

تولید آزمایشگاهی نوشیدنی لبنی تخمیری حاوی ویتامین ب 12 در فرمنتور

سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی شده

سلماز زارعان شهرکی¹، نگین احمدی²، کیانوش خسروی دارانی³، سید امیرمحمد مرتضویان⁴، پالیز کوهی کمالی⁵

- 1- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ساری، ایران
- 2- کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 3- نویسنده مسئول: دانشیار گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com
- 4- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 5- کارشناس آزمایشگاه گروه تحقیقات علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 93/5/27

تاریخ پذیرش: 93/8/16

چکیده

سابقه و هدف: پروپیونی باکتریوم فراورده‌های مهم صنعتی مثل اسید پروپیونیک، ویتامین ب12 و باکتریوسین تولید می‌کند. همچنین فواید پروبیوتیکی و عوامل محرک رشد باکتری‌های مفید روده‌ای هم دارد. هدف تحقیق حاضر بررسی اثر متغیرهای فرایند بر تولید ویتامین ب12 در نوشیدنی تخمیری حاوی اسید پروپیونیک به کمک پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی‌بی است.

مواد و روش‌ها: فرایند تخمیر در فرمانتور 3 L با منبع کربن ملاس چغندر به عنوان محیط پایه آغاز شد و پس از طی 36 h، خوراک‌دهی صورت گرفت. با به کارگیری طراحی پلاکت برمن، اثر عوامل مختلف عملیاتی یازده گانه بر رشد و تولید در 12 تیمار بررسی شد. نمونه‌برداری از فرمانتور به منظور کنترل غلظت توده سلولی و ویتامین ب12 در هر 24 h صورت گرفت. میزان توده خشک سلولی با روش خشک کردن انجمادی و میزان تولید ویتامین ب12 با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌های طراحی آزمایشی با نرم افزار Minitab-2 انجام شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل آماری نتایج این تحقیق نشان داد که همه متغیرهای فرایند تأثیر معنی‌دار بر پاسخ فرایند داشتند ($p < 0/05$). بیشترین غلظت نهایی ویتامین ب12 (30 mg/L) و بیشترین بهره‌وری تولید آن (7/5 mg/L.h) از تیمار 9 به دست آمده است. در این مطالعه حجم و نوع تلقیح و غلظت ملاس تأثیر معنی‌دار بر بهره‌دهی تولید ویتامین ب12 نداشتند ($p > 0/05$). نوع منبع نیتروژن و خوراک، مؤثرترین فاکتورهای به کار رفته در این تحقیق بودند و لذا، شربت ذرت خیسانده و لاکتوز به طور معنی‌دار باعث افزایش میزان تولید ویتامین شدند.

نتیجه‌گیری: بهترین شرایط تخمیر برای تولید ویتامین ب12 دمای 36 °C، pH=6/5، 25 g/L ملاس، 10 g/L شربت ذرت خیسانده، 96 h تخمیر، استفاده از مایه تلقیح 5% (v/v) حاوی پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی‌بی و خوراک‌دهی پیوسته لاکتوز با سرعت 0/04 l/h به دست آمد. نتایج نشان داد که بیشترین غلظت نهایی (30 mg/L)، راندمان تولید (14/48 mg/g) و بیشترین بهره‌وری ویتامین ب12 (7/5 mg/L.day) به دست آمد.

واژگان کلیدی: ویتامین ب12، پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی‌بی زیرگونه شرمایی، سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی شده، طرح پلاکت-برمن، فرمنتور

• مقدمه

انرژی شرکت دارد (3-1). این ویتامین اولین بار در 1926 در کبد خام شناسایی و از کبد و کلیه جداسازی شد (6-3). نیاز متوسط روزانه به این ویتامین برای بزرگسالان حدود 3gu در

ویتامین ب12 (کوبالامین) ویتامین محلول در آب است که نقش مهمی در عملکرد مغز و سیستم عصبی داشته و در متابولیسم سلولی به ویژه در سنتز اسیدهای چرب و تولید

تخمیری حاوی اسید پروپیونیک و کشت ترکیبی پروپیونی-باکتریوم فرئودنریچیئی زیرگونه شرمائی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مورد بررسی قرار نداده است. چنین کشتی ممکن است شیر تخمیری حاوی اسیدهای آلی کوتاه زنجیر مثل اسید پروپیونیک و اسید استیک تولید کند که منجر به احساس سیری در مصرف کننده شود که این پدیده ناشی از تحریک ترشح پپتید روده‌ای YY به‌عنوان مهارکننده اشتها و تأخیر تخلیه معدی است (18). علاوه بر این، شیر تخمیری حاوی ویتامین ب12 می‌باشد که در طول رشد میکروارگانیسم‌های مذکور تولید شده و محصولی با ارزش غذایی بالا حاصل می‌شود. هدف از این مطالعه ارزیابی یازده متغیر عملیاتی بر تولید ویتامین ب12 در نوشیدنی لبنی تخمیری حاوی اسید پروپیونیک است.

• مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها و محیط کشت: پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچیئی زیرگونه شرمائی-بی (PTCC 1661) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC 1643) به صورت فعال از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شده و هر ماه پاساژ داده شدند. برای تلقیح به فرمانتور در هر تیمار صورت گرفته، پروپیونی‌باکتریوم فعال شده، در محیط مایع پروپیونی‌باکتریوم در دمای 30°C به مدت 48 h و لاکتوباسیلوس فعال در محیط مایع MRS در دمای 37°C به مدت 72 h کشت داده شدند.

محیط پیش‌کشت و محیط کشت تلقیح ترکیب یکسانی با محیط کشت ذخیره دارند با این تفاوت که غلظت لاکتات سدیم و عصاره مخمر به ترتیب تا 20 g/L و 10 g/L افزایش یافت و فاقد آگار بودند. محیط کشت در هر یک لیتر آب دیونیزه حاوی ترکیبات ذیل است (گرم): 1 پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، 2 دی‌آمونیم هیدروژن فسفات، 0/005 فروسولفات 7آبه، 0/01 منیزیم سولفات، 0/025 منگنز سولفات، 0/01 کلرید کلسیم، 0/01 کلرید کبالت، 5 عصاره مخمر، 5 سدیم لاکتات (19).

راه اندازی فرمانتور: محیط پایه تخمیر برای سیستم ناپیوسته خوراک‌دهی شده شامل محیط کشت پیش‌کشت و ملاس به عنوان منبع کربن اولیه و قند لاکتوز (چه به صورت محلول حاوی قند لاکتوز یا شیر بازسازی شده) به عنوان منبع کربن ثانویه بود. محیط پایه همراه ظرف فرمانتور و دو منبع

هر روز است. سوء تغذیه به دلیل کمبود ویتامین ب12 می‌تواند منجر به اختلالات فیزیولوژیکی شود که مهم‌ترین آن‌ها کم‌خونی است (1).

تولید شیمیایی ویتامین ب12 بسیار پیچیده و شامل 70 مرحله است لذا تولید در مقیاس صنعتی به این روش مناسب نیست (3). بنابراین، تولید صنعتی این ویتامین محدود به فرایند تخمیر با پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچیئی زیرگونه شرمائی و سودوموناس دنیتریفیکانس است (7-8). در صنعت استفاده از پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچیئی زیرگونه شرمائی ارجحیت دارد به این دلیل که جز فهرست GRAS (Generally Recognized As Safe) قرار دارد (9).

پروپیونی‌باکتریوم‌ها قادر به مصرف طیف وسیعی از منابع کربنی مختلف برای تولید ویتامین ب12 هستند به عنوان مثال استفاده از ساکارز (11، 10)، آب پنیر (12)، گلوکز (13)، ملاس (10)، گلیسرول خام (14) و ضایعات لبنی (15) در سیستم‌های تخمیر ناپیوسته (16)، ناپیوسته خوراک‌دهی-شده (13) و پیوسته (17، 2) به عنوان منابع کربن گزارش شده است. از آنجایی که غلظت و بهره‌وری کم تولید، کاربرد تجاری فرایندهای تخمیری را محدود می‌کند لذا جستجوی سوبسترای مناسب در منابع تجدیدپذیر مثل ملاس با بهره‌وری زیاد می‌تواند تولید زیستی ویتامین را از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر کرده و از تجمع ناشی از ضایعات صنعتی بکاهد. ملاس نیشکر منبعی تجدیدپذیر است که جزء ضایعات کارخانجات قند نیز محسوب می‌شود. ملاس نیشکر محرک تولید توده سلولی می‌باشد لذا در مواردی که تولید زیاد توده سلولی مد نظر است می‌تواند کاربرد داشته باشد مثلاً هنگام تولید متابولیت ثانویه‌ای مثل ویتامین ب12 می‌توان ابتدا با مصرف ملاس توسط میکروارگانیسم به مقدار زیادی توده سلولی دست یافت که برای استخراج ویتامین ب12 بسیار مفید است (۹، ۱۰). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که شرایط مطلوب رشد گونه‌های پروپیونی‌باکتریوم دمای 30-37 درجه سانتی-گراد و pH 6 تا 7 است (9). حداکثر pH برای رشد معادل 8/5 و حداقل 4/6 است و پائین‌تر از 4/5 pH، رشد آن متوقف و تولید اسید کم خواهد شد و حجم تلقیح بالاتر برای رشد مورد نیاز است (10).

تاکنون مطالعه‌ای اثر چندین متغیر عملیاتی مهم را به طور همزمان بر تولید میکروبی ویتامین ب12 در نوشیدنی لبنی

سطح مختلف عبارتند از: pH (6/5 و 7/5)، دما (30 و 36 °C)، غلظت ملاس (25 و 45 g/L)، استراتژی خوراک‌دهی (پله‌ای یا پیوسته)، سرعت خوراک‌دهی (0/03 و 0/04 L/h)، نوع خوراک (شیر یا لاکتوز)، حجم تلقیح (1 و 5%)، نوع تلقیح (پروپیونی-باکتریوم یا مخلوط پروپیونی-باکتریوم و لاکتوباسیلوس)، زمان (96 و 144 ساعت)، نوع منبع نیتروژن (عصاره مخمر یا شربت ذرت خیسانده) و غلظت آن (5 و 10 g/L).

• یافته‌ها

جدول 1 سطوح آزمایشی یازده متغیر که در این طرح مورد ارزیابی قرار گرفتند و مقادیر ویتامین ب12 حاصل شده از هر تیمار را نشان می‌دهد.

مقادیر غلظت توده خشک سلولی در طول هر تیمار و در انتهای تخمیر در جدول 1 آورده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود مقدار غلظت نهایی تولیدی توده سلولی در شرایط مختلف تغییرات وسیعی را از بیشترین مقدار $7/08 \pm 0/06$ g/L تا کمترین میزان $0/75 \pm 0/05$ g/L نشان می‌دهد.

جدول 1 مقادیر غلظت ویتامین ب12 را در طول تخمیر برای هر تیمار نشان می‌دهد. بیشترین مقدار غلظت نهایی ویتامین ب12 $30/00$ mg/L است که از تیمار 9 حاصل شده است و کمترین مقدار ویتامین مربوط به تیمار 4 است که در آن هیچ مقدار ویتامینی توسط دستگاه تشخیص داده نشد.

مقدار مثبت ضرایب نشان می‌دهد که سطح بالای متغیر تأثیر بیشتر و مقدار منفی آن نشان می‌دهد که سطح پایین متغیر اثر بیشتری روی فرایند دارد.

مقدار t برای هر متغیر نسبت ضریب به خطای استاندارد بود. متغیرهای معنی‌دار با آزمون student's t-test مشخص شد ($\alpha=0/05$ و $df=10$). محاسبات آماری در جدول 2 ارائه شده است.

کربن هر کدام در یک بطری جداگانه تهیه شدند. محلول ملاس و محلول قند لاکتوز در دمای 121 °C به مدت 15 min استریل شدند ولی شیر بازسازی شده از شیر خشک به مدت 10 s در 121 °C استریل شد. بطری‌های حاوی ملاس و لاکتوز یا شیر بازسازی شده طی شرایط آسپتیک به فرمانتور متصل شدند. سپس فرمانتور بر روی دما و pH (اضافه شدن اتوماتیک سود 1 N توسط دستگاه)، مدت زمان تخمیر مورد نظر تنظیم شد. خوراک‌دهی بعد از 36 h تخمیر با سرعت انتخاب شده شروع شد (20). مایه تلقیح مورد نظر به فرمانتور تزریق شد (21). به منظور اندازه‌گیری پارامترها هر 24 h، 20 mL نمونه از دستگاه برداشته شد.

اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی: بعد از نمونه برداری از سیستم، 20 mL نمونه را با دور 12000 rpm به مدت 10 min در دمای 4 °C سانتریفوژ کرده و فاز ته نشین شده پس از شستشو با آب خشک کرده و پس از خشک شدن پلیت‌ها وزن خشک توده زیستی به دست آمد (22).

اندازه‌گیری میزان ویتامین ب12: برای اندازه‌گیری ویتامین ب12 آماده سازی نمونه‌ها و استخراج متابولیت نیاز بود (19). استخراج این متابولیت خارج سلولی با جوشاندن در سیانات پتاسیم 0/1 مولار در pH=6 به مدت 15 min انجام شد (19). سپس محلول حاصل از فیلتر سرسرنگی $0/45 \mu\text{m}$ عبور داده شد و ویتامین ب12 با دستگاه HPLC (CE 4200, Cecil, Milton Technical Center, Cambridge, UK) مجهز به ستون C18 اندازه‌گیری شد. فاز متحرک، متشکل متانول و محلول فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم 0/02 مولار و طول موج دتکتور UV، 361 نانومتر بود (3).

طراحی آزمایش: طرح آماری پلاکت-برمن برای ارزیابی اهمیت متغیرهای عملیاتی مختلف بر تولید ویتامین ب12 در محصول لبنی تخمیری به کار گرفته شد (21). همان طور که در جدول 1 نشان داده شده است، یازده متغیر مختلف در دو

جدول 1. طرح آزمایشی پلاکت-برمن برای بررسی متغیرهای مؤثر بر تولید توده سلولی و ویتامین ب12 تولیدی در نوشیدنی لبنی تخمیری

توده خشک سلولی (g/L)	بهره‌وری (mg/L.day)		راندمان (mg/g)		غلظت (mg/L)		ویتامین ب12											
	Pred†	Exp*	Pred	Exp	Pred	Exp	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	تیمار
298±001	075	075	0162	101	301	300	10	10	96	^a P+L	5%	شیر	003	003	45	30	7/5	1
708±006	100	100	0000	056	401	400	5	5	96	^a P+L	1%	شیر	003	003	25	36	7/5	2
704±006	275	275	5709	156	1099	1100	10	10	96	^b P	1%	شیر	004	004	45	36	6/5	3
210±004	000	000	0000	000	-001	000	10	10	144	^b P	1%	لاکتوز	003	003	45	30	7/5	4
161±004	383	383	10628	1437	2299	2300	10	10	144	^b P	5%	شیر	004	004	25	36	7/5	5
235±002	050	050	0000	128	303	300	5	5	144	^a P+L	1%	لاکتوز	004	004	45	36	7/5	6
346±003	725	725	10434	838	2897	2900	5	5	96	^b P	5%	لاکتوز	003	003	45	36	6/5	7
456±003	033	033	2494	044	201	200	5	5	144	^a P+L	5%	شیر	004	004	45	30	6/5	8
279±003	750	750	14486	1075	3001	3000	10	10	96	^a P+L	1%	لاکتوز	004	004	25	30	6/5	9
075±005	001	001	0000	007	007	005	5	5	96	^b P	5%	لاکتوز	004	004	25	30	7/5	10
355±004	001	001	2040	001	003	005	10	10	144	^a P+L	5%	لاکتوز	003	003	25	36	6/5	11
622±002	001	001	3746	001	003	005	5	5	144	^b P	1%	شیر	003	003	25	30	6/5	12

P^{††} پروبیوتی باکتریوم فرودریچی (بی)، L⁺ (لاکتوسایلوس/اسیدوفیلوس)، P^{‡‡} (پروبیوتی باکتریوم فرودریچی (بی))، Yeast extract^{†††} (عصاره مخمر)، Corn Steep Liquor^{††††} (شربت ذرت خیسانده) حجم pH: (در دو سطح 6/5 و 7/5). دما (در دو سطح 30 و 36 °C).^{‡‡‡} غلظت ملاس (در دو سطح 25 و 45 g/L).^{†††††} استراتژی خوراکی (پلهای یا پیوسته).^{‡‡‡‡‡} سرعت خوراکی (در دو سطح 0/03 و 0/04 L/h).^{††††††} نوع خوراک (شیر یا لاکتوز).^{‡‡‡‡‡‡} حجم تلقیح (در دو سطح 1 و 5% حجم فرمانتور).^{†††††††} نوع تلقیح پروبیوتی باکتریوم یا کشت همزمان پروبیوتی باکتریوم و لاکتوسایلوس).^{††††††††} زمان (در دو سطح 96 و 144 ساعت).^{†††††††††} نوع منبع نیترژن (عصاره مخمر یا شربت ذرت خیسانده) و^{††††††††††} غلظت منبع نیترژن (در دو سطح 5 و 10 g/L).

در آن A_i ضرب و K_i سطح متغیر مورد نظر است. $Y_i = \sum_{i=0}^N A_i \cdot K_i$

Exp * مخفف Experimental و pre مخفف predicted است.

جدول 2. محاسبه ضرایب متغیرها در تولید ویتامین ب12 در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی شده در طرح پلاکت-برمن

توده خشک سلولی		ویتامین ب12						متغیرها
غلظت (g/L)		بهره‌وری (mg/L.day)		راندمان (mg/g)		غلظت (mg/L)		
t-value§	Coeff.†	t-value	Coeff.	t-value	Coeff.	t-value	Coeff.	
56/709	-0/896	9/544	-0/980	0/128	-0/322	184/65	-3/25	pH
29/936	0/473	5/462	0/561	0/459	1/157	165/34	2/91	دما
2/633	0/042	0/633	-0/065	0/433	-1/092	43/18	-0/76	غلظت ملاس
6/854	-0/108	12/882	1/323	1/015	2/547	335/28	5/90	استراتژی خوراک‌دهی
33/418	-0/528	4/781	0/491	0/611	1/542	155/68	2/74	سرعت خوراک‌دهی
76/329	-1/206	5/355	0/550	0/084	0/212	90/34	1/51	نوع خوراک
56/329	-0/89	0/341	0/035	0/001	0/002	42/61	0/75	حجم تلقیح
11/266	0/178	0/950	-0/313	0/342	-0/862	99/43	-1/75	نوع تلقیح
19/620	0/31	11/830	1/215	0/205	0/518	231/82	4/08	زمان
29/936	0/473	12/765	-1/311	1/096	-0/763	335/80	-5/91	نوع منبع نیتروژن
22/975	-0/363	4/654	0/478	0/560	1/413	136/93	2/41	غلظت منبع نیتروژن

† $A_i = 1/N \sum_{i=1}^N x_i k_i$ ؛ که A_i اثر پارامتر ارزیابی شده، X_i پاسخ تجربی؛ K_i سطح متغیر و N شماره هر تیمار می‌باشد. A_0 میانگین پاسخ‌های تجربی است.
 § خطای استاندارد با معادله $Se^2 = \sum_{i=1}^{12} (Y_i - y_i)^2$ به دست آمد. جایی که $(Y_i - y_i)$ اختلاف بین راندمان تجربی و راندمان پیش‌بینی شده است. خطای تخمین زده شده با $S_b = \sqrt{Se^2/N}$ محاسبه شد. مقدار t برای هر متغیر نسبت ضریب به خطای استاندارد بود ($\alpha=0/05$ و $df=10$).

• بحث

ویتامین ب12، 40°C است (11). این اختلاف می‌تواند به تفاوت در میکروارگانیزم و سوبسترای مصرفی مرتبط باشد. رشد بسیاری از میکروارگانیزم‌ها به غلظت سوبسترا بستگی دارد. غلظت بالای سوبسترا اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد بسیاری از میکروارگانیزم‌ها دارد (25). در این مطالعه، اثر افزایش غلظت سوبسترا روی رشد پ. فرئودنریچی‌یی ارزیابی شد. همانطور که در جدول 2 نشان داده شده غلظت پایین سوبسترا اثر معنی‌دار بر تولید ویتامین دارد. علیرغم این که افزایش غلظت سوبسترا اثر بازدارندگی بر رشد باکتری ندارد ولی غلظت ویتامین افزایش پیدا نمی‌کند. این احتمال وجود دارد که افزایش در غلظت سوبسترا منجر به طولانی‌تر شدن فاز لگاریتمی رشد شود و بنابراین، میکروارگانیزم زمان کافی نخواهند داشت که وارد فاز سکون شده و ویتامین ب12 تولید کنند.

تاکنون در هیچ مطالعه‌ای اثر سرعت خوراک‌دهی بر تولید ویتامین ب12 در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی شده با پ. فرئودنریچی‌یی، گزارش نشده است. تنها Goswami and Srivastava به کارگیری سرعت بالاتر خوراک‌دهی را در بهبود تولید و بهره‌وری اسید پروپیونیک موثر دانسته‌اند (20). با توجه به نتایج این تحقیق، سرعت بالاتر خوراک‌دهی منبع کربنی مورد نیاز را فراهم کرده و منجر به افزایش رشد و تولید محصول می‌شود. بیشترین بهره‌وری ($7/5 \text{ mg/L.day}$).

نتایج این تحقیق نشان داد تغییر در متغیرهای عملیاتی منجر به گستره وسیعی از پاسخ‌های سامانه تخمیر شامل راندمان تولید بهره‌دهی و غلظت ویتامین ب12 می‌شود. این تغییرات وسیع پاسخ بین دوازده تیمار صورت گرفته از 0/00 تا $30/00 \text{ mg/L}$ مشاهده شد و نشانگر تأثیر چشمگیر متغیرهای فرایند بر تولید ویتامین ب12 است.

پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی زیرگونه شرمانی‌یی نسبت به سایر میکروارگانیزم‌های تولیدکننده اسید وابستگی شدید بیشتری به pH دارد (11). pH مطلوب رشد 6 تا 7 است (23). حداکثر pH برای رشد معادل 8/5 و حداقل 4/6 است و پایین‌تر از $\text{pH}=4/5$ رشد آن متوقف و تولید اسید کم خواهد شد و حجم تلقیح بالاتر در شرایط اسیدی برای رشد مورد نیاز است (24). pH بهینه برای تولید ویتامین ب12 توسط پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی در محدوده 6/5-8/5 گزارش شده بود (11). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که $\text{pH}=6/5$ برای تولید توده سلولی و ویتامین ب12 مناسب است. علاوه بر این، بیشترین بهره‌وری از تیمار 9 به دست آمد که تخمیر در شرایط $\text{pH}=6/5$ انجام شده بود.

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که 30°C دمای بهینه برای تخمیر ناپیوسته خوراک‌دهی شده این ویتامین توسط پ. فرئودنریچی‌یی می‌باشد. این در حالی بود که Quesada و همکاران گزارش دادند که دمای بهینه تولید

پروپیونیک تولید می‌کند. این اسیدهای آلی بازدارنده‌های مهمی در تولید ویتامین ب₁₂ بوده و غلظت آن را در پایان تخمیر کاهش می‌دهند (26).

گزارش‌های پیشین نشان دادند که زمان 144 h برای تولید توده سلولی و ویتامین ب₁₂ مناسب است ولی در تحقیق حاضر بیشترین بهره‌وری از تیمار با 96 h به دست آمد. در حالی که طولانی شدن فرایند یک فاکتور مهم در موفقیت فرایند تولید این ویتامین به نظر می‌رسید، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تولید صنعتی ویتامین ب₁₂ باید با توجه به زمان انجام گیرد.

شربت ذرت خیسانده فرآورده جانبی کارخانجات استخراج نشاسته از ذرت و یک منبع ارزان قیمت است که حاوی انواع اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌ها و نمک‌های معدنی است ولی ترکیبات آن بسته به فرایند آماده سازی متغیر است. شربت ذرت خیسانده حاوی کربوهیدرات‌های مختلفی مثل دکستروز، مالتوبیوز و مالتوتریوز است (27). استفاده از این منبع نیتروژن و همچنین به کارگیری غلظت زیاد منبع نیتروژن اثر معنی‌دار در افزایش تولید ویتامین ب₁₂ داشته است. کربوهیدرات‌های موجود در شربت ذرت خیسانده می‌توانند به عنوان منبع کربنی اضافی برای تولید ویتامین ب₁₂ استفاده شوند.

بررسی یازده متغیر با استفاده از روش طراحی پلاکت-برمن نشان داد که بیشترین میزان تولید ویتامین ب₁₂ در دمای 36°C، pH=6/5، 25 g/L، 10 g/L شربت ذرت خیسانده، 96 h تخمیر، استفاده از مایه تلقیح 5(%v/v) حاوی پروپیونی باکتریوم فرئودنریچی بی و خوراک‌دهی پیوسته لاکتوز با سرعت 0/04 l/h به دست آمد. نتایج نشان داد که بیشترین غلظت نهایی (30 mg/L)، راندمان تولید (14/48 mg/g) و بیشترین بهره‌وری ویتامین ب₁₂ (7/5 mg/L.day) به دست آمد. ادامه این تحقیق با لحاظ نمودن متغیرهای مؤثر با رسم پاسخ رویه (Response Surface) پیشنهاد می‌گردد.

راندمان (14/37 g vit B₁₂/g biomass) و غلظت نهایی (g/L) (30) ویتامین ب₁₂ از تیمار 9 حاصل شده است که در آن سرعت خوراک‌دهی 0/04 L/h بود.

در این مطالعه همچنین برای تولید ویتامین ب₁₂ دو استراتژی خوراک‌دهی استفاده شد: روش پیوسته که در آن خوراک با سرعت ثابت به محیط اضافه می‌شود و پله‌ای که معادل همان غلظت خوراک، به صورت پلکانی به محیط اضافه می‌شود. خوراک‌دهی پیوسته در بسیاری از موارد مؤثرتر از روش پله‌ای گزارش شده است. اما در برخی موارد، شوک ورود ناگهانی سوبسترا پس از مدتی وقفه، موجب افزایش تولید می‌شود. در این تحقیق خوراک‌دهی پیوسته منجر به افزایش تولید شد که این مشاهده می‌تواند به ثابت نگه داشته شدن غلظت سوبسترا در میزان مناسب و کافی مرتبط باشد، در حالی که در روش پله‌ای محدودیت در غلظت ممکن است حاصل شده باشد. بنابراین، رشد لگاریتمی در طول تخمیر طولانی شده و تولید متابولیت ثانویه که مربوط به فاز سکون است به تعویق می‌افتد.

لاکتوز به عنوان منبع خوراک به طور معنی‌داری باعث افزایش تولید توده خشک سلولی و ویتامین ب₁₂ شد. به علت پیچیده بودن محلول شیر، احتمالاً میکروارگانیزم می‌تواند رشد بهتر و تولید بیشتر و بهتری با مصرف محلول لاکتوز داشته باشد.

Coral ادعا کرد که در تولید اسید پروپیونیک حجم تلقیح در 1، 3 و 5 (% v/v) اثر معنی‌داری در افزایش تولید ویتامین ندارد لذا استفاده از حجم 1% را پیشنهاد کرد (19). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که حجم تلقیح 5% باعث بهبود تولید ویتامین ب₁₂ شده است که افزایش آن نشان دهنده رشد بهتر میکروارگانیزم‌ها در محیط است.

به کارگیری کشت هم‌مان پ. فرئودنریچی بی و ل. اسیدوفیلوس باعث کاهش تولید ویتامین ب₁₂ شده است. در حضور ل. اسیدوفیلوس، در ابتدا، همه لاکتوز و قند موجود در محیط مصرف شده و مقدار زیادی اسید لاکتیک در محیط تولید می‌شود و سپس، پ. فرئودنریچی بی مقدار زیادی اسید

• References

- Molina V, Medici M, Taranto MP, Valdez GF. Effects of maternal vitamin B12 deficiency from end of gestation to weaning on the growth and haematological and immunological parameters in mouse dams and offspring. Arch Anim Nutr. 2011; 62: 162-8.
- Selvakumar P, Balamurugan G, Viveka S. Microbial production of vitamin B12 and antimicrobial activity of glucose utilizing marine derived Streptomyces species. Int J Chem Technol Resour. 2012; 4: 976-82.
- Karmi O, Zayed A, Baragethi S, Qadi M, Ghanem R. Measurement of vitamin B12 concentration: a review on available methods. The IIOAB journal. 2011; 2: 23-32.
- Smith EL. Purification of anti-pernicious anaemia factors from liver. Nature. 1948; 161: 638-9.

5. Raux E, Schubert HL, Warren MJ. Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57: 1880-93.
6. Rickes EL, Brink NG, Koniuszy Fr, Wood TR, Folkers K. Crystalline vitamin B12. *Sci.* 1948; 107: 346-97.
7. Survase SA, Bajaj IB, Sighal RS. Biotechnological production of vitamins. *Food Technol Biotech.* 2006; 44: 381-96.
8. Li KT, Liu DH, Zhuang YP, Wang YH, Chu J, Zhang SL. Influence of Zn²⁺, Co²⁺ and dimethylbenzimidazole on vitamin B12 biosynthesis by *Pseudomonas denitrificans*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008; 24: 2525-30.
9. Martines JH, Barg H, Warren M, Jahn D. Micobial production of vitamin B12. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 2002; 58: 275-85.
10. Quesada-Chanto A, Wagner F. Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1994; 41: 378-83.
11. Quesada-Chanto A, Wagner F. Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1994; 42: 16-21.
12. Bullerman LB, Berry EC. Use of cheese whey for vitamin B12 production .I. whey solids and yeast extract levels. *Appl Microbiol.* 1966; 14: 353-5.
13. Wang P, Wang Y, Liu Y, Shi H, Su Zh. Novel in situ product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 by expanded bed adsorption bioreactor. *Bioresour Technol.* 2012; 104: 652-9.
14. Kosmider A, Bialas W, Kubiak P, Drożdżyńska A, Czaczyk K. Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: Optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Bioresour Technol.* 2012; 105: 128-33.
15. Marhawa SS, Sethi RP. Utilization of dairy waste for vitamin B12 fermentation. *Agr Wastes.* 1984; 9: 111-30.
16. Youngsmith B, Sonomoto K, Tanaka A, Fukui S. Production of vitamin B12 by immobilized cells of a propionic acid bacterium. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 1982; 16: 70-4.
17. Kamikubo T, Hayashi M, Nishio N, Nagai S. Utilization of non-sugar sources for vitamin B12 production. *Appl Environ Microbiol.* 1978; 35: 971-73.
18. Rianne M.A.J. Ruijschop, Alexandra E.M. Boelrijk , Meike C. te Giffel. Satiety effects of a dairy beverage fermented with propionic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 2008; 18: 945-50.
19. Coral J, Karp SG, Porto L, Vandenberghe ds, Parada JL, Pandey A, et al. Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008; 151: 331-41.
20. Goswami V, Srivastava AK. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 56: 676-80.
21. Farhadi Sh, Khosravi Darani K, Mashayekh M, Mortazavian SAM, Mohammadi A, Shahraz F. Production of propionic acid in a fermented dairy probiotic beverage. *Int J Dairy Technol.* 2013; 66: 127-34.
22. Ahmadi N, Khosravi-Darani K, Zarean-Shahraki S, Mortazavian A, Mashayekh M, Komeili R, et al. Fed-batch fermentation of propionic, acetic and lactic acid production. *Iran J Nutr Sci & Food Technol.* 2013; 8: 113-21.
23. Coral J. Propionic acid production by *Propionibacterium* sp. using low-cost carbon sources in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioprocesses Eng. Division Federal University of Parana;* 2008.
24. Sheehan JJ, Wilkinson MG, McSweeney PLH. Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. *Int Dairy J.* 2008; 18(9): 905-17.
25. Khosravi-Darani K, Zoghi A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: Experimental design for citric acid production. *Bioresour Technol.* 2008; 99: 6986-93.
26. Martinez-Campos R, De La Torre M. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. *Biotechnol Lett.* 2002; 24: 427-31.
27. Amartey S, Jeffries TW. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. *Biotechnol Lett.* 1994; 16: 211-14.

Lab Scale Production of Fermented Dairy Beverage Containing Vitamin B₁₂ in Fed Batch System

Zarean shahraki S¹, Ahmadi N², Khosravi-Darani K^{3*}, Mortazavian AM⁴, Koohi-Kamali P⁵

- 1- M.Sc in Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
- 2- Students' Research Committee, Graduated in Food Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 3- *Corresponding author: Associate Prof. (in Research), Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email: kiankh@yahoo.com
- 4- Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 5- Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute. Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran. Iran.

Received 18 Aug, 2014

Accepted 7 Nov, 2014

Background and Objectives: Propionibacterium is capable of producing important industrial products such as propionic acid, vitamin B₁₂ and bacteriocin. They have also probiotic benefits and growth factors for the intestinal useful bacteria. The goal of this research was evaluation of the influence of process variables on vitamin B₁₂ production in fed-batch fermentation of a dairy beverage containing propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*.

Materials and Methods: Fermentation was conducted in a 3-L fermentor containing base medium and molasses as the carbon source to which the feeding was added after 36 hours. Sampling was done for biomass and vitamin measurements in 24 h intervals. The content of dry biomass and vitamin B₁₂ was measured by freeze drying method and HPLC, respectively.

Results: Statistical analysis of the results showed that all process variables had significant effect on the response of the system (P<0.05). The final concentration of vitamin B₁₂ (30 mg/L) and productivity (7.5 mg/L.h) was obtained from Treatment 9 while the condition of this treatment was the best. In this research, inocula and their volume as well as feeding had no significant impact on the productivity of vitamin B₁₂ fermentation (P>0.05). Type of nitrogen source and feeding strategy were the most significant factors in this research, so using corn steep liquor and lactose significantly increased vitamin B₁₂ production.

Conclusion: The best conditions for vitamin B₁₂ production include: 30 °C, pH=6.5, 25 g/L molasses, 10 g/L corn steep liquor instead of yeast extract, 96 h fermentation, using *Propionibacterium freudenreichii* with 5% v/v, and continuous feeding of lactose by 0.04 L/h rate. The results showed that the highest level of vitamin B₁₂ was at concentration of 30 mg/L, production yield of 14.48 mg/g, and productivity of 7.5 mg/L.day

Keywords: Vitamin B₁₂, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, Fed Batch System, Plackett-Burman Design, Fermentor