braun 6. (1991)].

In der Untersuchung von Frau Gutmann war das Präparat Vagi-C<sup>®</sup> noch nicht gebrauchsfertig bzw. endgültig entwickelt, d.h. die Zusätze sind im Verlauf der Zeit neu zusammengesetzt und das Präparat insgesamt verbessert worden.

1993 sah die Zusammensetzung wie folgt aus: Eine Vaginaltablette enthielt neben **250 mg Vitamin C**, 10 mg Silikon, **680 mg Glucose**, 40 mg Cellulose 10 mg Kollidon 25, 10 mg Magnesiumstearat. Der hohe Glucose-Anteil macht verständlich weshalb in der Arbeit von G. Gutmann Pilzinfektionen aufgetreten sind. Glucose stellt für Pilze/Hefepilze das Hauptsubstrat oder die Hauptenergiequelle dar.

In der Untersuchung von Frau Antalffy (2001) hingegen wurde das 1998 weiterentwickelte Produkt ohne den Zusatz von Glucose verwendet.

Anstatt Glucose enthält es Laktose, ein Disaccharid, welches von Hefepilzen genauso gut als Substrat verwendet wird wie Glucose [Müller/Loeffler 34. (1992)]. Somit könnte die in der Tablette verwendete Laktose das Pilzwachstum begünstigen.

Zum anderen aber gibt es auch andere Aspekte, die die Ursache sein können. Hierzu zählen z.B., dass immerhin 15 % aller Frauen den Hauptkeim für Vaginalcandidosen, *Candida albicans*, im Vaginalbereich aufweisen ohne Beschwerden zu haben [Petersen 44.(1997), 48. (2000)].

Stoffwechselprodukte von Bakterien, sogenannte Dephenylamine und Putrescin [Rodriguez 52. (1999)], welche die Pilze in ihrem Wachstum hemmen, fallen bei der Therapie dieser mit Vagi-C<sup>®</sup> weg und erleichtern somit das Wachstum der Hefepilze.

Somit wird durch die Unterdrückung der Anaerobier, welche bei bakteriellen Vaginosen eine Rolle spielen, die Vermehrung von Hefepilzen begünstigt. Ein ähnliches Phänomen tritt auch bei einer Antibiotikatherapie auf. Dieses bekannte Phänomen könnte mitunter einer der Hauptgründe für eventuelle Pilzinfektionen nach einer Therapie mit Vagi-C<sup>®</sup> sein.

Welche der genannten Gründe in welchem Ausmaß dazu beitragen kann mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Es scheint sich hierbei um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln, wobei alle Teilfaktoren zusammen eine verstärkende bzw. eine synergistische Wirkung haben.

Zumindest einer der die auftretenden Pilzinfektionen begünstigenden Faktoren, nämlich die Zusammensetzung der Vaginaltablette, könnte verbessert werden, indem auf den Zusatz von Kohlenhydraten verzichtet wird oder dieser Anteil durch einen anderen Zusatz ersetzt wird.

Eine Anregung war Vitamin C und somit auch Vagi-C<sup>®</sup> mit einem Antimykotikum zu kombinieren, um dann die eventuell auftretenden Pilzinfektionen mitzubehandeln bzw. diese gar nicht erst entstehen zu lassen.

Diese Idee hat wenig Akzeptanz gefunden, da nicht alle Frauen eine Pilzinfektion entwickeln. Nur bei circa einfüntel der Frauen ist dies der Fall. Da das Präparat Vagi-C<sup>®</sup> hauptsächlich aus reinem Vitamin C besteht und die Substanz Ascorbinsäure gut verträglich und unbedenklich ist, auch aus der Sicht der Pharmakologie und des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB), sollte dieses auch so bleiben und somit auf weitere Zusätze bzw. Kombination mit anderen Mitteln verzichtet werden.

Bei Frauen, die zu Pilzinfektionen neigen und diese nach Therapieende bzw. während der Therapie entwickeln ist immer noch die Möglichkeit gegeben mit einem lokalen Antimykotikum diese zu beheben, bzw. bei chronischen Pilzinfektionen eine orale Therapie in Betracht zu ziehen.

## 7 Zusammenfassung

Vitamin C, welches als Hauptwirkstoff in der Vaginaltablette Vagi-C<sup>®</sup> enthalten ist, wird inzwischen häufig zur Behandlung der Aminvaginose und in der Schwangerschaft zur Verbesserung der Vaginalflora eingesetzt. Ein Nachteil dabei ist, dass Pilzinfektionen insbesondere in der Schwangerschaft häufiger beobachtet werden. Um zu prüfen ob Ascorbinsäure selbst ein Substrat für Hefen ist, wurde das Wachstum von drei Hefearten, welche in der Vagina am häufigsten vorkommen, unter Zusatz steigender Vitamin-C-Konzentrationen in vitro untersucht.

Verwendet wurden *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Keimzahl wurde in Sabouraudlösung auf  $10^2$  eingestellt. Es wurden steigende Ascorbinkonzentrationen von 1mg bis 300 mg zugesetzt und die Kultur bei 37° C bebrütet. Zu verschiedenen Zeiten wurden aliquots von 100 µl entnommen und auf einer Sabourand-Agarplatte ausgespatelt.

Die Kinetikkurven weisen bei allen drei Hefearten keine Wachstumssteigerung durch den Ascorbinsäurezusatz auf. Ganz im Gegenteil, insbesondere bei den Hefen *Candida glabrata* und *Saccharomyces cerevisiae* findet eine starke Wachstumshemmung statt und diese schon ab einer Konzentration von 100 mg/ml Vitamin C.

Bei *Candida albicans* jedoch findet eine Wachstumshemmung erst ab einer Vitamin-C-Konzentration von 150 mg/ml, eine deutliche Wachstumshemmung hingegen erst ab 250 mg/ml statt. Eine Fungizidie zeichnet sich lediglich bei *Candida glabrata* und bei *Saccharomyces cerevisiae* ab. Bei diesen Hefen kommt es zu einer totalen Hemmung bei einer Vitamin-C-Konzentration von 150-200 mg/ml.

Die Wachstumsförderung von Pilzen unter der Behandlung mit dem Präparat Vagi-C<sup>®</sup> muß daher eine andere Ursache haben. Eine Ursache ist wahrscheinlich der Wegfall von Hemmfaktoren für Pilze, die von den beseitigten Anaerobiern stammen.

Ein anderer Grund kann in der Zusammensetzung der Vagi-C<sup>®</sup>-Tablette liegen.

Möglicherweise dient die in der Tablette enthaltene Lactose den Pilzen als Nährsubstrat, weshalb es zu einer stärkeren Vermehrung der Pilze und damit zu Beschwerden kommt.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Abadie F. (1968) "Requirement of several yeasts for hydrosutle vitamins" (French), *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 36(1): 81-93
  
- 2 Antalffy, Katalin (2001)  
 "Einfluß von vaginal appliziertem Vitamin C auf den Schwangerschaftsverlauf" prospektive, vergleichende, randomisierte, nicht doppelblinde Studie, Freiburg i. Br., Univ., Diss.
  
- 3 Bayer, Wolfgang; Schmidt, Karlheinz (1987)  
 "Vitamin C" Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wylen, Basel, ISBN 3-88878-045-4
  
- 4 Beutmann, Werner (1957)  
 "Immunbiologische und chemische Untersuchungen an Hefen", Berlin, Göttingen, Heidelberg. Springer, 1958. Karlsruhe, Univ., Diss. 1957
  
- 5 Brajtburg, Janina; Elberg, Svetlana; Kobayashi, Georg S.; Medoff, Gerald (1989)  
 "Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B" Washington University, School of Medicine, St.Louis, USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapie*
  
- 6 Braun, Angelika (1991)  
 "Bedeutung einer Therapie der vaginalen Hefebesiedlung in der Schwangerschaft unter Berücksichtigung bakterieller Störungen der Vaginalflora und Untersuchungen zur mikroskopischen Hefediagnostik", Freiburg i. Br., Univ., Diss.
  
- 7 Burns, John J., Rivers, Jerry M., Machlin, Lawrance J.(1987)  
 "third conference on vitamin c", *annals of the New York academy of sciences*, volume 498
  
- 8 Chen, K.C.S., P.S. Forsyth, T.M. Buchanan, K.K. Holmes (1979)  
 "Amine content of vaginal fluid from untreated patients with nonspecific vaginitis" *J. Clin. Invest.* 63, 828.

**9** Costamagna L., Rosi I., Garuccio I., Arrigoni O. (1986)

“Ascorbic acid specific utilization by some yeasts”. Canadian Journal of Microbiology. 18(5): 597-600

**10** Davies, Michael B.; Austin, John; Partridge, David A. (1991)

“Vitamin C: its chemistry and biochemistry”, Cambridge: Royal Society of Chemistry, ISBN 0-85186-333-7

**11** Distler, Cynthia Anne (1999)

“Der Stellenwert des Sabouraud-2% Glucose-Flüssigmediums in der Diagnostik von *Candida albicans* bei gynäkologischen Problempatientinnen”, Freiburg i. Br., Univ., Diss.

**12** Dittmar, Ullrich (1974)

“Untersuchungen zur Pathogenität von *Candida albicans*” Hamburg, Univ., Diss., 1973

**13** Forth, Henschler, Rummel (2001)

“Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie”, (8. Auflage), München

**14** Friedrich, Wilhelm (1987)

“Handbuch der Vitamine“ Urban und Schwarzenberg-Verlag, München, Wien, Baltimore

**15** Götz, Hans (1969)

“Humanpathogene Pilze im Tier- und Pflanzenreich“, Vorträge d. 5. wissenschaftl. Tagung d. Deutschsprachigen Mykolog. Ges. in München, Juli 1965. Berlin: Grosse, 1969.-VI,162 S.

**16** Gutmann, Gabriele (1994)

“Vitamin C in der Therapie gynäkologischer Infektionen und seine Wirkung auf Bakterien in vitro“. Freiburg i. Br. Univ. Diss.

**17** Hancock RD., Viola R. (2001)

“The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production : current status and future perspectives”, Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 567-576

- 18** Hancock RD., Viola R. (2002)  
 „Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production“. Trends in Biotechnology 20,  
 299-305
- 19** Hartke, K.; Hartke, H.; Mutschler, E.; Rücker, G.; Wichtl, M. (1991)  
 “DAB 10-KOMMENTAR für Studierende, Wissenschaftliche Erläuterungen zum Deutschen  
 Arzneibuch“ 10. Ausgabe, Band 2: Monographien A-L.  
 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart, Govi-Verlag, GmbH Frankfurt
- 20** Heick HM., Stewart HB., Graff GL. Humpers JE. (1969)  
 “Occurrence of ascorbic acid in the yeast *Lipomyces starkeyi*“. Canadian Journal of  
 Biochemistry. 47(7): 752-3
- 21** Heick HM., Graff GL., Humpers JE. (1972)  
 ”The occurrence of ascorbic acid among yeasts“. Canadian Journal of Microbiologie. 18(5):  
 597-600
- 22** Heizmann, Wolfgang R.; Dermoumi, Heide (1993)  
 “Systemische Pilzinfektionen” Diagnostik, Prophylaxe und Therapie; Stuttgart, Wiss. Verl.-  
 Ges., 158 S. ISBN 3-8047-1216-9
- 23** Hinkel, Stephan (1991)  
 “Einführung einer Methode zur Bestimmung von Vitamin C im Blutplasma und deren  
 Evaluierung an Normalpersonen und Tumorerkrankten“, Freiburg (Breisgau), Univ., Diss.
- 24** Huh, Won-Ki; Yang, Kap-Seok; Seok, Yeong-Jae; Hah, Yung Chil; Kang, Sa-Ouk. (1994)  
 “Characterisation of D-Arabinono-1,4-lactone oxidase from *Candida albicans* ATCC 10231”  
 National University, Republic of Korea
- 25** Huh, Won-Ki; Lee, Byung-Hoon; Kim, Seong-Tae; Kim, Yeon-Ran; Rhie, Gi-Eun; Back,  
 Yong-Woon; Hwang, Cheol-Sang; Lee, Jung-Shin; Kang, Sa-Ouk (1998)  
 “D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*.  
 Molecular Microbiology. 30(4): 895-903

- 26** Isler, Otto; Brubacher, Georg; Ghisla, Sandro; Kräutler, Bernhard (1998)  
“Vitamine II, wasserlösliche Vitamine“, Thieme-Verlag, Stuttgart
- 27** Kim, Seong-Tae; Huh, Won-Ki; Kim, Joo-Yeop; Hwang, Sung-Wook; Kang, Sa-Ouk  
(1996) “D-Arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*“ Seoul National University, South Korea, *Biochimica et Biophysica Acta* 12971-8
- 28** Kvasmikov EI., Gavrilenko MN., Eliseeva GS., Nagornaia SS., Sumnevich VG. (1988)  
“The growth characteristics of ethanol-assimilating yeasts and their synthesis of B-group vitamins” *Mikrobiologicheskii Zhurnal*. 50(5): 30-33
- 29** Lang, Konrad (1965) “Ascorbinsäure” Vorträge und Diskussionen des 11. Symposiums in Mainz April 1964, Darmstadt: Steinkopf, 1965.-VIII, 295 S. Reihe: Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung
- 30** Lelley, Jan (1997) “Die Heilkraft der Pilze” Gesund durch Mykotherapie, Düsseldorf, München, ECON 1997.-236 S. ISBN 3-430-15953-9
- 31** Madan M., Gulati N. (1980)  
“Organic growth factor requirements of some yeasts”. *Microbiosis*.28(113-114): 167-72
- 32** Madan M., Kamra N. (1989)  
“Comparative organic growth factor requirements of nine candida-spp.“ *Acta Biotechnologica*. 9(2).143-148
- 33** Maier Burgoa, Judith (1997)  
“Diagnostik von Vaginalmykosen in der gynäkologischen Praxis”, Diss. Freiburg i. Br., Univ.,
- 34** Müller, Emil; Loeffler, Wolfgang (1992)  
“Mykologie“ 5.Aufl.,Thieme Verlag, Stuttgart, New York

**35** Murata A., Yano N. (1990)

“Killing effect of ascorbic acid on bacteria and yeasts“ . Vitamins (Kyoto). 64(12). 709-714

**36** Niethammer, Anneliese (1947) „Technische Mykologie“ Hefen und Schimmelpilze, Stuttgart: Enke, 1947.-VI, 267 S.

**37** Onofri S., Poerio E., Serangeli P., Tosi S., Garuccio I., Arrigoni O. (1997)

“Influence of L-galactonic acid gamma-lactone on ascorbate production in some yeasts”.

Antonie van Leeuwenhoek. 71(3). 277-280

**38** Peciulis J., Augustaitiene E., Pakarskyte K., Valavicius J. (1969)

“The role of microelements on the accumulation of proteins and some vitamins in yeast cells”.

Antonie van Leeuwenhoek. 35: Suppl: G13

**39** Petersen, Eiko E. (1985)

“Bedeutung der Laktobazillen als Normalflora“. Gynäkologe 18: 131-135

**40** Petersen, Eiko E. (1985)

“Die Aminkolpitis“. Gynäkologe 18: 131-135

**41** Petersen, Eiko E.(1992)

“Erkrankungen der Vulva“, Thieme-Verlag, Stuttgart

**42** Petersen, Eiko E. (1992)

“Therapieresistente rezidivierende Vaginitiden“ Gynäkologe 25: 26-30

**43** Petersen, Eiko E.; Müller, Johannes (1992)

“ Differentialdiagnostik der Vulvovaginal-Candidose“,

Herausgeber: Heinrich Mack Nachf., Karlsruhe

**44** Petersen, Eiko E.(1997)

“Infektionen in Gynäkologie und Geburtshilfe“, Thieme-Verlag, Stuttgart

**45** Petersen, Eiko E.(1998)

“Aminkolpitis/bakterielle Vaginose: Der Einsatz von Vitamin C (Vagi-C<sup>®</sup>) zur Normalisierung der Vaginalflora“ gyne 19, Heft 3, 65-69

**46** Petersen, Eiko E., C. Distler (1999)

“Vorkommen von Hefepilzen im Vulvovaginalbereich bei symptomatischen und asymptomatischen Frauen“ Geburtsh. Frauenheilk. 59, 470-474

**47** Petersen, Eiko E. (1999)

“Infektionsbedingte Spätaborte/Frühgeburten: Prophylaxe durch intravaginale Applikation von L-Ascorbinsäure“, gyne 20, Heft 7, 203-208

**48** Petersen, Eiko E. (2000)

“Aminvaginose, Prävention von Frühgeburten: Einfluß von Vitamin C (Vagi-C<sup>®</sup>) auf das Wachstum von Hefepilzen in der Vagina“, gyne 21, Heft 10, 253-255

**49** Reid, Gregor; Soboh, Foad; Bruce, Andrew W.; Mittelman, Marc (1998)

“Effect of nutrient composition on the in vitro growth of urogenital lactobacilli and uropathogens” Can. J. Microbiol. 44: 866-871

**50** Reinhard, Ernst (1995)

Pharmazeutische Biologie Band 1, Cytologie, Genetik, Physiologie, Viren, Bakterien, Pilze, Algen, Morphologie, Histologie und Anatomie des Kormus, Samenpflanzen, 5. Aufl.-1995.-XV, 603 S. ISBN 3-8047-1365-3

**51** Roche (1959)

“Die Vitamine, 25 Jahre Vitamin-C-Synthese“ Deutsche Hoffmann-La Roche AG Grenzach, Baden

**52** Rodrigues A.G., P.A. Mardh, C. Pina-Vaz, J. Martinez-de-Olivera, A.F.da Fonceca (1999)

“Is the lack of occurrence of bacterial vaginosis and vaginal candidosis explained by the presence of bacterial amines“ Am J. Obstet. Gynecol. 181, 367-370

- 53** Salfelder, Karlhanns; Sauerteig, Eberhard (2000)  
“Pilzinfektionen beim Menschen“, 1. Aufl., Hamburg
- 54** Schneider H., Biely P., Latta R., Lee H., Dorscheid D., Levy-Rick S. (1990)  
“Utilization by yeasts of D-glucorate, galactarate, and L-tartate is uncommon and occurs in strains of *Cryptococcus* and *Trichosporon*“. *Canadian Journal of Microbiology*. 36(12):856-8
- 55** Schirren, Carl (1962)  
“Hefepilze als Krankheitserreger bei Mensch und Tier“ Hamburg 1962, Berlin: Springer, 1963.-VI, 148 S.
- 56** Schwantes, Hans Otto (1996)  
“Biologie der Pilze“ Ulmer Verlag, Stuttgart
- 57** Shennan JL., Levi JD. (1974)  
“The growth of yeasts on hydrocarbons“. *Progress in Industrial Microbiology*. 13: 1-57
- 58** Smirnoff, N. (2001)  
“L-ascorbic acid biosynthesis“. *Vitamin & Hormones*. 61: 241-66
- 59** Vidotto V., Bruatoo M., Caramello S., Bugnone C. (1990)  
“Growth of opportunistic yeasts on vitamin-free solid medium“. *Microbiologica (Pavia)*. 13(2): 151-156
- 60** Viola, Severino (1972) „Die Pilze“ Übers. aus dem Italien. v. Ilse Maier-Popp/Severino Viola. München: Hirmer, 1972.-55 S. Einheitssacht.: I Funghi come sono <dt.>
- 61** Weber, Herbert (1993)  
“Allgemeine Mykologie“, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- 62** Winner, Harold Ivor; Hurley, Rosalinde (1964)  
“*Candida albicans*“ London: Churchill, 1964.-X, 306 S. (engl.)

## Danksagungen

An erster Stelle möchte ich hier Professor Petersen danken, vor allem für das überaus interessante Thema, welches mir bei der Bearbeitung dieser außerordentliche Freude bereitet hat.

Zum anderen aber auch für seine freundliche Unterstützung und für seine Geduld.

Besten Dank auch an Professor Daschner, zum einen für die Bereitstellung und Nutzung seines Laboratoriums, zum anderen für die Zweitkorrektur und das Gutachten dieser Arbeit.

Ohne die freundliche Hilfe der Medizinisch Technischen Assistentinnen wäre diese Arbeit weiterhin nicht möglich gewesen, besonderen Dank an Frau Inge Engels und Ihren Kolleginnen.

Auch besten Dank an Michael Schidlo, ein Freund, der mir bei Problemen am Computer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meiner Familie gewidmet.

## Lebenslauf

Name: Gülcan Anbarci  
 Geburtstag und –ort: 17.07.68 Gökcebey/ Türkei  
 Familienstand: ledig  
 Nationalität: deutsch

## Schul Ausbildung

1975-78 Grundschule, Unterneustätter Schule, Kassel  
 1978-79 Grundschule, Struttbachweg Schule, Kassel  
 1979-80 Hauptschule, Hegelsberg Schule, Kassel  
 1980-82 Realschule, Hegelsberg Schule, Kassel  
 1982-90 Gymnasium und Abitur, Goethe Gymnasium, Kassel

## Tätigkeiten vor dem Studium

10/1990-01/91 Teilzeitjob in der Gastronomie  
 02/1991-03/91 Krankenpflegepraktikum, Städtische Kliniken, Kassel  
 04/1991-12/91 Vollzeitjob in der Gastronomie  
 02/1992-09/92 Freiwillige Soziale Helferin, Städtische Kliniken, Kassel

## Studium

10/1992 Beginn Studium der Humanmedizin an der Uni. Freiburg  
 03/1997 Ärztliche Vorprüfung  
 08/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 10/2000-08/01 Praktisches Jahr im Diakonie Krankenhaus Freiburg,  
 Wahlfach Gynäkologie  
 11/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 7/2002-12/2003 Ärztin im Praktikum, Klinik für Tumorbiologie, Freiburg  
 1/2004 Approbation

Deckblatt:

Ein elektronenmikroskopisches 3D-Bild vom Vitamin C-Molekül (mit einer 3D-Brille zu betrachten).

Quelle:

Forth, Henschler, Rummel "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie", (2001); (8. Auflage), München