تأثير كمية الكوبالت المضافة لوسط التخمير على إنتاجية فيتامين B12 من مصل الجبن باستخدام بكتريا Propionibacterium freudenreichii

*. م. آمنة جرجنازي ** أ.د. شريف صادق *** أ.د. ياسر العمر

(الإيداع: 22 تشرين الأول 2019، القبول 10 حزيران 2020)

الملخص:

يعد فيتامين B12 هاماً للإنسان و الحيوان ، ويستعمل بشكل واسع في الصناعات الغذائية والدوائية ، يستعمل كمكمل غذائي ولعلاج فقر الدم الخبيث والتهاب الأعصاب . ويعد إنتاج فيتامين B12 بالطرق الميكروبيولوجية عن طريق التخمير أسهل وأقل تكلفة مقارنة مع إنتاجه بالطرق الكيميائية .

أجريت الدراسة على إنتاج فيتامين B12 من مصل الجبن باستخدام بكتيريا *Propionibacterium freudenreichii* تحت ظروف لا هوائية عند درجة حرارة30°C لمدة ثلاث أيام.

أثبتت الدراسة أن أفضل إنتاجية لفيتامين B12 عند اختبار خمس تراكيز من الكوبالت (0–5–10–15–20) كانت عند تركيز الكوبالت 10 mg/L فقد بلغت إنتاجية فيتامين B12 556.03 µg/100 mL في الوسط و 1693.9 µg/100 mL داخل الخلايا الميكروبية.

الكلمات المفتاحية: vitamin B12, cobalamin, pseudovitamin B12, Propionibacterium freudenreichii

*مهندسة غذائية – ماجستير تقانة حيوية – طالبة دكتوراه في كلية الهندسة البترولية والكيميائية – قسم الهندسة الغذائية .

**أستاذ دكتور في جامعة البعث – كلية الهندسة البترولية والكيميائية – قسم الهندسة الغذائية .

***أستاذ دكتور في جامعة حماه – كلية الطب البيطري – قسم أمراض الحيوان

Effect of the amount of cobalt added to the fermentation medium on the productivity of vitamin B12 from cheese whey by Propionibacterium freudenreichii

*E. Amena Jarjanazii **Prof. Dr. Sharef Sadik *** Prof. Dr. Yaser Alomar

Abstract :

Vitamin B12 is considered important for humans and animals. It is used widely in food and pharmaceutical industries. As It is considered as a dietary supplement and in the treatment of malignant anemia and neuropathy. Using Biotechnology production of vitamin B12 via microbiological the techniques is a cheaper method for companies than the production using chemical methods, In addition , the fermentation methods are easier compared to chemical methods.

In this study, Vitamin B12 was produced from cheese whey using *Propionibacterium freudenreichii* bacteria under anaerobic conditions.

The study reported that the best yield of vitamin B12 was achieved at the concentration 10 mg / L of cobalt when 5 concentrations of cobalt (0 –5 –10 – 15–20) mg / L were added. The vitamin B12 production was 556.03µg / 100 ml in the medium and 1693.9 µg / 100 mL into the microbial cells.

Keywords: *Propionibacterium freudenreichii*, vitamin B12, cobalamin, pseudovitamin B12.

---

* Food Engineer – Master of Biotechnology – PhD student at the College of Petroleum and Chemical Engineering – Department of Food Engineering.

** Professor of Al–Baath University – College of Petroleum and Chemical Engineering – Department of Food Engineering

*** Professor at the University of Hama – Faculty of Veterinary Medicine – Department of Animal Diseases

1-المقدمة:

تعد بنية فيتامين B12 أو الكوبالامين ذو الصيغة الكيميائية $C_{63}H_{88}CO\ N_{14}O_{14}P$ معقدة وتتكون من حلقة كورين مع ذرة الكوبالت المركزية وبالتالي يعد عنصر الكوبالت مهم جداً في إنتاجه ، ويعد فيتامين B12 قابل للانحلال في الماء ويعد ذو أهمية للعمل الطبيعي للدماغ والجهاز العصبي ، وله دور في تحفيز تشكيل الكريات الدموية الحمراء وهو فيتامين من أصل حيواني مثل الكبد واللحوم الحمراء والدواجن . تبلغ الكمية المطلوبة منه يومياً حوالي 5 ميكروغرام ويخزن بكميات كبيرة في الكبد وبالتالي نقص هذا الفيتامين ينتج عادة عن الفشل في امتصاصه وليس لنقصه في الغذاء . يعد فيتامين B12 فيتامين مهم للإنسان و الحيوانات. يستخدم لعلاج فقر الدم الخبيث والتهاب الأعصاب ، ويستخدم كمكمل غذائي ، كما يضاف فيتامين B12 في الأعلاف الحيوانية الهامة كمحسن للنمو (Hunik و Jan–Hendik ، 2002 ؛Ball ، 1998 ؛ Watanabe، 2007).

-أعراض نقص فيتامين B12:

العلامات الرئيسية لنقص فيتامين B12 هي فقر الدم الخبيث و الاعتلال العصبي. يكون النباتيون والمسنون أكثر عرضة للإصابة بنقص فيتامين B12 بالنسبة لغير النباتيين و يجب عليهم تناول الأطعمة المحصنة بالفيتامين B12 أو المكملات الغذائية المحتوية على فيتامين B12 لمنع نقص فيتامين B12 (Watanabe، 2007) .

يرتبط نقص فيتامين B12 بأعراض عصبية متعددة تتراوح من النسيان والإرهاق إلى الاضطرابات العصبية الوخيمة التي لا رجعة فيها (Reynolds، 2006) . ويعد فيتامين B12 فيتامين أساسي مطلوب للحفاظ على الخلايا العصبية السليمة لإنتاج المواد الوراثية للطاقة والطاقة وللوظائف الهامة الأخرى (Rabah وزملاؤه ، 2017 ؛ Wang وزملاؤه ، 2015 ؛ Piao وزملاؤه ، 2004) .

-المصادر الغذائية لفيتامين B12 :

يتركز فيتامين B12 الذي تركبه البكتيريا بشكل أساسي في أجسام الكائنات الحية الأعلى في نظام السلسلة الغذائية الطبيعية. تعتبر الأطعمة الحيوانية (مثل اللحوم والحليب والبيض والسمك والمحار) المصادر الغذائية الرئيسية لفيتامين B12 أما الأغذية النباتية لا تحتوي على فيتامين B12 (Watanabe، 2007 ؛ Ball، 1998).

يوجد فيتامين B12 بشكل طبيعي فقط في الأطعمة ذات الأصل الحيواني ومن خلال معالجة الأطعمة النباتية المخمرة أو المنتجات المدعمة (Watanabe وزملاؤه، 2013؛ Truswell، 2007). ووفقًا لإحصائية أعدتها منظمة الصحة العالمية عام (2008) ، قد يسبب نقص فيتامين B12 ونقص حمض الفوليك مشكلات صحية عامة في جميع أنحاء العالم. ينتشر عوز B12 على وجه الخصوص في البلدان النامية بسبب عدم كفاية استهلاك الأغذية الحيوانية (Marsh وزملاؤه، 2012 ؛ Allen، 2009).

يواجه النباتيون و المسنون في البلدان الأكثر ثراء خطر نقص فيتامين B12 (Pawlak وزملاؤه، 2014؛ Allen ، 2010). بالإضافة لذلك فإن الاهتمام الحالي لاستبدال البروتينات الحيوانية بالبروتينات النباتية يمكن أن يخفض من استهلاك الغذاء الغني بفيتامين B12 في المستقبل (Marsh وزملاؤه، 2012؛ Singer و Elmadfa، 2009). لذلك يمكن أن يكون الحل المستدام لمعالجة نقص B12 هو تدعيم المنتجات النباتية بفيتامين B12 ويفضل بالوسائل الطبيعية مثل التدعيم بالتخمير باستخدام الكائنات الدقيقة المنتجة لفيتامين B12.

يعد إنتاج فيتامينB12 بالطرق الكيميائية مكلف كثيراً فتم التوجه لاستخدام البكتيريا اللبنية في إنتاج فيتامين B12 في المنتجات الغذائية المخمرة. أكتشف في العقد الماضي التدعيم الطبيعي للأطعمة بالفيتامينات عن طريق التخمير بالبكتريا التي تتبع الدرجة الغذائية (Burgess، 2009؛ LeBlanc وزملاؤه، 2011؛ Capozzi وزملاؤه، 2012؛ Patel وزملاؤه،

2012). تستخدم هذه الطريقة لزيادة القيمة الغذائية للمنتجات الغذائية دون زيادة تكاليف الإنتاج ، كما تسمح للمستهلكين بتعزيز مدخولهم من الفيتامينات في نظامهم الغذائي المعتاد (LeBlanc وزملاؤه، 2011) ويقضي على الحاجة إلى المكملات الغذائية باستخدام مستحضرات الفيتامين المركبة كيميائياً (Capozzi وزملاؤه، 2012).

أظهرت عدة سلالات تابعة لأنواع من جنس *Lactobacillus* مثل *L. plantarum , L. reuteri, L. rossia* قابلية إنتاج فيتامين B12 ومازالت الأبحاث للتمييز بين أشكال B12 المختلفة نادرة ومرتبطة فقط بإنتاج Pseudovitamin B12 . يختلف Pseudovitamin عن الشكل الفعال من خلال وجود الأدنين في الموقع (DMBI) 5,6- dimethylbenzimidozoie . أما عند استخدام بكتيريا *P. ferudenrichii* يركب (DMBI) وينشط من خلال ميزة أنزيم cobT2/ BLUB بينما مقدرة *Lactobacillus* على تركيب (DMBI) لم تثبت حتى الآن Hunik و Jan–Hendik ، (2002) .

يضاف الكوبالت و DMBI (5,6 – dimethylbenzimidazole) عند الإنتاج الصناعي لفيتامين B12 ، حيث يعتبر الكوبالت ضرورياً لتشكيل حلقة كورين ويعتبر DMBI ضروري لتشكيل وروابط جزيء فيتامينB12 .

(Hugenschmidt وزملاؤه، 2011؛ Martens وزملاؤه، 2002؛ Marwaha وزملاؤها، 1983) .

لا يسمح بإضافة أي من هذه الركائز في التطبيقات الغذائية واستراتيجيات إغناء الأغذية بفيتامين B12. تعتبر *P.freudenreichii* من بين الكائنات الحية الدقيقة التي تستخدم عادة لإنتاج فيتامين B12 هي البكتيريا الوحيدة المدرجة غذائياً ذات القدرة على تركيب DMBI وبالتالي أصبحت مرشحًا قوياً صالحًا لإنتاج فيتامين B12 في عمليات التخمير الغذائي (Bykhovsky وزملاؤه، 1998) .

بدأ البحث في إنتاج فيتامين B12 بواسطة *P. freudenreichii* بعد فترة وجيزة من اكتشاف القدرة على إنتاج B12 بواسطة الكائنات الحية الدقيقة (Rickes وزملاؤه، 1948) .

قد تكون سلالات *P. freudenreichii* هي أكثر الأنواع البكتيرية المواتية للإنتاج الصناعي لفيتامين B12 نظرًا للاعتراف بها عمومًا كحالة آمنة (GRAS) وقدرتها على إنتاج الأشكال النشطة لفيتامين B12. ومع ذلك يستخدم حاليًا في إنتاج فيتامين B12 تجاريًا سلالات معدلة وراثيًا من *P. freudenreichii* (بدون حالة GRAS)

(Roman وزملاؤه، 2001؛ Miyano و Shimizu ، 2000؛ Blanche وزملاؤه، 1989) .

تعد بكتريا *P.ferudenrichii* بكتريا ايجابية الغرام غير متحركة لا هوائية مرافقة لصناعة الألبان حيث تستعمل تقليدياً في صناعة الأجبان (ايمنتال – الجبن السويسري ....) ، ويعد تركيزها أعلى في الجبن السويسري أكثر من أنواع الأجبان الأخرى (Hunik و Jan–Hendik ، 2002).

- تنمو بكتريا *Propionibacterium freudenreichii* في الجبن السويسري بوجود حمض اللبن كمصدر الكربون ،كما أن الجبن السويسري غني بالنيتروجين القابل للذوبان هذا يدعم نمو بكتريا *P.freudenreichii*
- وبالتالي فإن وسط النمو يعتمد على لاكتات الصوديوم ومصدر للنتروجين مثل مستخلص الخميرة بحيث يشبه بيئياً الظروف التغذوية الموجودة في الجبن السويسري (Hugenschmidt وزملاؤه، 2011؛ Dalmasso وزملاؤه، 2012) .

قام Molina وزملاؤه (2012) بتزويد حليب الصويا المخمّر باستخدام السلالة L. reuteri 1098 لتصحيح أعراض نقص فيتامين B12 في الفئران الحوامل ، وقد تم تحليل B12 في هذه الدراسات مع الفحص الميكروبيولوجي والذي يفتقر إلى خصوصية التمييز بين الشكل الفعال من B12 من الشكل غير الفعال للجسم البشري .

درست Hugenschmidt وزملاؤها (2011) إنتاج حمض الفوليك وفيتامين B12 باستخدام *Lactobacillus plantarum* DF13 *Propionibacterium freudenreichii* , SM39 في المصل حيث تم تزويد الوسط بمستخلص الخميرة وكوبالت

5 mg/L , 15 mg/L DMBI , حيث تم التخمير على مرحلتين : ثلاث أيام تخمر لاهوائي وأربع أيام تخمر هوائي حيث تم إنتاج 353 ng/mL +/- 751 فيتامين B12 .

درست Hugenschmidt وزملاؤها (2010) 151 سلالة من البكتيريا اللبنية LAB و 100 سلالة من البكتيريا البروبيونية PAB المستخدمة في إنتاج فيتامين B12 وحمض الفوليك من المصل . أثبت أنه تحققت أعلى إنتاجية من فيتامين B12 عند استخدام بكتيريا *Propionibacterium freudenreichii* DF15 حيث بلغت 2.5 µg/mL .

قام Xia وزملاؤه (2015) بإنتاج فيتامين B12 باستخدام بكتيريا *Pseudomonas denitificans* من شراب المالتوز والمنتج الثانوي لصناعة النشاء من الذرة بظروف تخمر هوائية حيث تم الحصول على 198±4.6 µg/mL من فيتامين B12 .

تمكن Tanaka وزملاؤه (2017) من تطبيق هندسة الريبوزوم على بكتيريا *Propionibacterium shermanii* لإنتاج فيتامين B12 حيث بلغت الانتاجية 5.2 mg/L.

قام Mohammed وزملاؤه (2014) بإنتاج فيتامينB12 على ثلاث مراحل باستخدام بكتيريا*Bacillus megaterium* حيث بلغت الانتاجية 204.64 µg/L.

تم تقديم براءة الاختراع في عام 1955 (U.S. Patent 2715602) من قِبل Leviton و Hargrove (1955) على عملية إنتاج B12 بواسطة *P. freudenreichii*. ذكرت براءة الاختراع أن إنتاجية فيتامين B12 تعتمد بالإضافة إلى مصادر الكربون والنيتروجين التي تعزز النمو على توافر الكوبالت وكمية الأكسجين في الوسط ، واعتبرت الظروف اللاهوائية هي الأكثر ملاءمة. وتم الوصول إلى أقصى قدر من فيتامين B12 من 0.8 µg/mL. وقد تبين أن التهوية المفرطة تؤدي إلى إلغاء الإنتاج بالكامل تقريبًا.

2–أهداف البحث :

1– إنتاج فيتامين B12 باستخدام البكتيريا *Propionibacterium freudenreichii* من مصل الجبن المدعم بمستخلص الخميرة .

2– دراسة تأثير نسبة الكوبالت المضافة لوسط التخمير (الضروري لتشكيل فيتامين B12) على إنتاجية فيتامين B12.

3– مواد وطرائق البحث :

✓ **<u>مواد البحث :</u>**

– **أوساط النمو :** تم استخدام وسط النمو المدرج أدناه.

<u>PPA:</u> وسط بروبيوني يشبه الجبن يتألف من :

5 gr تريبتون – 10 gr مستخلص الخميرة – 14 ml (60 % W/V) لاكتات الصوديوم PH=6.7 . تم تحضيره وفق طريقة Suomalainen وزملاؤه (2008)

– **مصل الجبن المدعم بمستخلص الخميرة WBM:**

تم تحضيره وفق طريقة Chamlagain وزملاؤه (2016)

– **مصل الجبن :** استخدم في البحث مصل ناتج عن تصنيع الجبن من شركة ألبان حماه ، حيث تم تحليل المصل وتحديد مواصفاته وإجراء بعض الاختبارات الكيميائية عليه وكانت مواصفاته كما في الجدول رقم (1) .

الجدول رقم (1) : مواصفات مصل الجبن المستخدم في البحث.

المكونات	القيمة
المادة الصلبة الكلية	6.5 [% وزناً]
المواد الدسمة	0.35 [% وزناً]
البروتينات	0.9 [% وزناً]
سكر اللاكتوز	4.88 [% وزناً]
الحموضة المعايرة مقدرة على أساس حمض اللبن	% 0.15
pH	6.3
COD	70000 Mg o_2 / L
الكثافة الوسطية	1.025Kg/L

–المعالجة الأولية للمصل Pretreatment of whey:

قمنا بنزع خثرات الكازئين وجزيئات الدسم التي توجد في المصل، تعيق دقائق الكازئين عملية فصل الدسم وتؤثر على نقاوة المنتج لذلك يجب إزالتها أولاً باستخدام قماش ترشيح مناسب، ثم قمنا بفصل الدسم باستخدام الفارزة . ثم حفظ المصل في الثلاجة لوقت الاستخدام (Teixeira وزملاؤه ، 2016) .

ينزع عند معالج 10 Kg من المصل حوالي 50 g دقائق كازئين و200 g من دسم المصل (دسم 15%) ويفقد حوالي 50 g من المصل، وبالتالي حصلنا بعد المعالجة الأولية على9.7 Kg مصل معالج يحتوي على حوالي5.7% مواد صلبة كلية منها 4.53% سكر لاكتوز (ما يعادل 75% على أساس المادة الجافة) .

– البكتيريا المستخدمة : *Propionibacterium freudenreichii* : تم الحصول عليها من معهد الحليب واللحوم التابع لأكاديمية العلوم القومية الأوكرانية كييف– أوكرانيا.

– الأجهزة المستخدمة :

- ✓ جهاز HPLC طراز Shimadzu ياباني الصنع: العمود LC-10AD VP C18
- ✓ (Spherisor b ODS-Z 150 *4.6 mm, 5µm ;Supelco)
- ✓ جهاز الفصل بالطرد المركزي طراز Kubota 3100 ياباني الصنع
- ✓ – أوتوغلاف طراز SM300 ياباني الصنع لتعقيم الأوساط المغذية ووسط التخمير .
- ✓ مقياس بركس وقرينة الانكسار – جهاز قياس الـ PH – مجهر ضوئي فرن تجفيف – حمّام مائي للتعقيم بالغليان – جهاز الريفراكتومتر – حاضنة لاهوائية Co2 Incubator IT63 يابانية الصنع .
- ✓ ميزان حسّاس MH800 ياباني الصنع – مواد مستهلكة متعددة :أطباق بتري – بياشر – حوجلات – أنابيب معقمة ذات سدادة مطاطية محكمة الإغلاق.
- ✓ **طرائق البحث Methods of Research :**

يمكن أن نجمل العمل ضمن أربعة اتجاهات رئيسية:

1– تحضير وسط الإكثار للسلالة النقية والبادئ النقي المستخدم في عملية التخمير.

2- تحضير الأوساط المغذية المستخدمة في عمليات التخمير.

3- إعداد البادئ اللازم في عمليات التخمير الرئيسية.

4- إجراء عملية التخمير الرئيسية على الأوساط المغذية مخبرياً وفقاً للطريقة الدورية.

– تنشيط البادئ :

نأخذ مسحة من البادئ على أطباق PPA آجار ويحضن على الدرجة $30^{O}C$ لمدة 4-3 أيام في ظروف لاهوائية وفق طريقة Suomalainen وزملاؤه (2008) .

–إكثار البادئ (التخمير):

–تحضير وسط النمو WBM :

أعد وسط النمو WBM المستخدم في عملية لتخمير عند درجة الحموضة PH=6.4 وفقاً لطريقة (Hugenschmidt وزملاؤه، 2010 ؛ Chamlagain وزملاؤه، 2016)، قمنا بإضافة لكل لتر من المصل g 10 من مستخلص الخميرة و g 13 من محلول لاكتات الصوديوم (w/w%60) و g 0.1 من Tween 80 و g 0.2 من كبريتات المغنيزيوم و g 0.02 من كبريتات المنغنيز و ml 100 من فوسفات البوتاسيوم الموقي .

قمنا أولاً بخلط ml 700 مصل الجبن درجة حموضته (pH=5) مع ml 150 من محلول (Tween 80-Mg-Mn) وتم تعقيمه عند درجة حرارة °C 121 لمدة 15 دقيقة بشكل منفصل عن ml 150 محلول الخميرة و اللاكتات والفوسفات (pH 6.6).

تم خلط الجزأين قبل الاستخدام مباشرة للحصول على لتر واحد من وسط WBM. تمت إضافة mg/L 5 محلول معقم من كلوريد الكوبالت بفلتر (0.2 µm) إلى الوسط .

أخذنا mL 100 من وسط النمو WBM في خمس أنابيب ذات سدادة في كل أنبوب mL 100 من وسط النمو . تمت اضافة الكوبالت إلى الانابيب بالتراكيز التالية mg/l (0 - 5 - 10- 15 – 20). تم تلقيح الأنابيب بالبادئ المنشط بمقدار mL 25 ثم أغلقت السدادة لتأمين التخمر اللاهوائي حضن على الدرجة 30^{O} C لمدة 3 أيام في ظروف لاهوائية (Teixeira و زملاؤه ، 2016).

–تعطيل البادئ : تم قياس تركيز B12 في وسط التخمير وفي خلايا البادئ وذلك بعد تعطيل البادئ مؤقتا و استخلاص B12 من الخلايا، عطل البادئ مؤقتاً بعد الانتهاء من التخمير باستخدام mL 10 من المحلول الموقي من هيدروكسيد الصوديوم وحمض الخل ثم حول فيتامين B12 إلى الشكل الأنسب بإضافة سيانيد الصوديوم ثم عملية الاستخلاص في حمام مائي مغلي ثم التبريد ثم الفصل بالطرد المركزي وفق طريقة Deptula (2017).

– قياس B12: حددنا تركيز B12 باستخدام جهاز HPLC ياباني الصنع وفق طريقة Van (2011).

تحضير العينة قبل القياس على جهاز HPLC:

تم وزن كتلة الخلايا الرطبة ثم عطلت عن العمل مؤقتاً باستخدام m/L 10 من المحلول الموقي (813 هيدروكسيد الصوديوم و mM 20.7 حمض الخل PH=4.5) ثم أضيفت µL 100 من 1% سيانيد الصوديوم بهدف تحويل B12 ونظيره للشكل المناسب ثم قمنا بالتسخين في حمام مائي مغلي لمدة 30 دقيقة ثم تبرد الأنابيب في حمام ماء ثلجي ثم عطلت عن العمل الراسب المتبقي في m/L 5 من المحلول الموقي PH=6.2. وتم الفصل بالطرد المركزي (Deptula وزملاؤه ، 2015 ؛ Chamlagain وزملاؤه ،2015) .

4- النتائج :

يبين الجدول رقم (2) تأثير نسبة الكوبالت المضافة إلى وسط التخمير على إنتاجية فيتامين B12 في وسط التخمير وفي خلايا البادئ باستخدام تقنية تحليل التباين باتجاه واحد One Way-Analyses Of Variance (ANOVA).

الجدول رقم (2) : نتائج تأثير كمية الكوبالت المضافة إلى وسط التخمير على إنتاجية فيتامين B12 في وسط التخمير وفي خلايا البادئ .

الكوبالت mg/L	حجم العينة	B12 تركيز في الوسط g/100 mLµ	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	B12تركيز في الخلايا g/100 mLµ	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري
0	1	38.12	38.01	0.4406	226.01	225.96	0.4962
	2	38.22			226.23		
	3	38.13			226.05		
	4	37.12			225.01		
	5	38.32			226.45		
	6	38.12			226.03		
5	1	195.9	194.83	1.2356	687.44	685.50	1.6366
	2	194.9			686.84		
	3	192.9			685.04		
	4	195.8			685.51		
	5	193.8			682.74		
	6	195.7			685.44		
10	1	556.41	556.03	1.2916	1694.23	1693.9	0.8692
	2	555.82			1693.15		
	3	557.45			1695.05		
	4	553.62			1692.65		
	5	556.45			1694.22		
	6	556.42			1694.25		
15	1	336.02	335.79	0.4033	1194.19	1193.6	0.5836
	2	335.32			1193.19		
	3	336.02			1194.12		
	4	335.22			1193.04		
	5	336.12			1194.08		
	6	336.02			1192.99		
20	1	125.56	124.30	1.2982	501.15	492.34	21.042
	2	123.47			500.46		
	3	122.56			449.39		
	4	123.43			500.55		
	5	125.31			501.12		
	6	125.46			501.35		

كما يبين الجدول رقم (3) والجدول رقم (4) القيم الاحصائية لنتائج تأثير كمية الكوبالت المضافة على إنتاجية فيتامين B12 في وسط التخمير وفي خلايا البادئ على الترتيب.

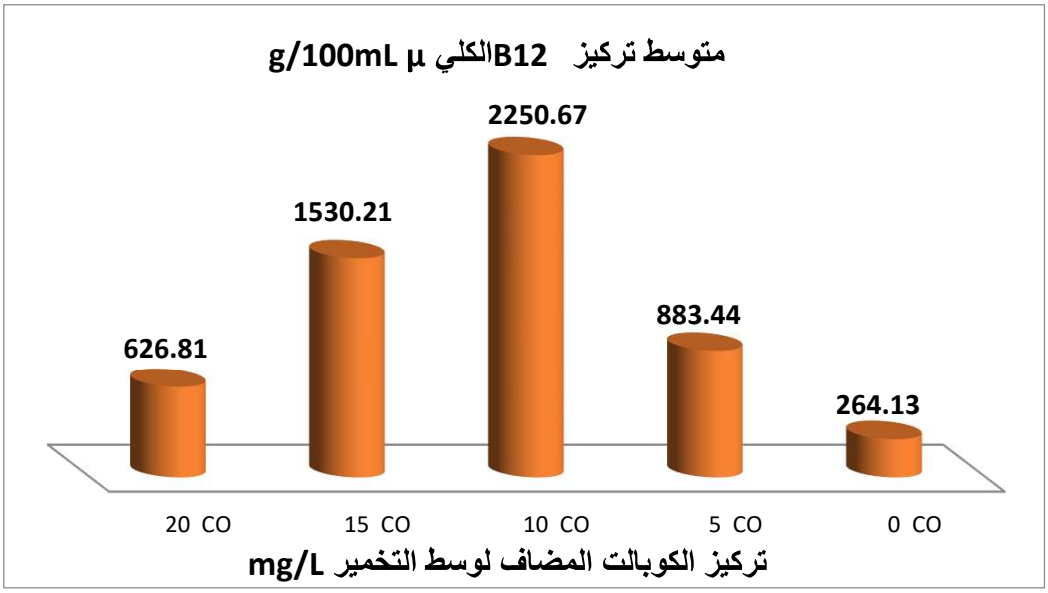
الجدول رقم (3): القيم الاحصائية لنتائج تأثير كمية الكوبالت المضافة على إنتاجية فيتامين B12 في وسط التخمير .

القيمة	الدرجة الإحصائية DF	مجموع المربعات SS	متوسط المربعات MS	اختبار فيشر F	الاحتمالية P
BETWEEN	4	988	247	5.76	0.0021
WITHIN	25	26.18	1.047		
TOTAL	29	988			

جدول رقم (4) : القيم الاحصائية لنتائج تأثير كمية الكوبالت المضافة على إنتاجية فيتامين B12 في خلايا البادئ .

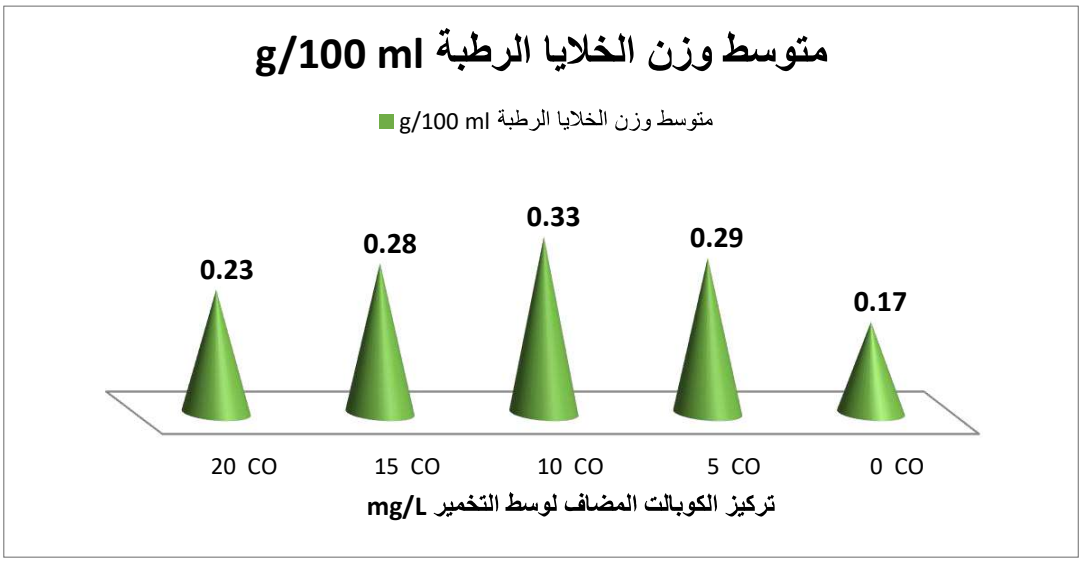
القيمة	الدرجة الإحصائية DF	مجموع المربعات SS	متوسط المربعات MS	اختبار فيشر F	الاحتمالية P
BETWEEN	4	824	206	69	0.0014
WITHIN	25	2234.03	89.36		
TOTAL	29	824			

كما يبين الشكل رقم (1) تركيز B12 التي تم الحصول عليها في الخلايا µg/100 mL حسب تراكيز الكوبالت المضافة لوسط التخمير كمايلي (mg/L) (0–5–10–15–20) .



الشكل رقم (1): متوسط تركيز B12 الكلية µg/100 mL حسب تراكيز الكوبالت (mg/L)(0–5–10–15–20) المضافة لوسط التخمير .

كما يبين الشكل رقم (2) نتائج تأثير كمية الكوبالت المضافة لوسط التخمير على متوسط وزن الخلايا الرطبة لتكرارات عمليات التخمير السابقة .



الشكل رقم (2) : نتائج تأثير تركيز الكوبالت المضاف لوسط التخمير على وزن الخلايا الرطبة من البادئ

5- المناقشة :

أثبتت الدراسة وجود فروق معنوية واضحة وبدرجة حرية (4) في إنتاجية فيتامين B12 المتراكمة في وسط التخمير وفي خلايا البادئ ($P < 0.05$)، كما كانت الفروق المعنوية بين تركيزي الكوبالت (0 – 5) بالمقارنة مع التركيز (10 – 15) (P) 0.05 > وأصبحت ذات الفروق ذات معنوية بسيطة بين التركيزين (10 – 20) , وأصبحت الفروق المعنوية معدومة بين التركيز (5 – 20) P>0.05 وهذا يتوافق مع Chamlagain وزملاؤه، 2016.

بلغت إنتاجية فيتامين B12 بدون اضافة الكوبالت بمقدار 226.01 g/100 mL µ وتعد هذه الانتاجية مهمة بهدف تدعيم المنتجات بفيتامين B12 والحصول على منتج نقي غير ملوث بالكوبالت .

زادت إنتاجية B12 عند إضافة الكوبالت وتحققت أعلى إنتاجية عند إضافة الكوبالت بمقدار mg/L 10 حيث بلغ متوسط إنتاجية فيتامين B12 الكلي (وسط + خلايا البادئ) ما يقارب 2250.67 g/100 ml µ وعند زيادة كمية الكوبالت المضافة فوق هذه النسبة بدأت الإنتاجية بالتناقص حيث يبدأ التأثير السلبي السمي لعنصر الكوبالت على خلايا البادئ وهذا يتوافق مع (Chamlagain وزملاؤه، 2016؛ Hugenschmidt وزملاؤه، 2011) .

بلغت إنتاجية فيتامين B12 بدون إضافة الكوبالت لوسط التخمير مايقارب 0.4962 µ g/100 ml ± 225.96. تعتبر هذه الكمية نموذجية بالنسبة للبكتيريا التي تزرع بدون مكملات الكوبالت ، ويعد الكوبالت عاملاً مهماً في إنتاج B12 حيث ترتبط زيادة النمو لـ *P. freudenreichii* بزيادة إنتاج B12 مع توفر فائض من الكوبالت ، كما تعد إضافة الكوبالت غير مرغوب بها من منظور تدعيم الأغذية.

مع الأخذ بعين الاعتبار استهلاك يقارب 4 µg في اليوم للبالغين (EFSA NDA Panel ، 2015) وبالتالي استهلاك 34 ml من المنتجات الغذائية المخمرة باستخدام *P. freudenreichii* تلبي الاحتياجات الغذائية دون الحاجة إلى إضافة

الكوبالت وهذا يتوافق مع (Chamlagain وزملاؤه، 2016؛ Hugenschmidt وزملاؤه، 2011 ؛Deptula وزملاؤه ، 2017) .

6- الاستنتاجات والتوصيات :

نستنتج أن كمية الكوبالت المضافة لوسط التخمير لها تأثير كبير على إنتاجية B12 حتى حد معين يبدأ التأثير السلبي لها حيث تعمل على تثبيط البادئ وبالتالي تقل الانتاجية. كما لاحظنا أن إنتاجية B12 بدون إضافة الكوبالت تعد ذات أهمية بالنسبة للحصول على منتج نقي صالح للاستهلاك الغذائي وهذا يتوافق مع إغناء الغذاء والأعلاف الحيوانية بفيتامين B12. عندما يكون الهدف من عملية التخمير إنتاج B12 بإنتاجية عالية فينصح بإضافة الكوبالت للوسط .

في الأبحاث المستقبلية يمكن اختيار مادة أولية غنية بالكوبالت لزيادة إنتاج فيتامين B12 بدون إضافة الكوبالت وبالتالي تخفيض كلفة الإنتاج والحصول على منتج نقي غني بفيتامين B12.

7-المراجع :

1- Allen, L. H. (2010). Bioavailability of vitamin B12. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 80, 330–335.

2- Allen, L. H. (2009). How common is vitamin B-12 deficiency? American Journal of Clinical Nutrition, 89(Suppl), 693S–696S.

3- Ball G.F.M. (1998). Vitamin B12 In: Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods. London: Chapman & Hall, pp497–515, 1998

4- Blanche F, Debussche L, Thibaut D, Crouzet J, Cameron B (1989) Purification and characteriztationof S-adenosyl-Lmethionine: uroporphyrinogen III methyltransferase from Pseudomonas denitrificans. J Bacteriol 171:4222–4231.

5-Burgess, C.M., Smid, E.J., and van Sinderen, D. (2009) Bacterial vitamin B2,B11 and B12 overproduction: an overview.Int J Food Microbiol 133: 1–7.

6- Bykhovsky VY, Zaitseva NI, Eliseev AA (1998) Tetrapyrroles: diversity, biosynthesis, and biotechnology. Appl Biochem Microbiol 34:1–18

7- Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P. and Spano, G., 2012. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. Applied microbiology and biotechnology, 96(6), pp.1383-1394.

8- Chamlagain, B., Deptula, P., Edelmann, M., Kariluoto, S., Grattepanche, F., Lacroix, C., … Piironen, V. (2016). Effect of the lower ligand precursors on vitamin B12 production by food-grade Propionibacteria. LWT - Food Science and Technology, 72, 117–124.

9- Chamlagain B., Edelmann M., Kariluoto S., Ollilainen V., Piironen V. (2015). Ultra-high performance liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of active vitamin B12 in cells of Propionibacterium and fermented cereal matrices. Food Chem. 166, 630–638.

10- Dalmasso M., Aubert J., Even S., Falentin H., Maillard M. B., Parayre S., et al. . (2012). Accumulation of intracellular glycogen and trehalose by *Propionibacterium freudenreichii* under conditions mimicking cheese ripening in the cold. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6357–6364.

11- Deptula, P. (2017). A multifaceted study ef Propionibacterium freudenreichii, The food-grade prodcer of active vitamin B12. Dissertationes Schola Doctoralis Scientiae Circumiectalis, Alimentariae, Biologicae ISSN 2342-5423 Helsinki University Printing House Helsinki.

12- Deptula P., Kylli P., Chamlagain B., Holm L., Kostiainen R., Piironen, et al. (2015). BluB/CobT2 fusion enzyme activity reveals mechanisms responsible for production of active form of vitamin B_{12} by *Propionibacterium freudenreichii*. Microb. Cell Fact. 14:1. 10.

13- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) (2015). Scientific opinion on dietary reference values for cobalamin (vitamin B12). EFSA J. 13:64.

14- Elmadfa, I., & Singer, I. (2009). Vitamin B-12 and homocysteine status among vegetarians: A global perspective. American Journal of Clinical Nutrition, 89, 1693–1698.

Hargrove, R.E. and Leviton, A., (1955). Process for the manufacture of vitamin b12. U.S. Patent 2,715,602.

15- Hugenschmidt, S., Schwenninger, S. M., & Lacroix, C. (2011). Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with Lactobacillus plantarum SM39 and Propionibacterium freudenreichii DF13. Process Biochemistry, 46(5), 1063–1070.

16- Hugenschmidt, S., Schwenninger, S. M., Gnehm, N., & Lacroix, C. (2010). Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. International Dairy Journal, 20(12), 852–857.

17- Hunik, K. and P. Jan-Hendik, (2002). Process for 12 the production of vitamin B . Arch Intern Med, 27: 34-39.

18- LeBlanc, J.G., Laino, J.E., del Vall, M.J., Vannini, V., vanSinderen, D., Taranto, M.P., et al. (2011) B-group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. J Appl Microbiol 111 : 1297–1309

19- Marsh, K., Zeuschner, C., & Saunders, A. (2012). Health implications of a vegetarian diet: A review. American Journal of Lifestyle Medicine, 6(3), 250–267.

20- Molina, V., Médici, M., de Valdez, F. G., & Taranto, M. P. (2012). Soybeanbased functional food with vitamin B12-producing lactic acid bacteria. Journal of Functional Foods, 4, 831–836.

21- Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J., & Jahn, D. (2002). Microbial production of vitamin B12. Applied Microbiology and Biotechnology, 58, 275–285.

22–Marwaha, S.S., Sethi, R.P. and Kennedy, J.F., (1983). Influence of 5, 6–dimethylbenzimidazole (DMB) on vitamin B12 biosynthesis by strains of Propionibacterium. Enzyme and Microbial Technology, 5(5), pp.361–364.

23– Miyano K, Ye K, Shimizu K (2000) Improvement of vitamin B12 fermentation by reducing in the inhibitory metabolites by cell recycle system and mixed culture. J Biochem Eng 6:207–214.

24– Mohammed Y, Lee B, Kang Z, Du G. (2014). Capability of Lactobacillus reuteri to produce an active form of vitamin B12 under optimized fermentation conditions. JAIR, 2:2278–5213.

25– Pawlak, R., Lester, S. E., & Babatunde, T. (2014). The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: A review of literature. European Journal of Clinical Nutrition, 68(5), 541–548.

26– Piao, Y.; Yamashita, M.; Kawaraichi, N.; Asegawa, R.; Ono, H.; Murooka, Y.(2004). Production of vitamin B12 in genetically engineered Propionibacterium freudenreichii. J. Biosci. Bioeng., 98, 167–173.

27– Rabah, H., Rosa, F.L and Jan, G. (2017) . Dairy Propionibacteria: Versatile Probiotics . Microorganisms 2017, 5, 24; doi:10.3390/microorganisms5020024

28– Reynolds, E., (2006). Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. The lancet neurology, 5(11), pp.949–960.

29– Rickes, E.L., Brink, N.G., Koniuszy, F.R., Wood, T.R. and Folkers, K., (1948). Comparative data on vitamin B12 from liver and from a new source, Streptomyces griseus. Science (Washington), 108, pp.634–635.

30– Roman RV, Iluc E, Mustea A, Neacsu A, Asandului V. (2001). Optimisation of medium components in vitamin B12 biosynthesis. Romanian Biotechnol Lett 6:343–350.

31– Suomalainen T., Sigvart–Mattila P., Mättö J., Tynkkynen S. (2008). *In vitro* and *in vivo* gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. shermanii JS. Int. Dairy. J. 18, 271–278.

32– Truswell, A. S. (2007). Vitamin B12. Nutrition and Dietetics, 64(Suppl 4), S120–S125.

33– Van Wyk J., Witthuhn R. C., Britz T. J. (2011). Optimisation of vitamin B 12 and folate production by *Propionibacterium freudenreichii* strains in kefir. Int. Dairy J. 21, 69–74.

34– Wang, P.; Zhang, Z.; Jiao, Y.; Liu, S.; Wang, Y.(2015). Improved propionic acid and 5,6–dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B12 fermentation by Propionibacterium freudenreichii. J. Biotechnol., 193, 123–129.

35- Watanabe, F., Yabuta, Y., Tanioka, Y., & Bito, T. (2013). Biologically active vitamin B12 compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 61, 6769–6775.

36- Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 sources and bioavailability. Experimental Biology and Medicine, 232(10), 1266–1274.

37- Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Ebara S, Miyamoto E.(2002). Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. J Nutr Sci Vitaminol 48:325–331,.

38- Xia W, Chen W, Peng W and Li, K .(2015). Industrial vitamin B12 production by Pseudomonas denitrificans using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. Bioprocess and Biosystems Engineering, Volume 38, Issue 6, pp 1065–1073.