مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دهم، شماره 2، تابستان 1394، صفحات 84-77

تولید آزمایشگاهی نوشیدنی لبنی تخمیری حاوی ویتامین ب 12 در فرمنتور سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی شده

سلماز زارعان شهرکی[1]، نگین احمدی[2]، کیانوش خسروی دارانی[3]، سید امیرمحمد مرتضویان[4]، پالیز کوهی کمالی[5]

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 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: *پروپیونی‌باکتریوم* 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 *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* است.

مواد و روش‌ها: فرایند تخمیر در فرمانتور L 3 با منبع کربن ملاس چغندر به عنوان محیط پایه آغاز شد و پس از طی h 36، 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 به‌منظور کنترل غلظت توده سلولی و ویتامین ب12 در هر h 24 صورت گرفت. میزان توده خشک سلولی با روش خشک کردن انجمادی و میزان تولید ویتامین ب 12 با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. آنالیز داده های 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.

نتیجه گیری: 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 (%v/v)5 حاوی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* 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، *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی*، سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده، طرح پلاکت-برمن، فرمنتور

• مقدمه

ویتامین ب12 (کوبالامین) ویتـامین محلـول در آب اسـت که نقش مهمی در عملکرد مغز و سیستم عصـبی داشـته و در متابولیسم سلولی به ویژه در سـنتز اسـیدهای چـرب و تولیـد انرژی شرکت دارد (3-1). این ویتامین اولین بـار در 1926 در کبد خام شناسایی و از کبد و کلیه جداسازی شد (6-3). نیـاز متوسط روزانه به این ویتامین برای بزرگسالان حـدود 3gμ در

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 *شرمانی‌ئی* و *سودوموناس دنیتریفیکانس* است (8-7). در صنعت استفاده از *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌ئی* زیرگونه *شرمانی‌ئی* 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 خوراک‌دهی‌شده (13) و پیوسته (17، 2) به عنوان منابع کربن گزارش شده است. از آن‌جایی‌که 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 مثلا 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 37-30 درجه سانتی‌گراد و pH 6 تا 7 است (9). حداکثر pH برای رشد معادل 8/5 و حداقل 4/6 است و پائین‌تر از pH 4/5، 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 تخمیری حاوی اسید پروپیونیک و کشت ترکیبی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌ئی* زیرگونه *شرمانی‌ئی* 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 تغذیه‌ای 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 فرئودنریچی‌یی* زیرگونه *شرمانی‌یی* (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 به‌مدت 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 دی هیدروژن فسفات، 2 دی آمونیوم 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 خوراک‌دهی‌شده 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

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 شیرخشک 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 اندازه گیری 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 به‌مدت 15 min انجام شد (19). سپس محلول حاصل از فیلتر سرسرنگی 0/45 µm 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 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 (پروپیونی‌باکتریوم یا مخلوط پروپیونی‌باکتریوم 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

جدول1 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 جدول1 آورده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود مقدار غلظت نهایی تولیدی توده سلولی در شرایط مختلف تغییرات وسیعی را از بیشترین مقدار 7/08±0/06 g/L تا کمترین میزان 0/75±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 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 (df=10 و α=0/05). محاسبات آماری در جدول2 ارائه شده است.

جدول1. طرح آزمایشی پلاکت-برمن برای بررسی متغیرهای مؤثر بر تولید توده سلولی و ویتامین ب12 تولیدی در نوشیدنی لبنی تخمیری

تیمار	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	ویتامین ب12						توده خشک سلولی
												غلظت (mg/L)		راندمان (mg/g)		بهره‌وری (mg/L.day)		(g/L)
												Exp	Pred	Exp	Pred	Exp*	Pred†	
1	7/5	30	45	پله‌ای	0/03	شیر	5%	[a] P + L	96	[c] YE	10	3/00	3/01	1/01	0/162	0/75	0/75	2/98 [e] ±0/01
2	7/5	36	25	پیوسته	0/03	شیر	1%	[a] P + L	96	[d] CSL	5	4/00	4/01	0/56	0/000	1/00	1/00	7/08 [a] ±0/06
3	6/5	36	45	پله‌ای	0/04	شیر	1%	[b] P	96	[d] CSL	10	11/00	10/99	1/56	5/709	2/75	2/75	7/04 [a] ±0/06
4	7/5	30	45	پیوسته	0/03	لاکتوز	1%	[b] P	144	[d] CSL	10	0/00	-0/01	0/00	0/000	0/00	0/00	2/10 [f] ±0/04
5	7/5	36	25	پیوسته	0/04	شیر	5%	[b] P	144	[c] YE	10	23/00	22/99	14/37	10/628	3/83	3/83	1/61 [h] ±0/04
6	7/5	36	45	پله‌ای	0/04	لاکتوز	1%	[a] P + L	144	[c] YE	5	3/00	3/03	1/28	0/000	0/50	0/50	2/35 [g] ±0/02
7	6/5	36	45	پیوسته	0/03	لاکتوز	5%	[b] P	96	[c] YE	5	29/00	28/97	8/38	10/434	7/25	7/25	3/46 [d] ±0/03
8	6/5	30	45	پیوسته	0/04	شیر	5%	[a] P + L	144	[d] CSL	5	2/00	2/01	0/44	2/494	0/33	0/33	4/56 [c] ±0/03
9	6/5	30	25	پیوسته	0/04	لاکتوز	1%	[a] P + L	96	[c] YE	10	30/00	30/01	10/75	14/486	7/50	7/50	2/79 [e] ±0/03
10	7/5	30	25	پله‌ای	0/04	لاکتوز	5%	[b] P	96	[d] CSL	5	0/05	0/07	0/07	0/000	0/01	0/01	0/75 [i] ±0/05
11	6/5	36	25	پله‌ای	0/03	لاکتوز	5%	[a] P + L	144	[d] CSL	10	0/05	0/03	0/01	2/040	0/01	0/01	3/55 [d] ±0/04
12	6/5	30	25	پله‌ای	0/03	شیر	1%	[b] P	144	[c] YE	5	0/05	0/03	0/01	3/746	0/01	0/01	6/22 [b] ±0/02

[a]: P (*پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌ئی*) + L (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*)؛ [b]: P (*پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌ئی*)؛ [c]: Yeast extract (عصاره مخمر)؛ [d]: Corn Steep Liquor (شربت ذرت خیسانده)

[1]: pH (در دو سطح 6/5 و 7/5)، [2]: دما (در دو سطح 30 و 36 ℃)، [3]: غلظت ملاس (در دو سطح 25 و 45 g/L)، [4]: استراتژی خوراک‌دهی (پله‌ای یا پیوسته)، [5]: سرعت خوراک‌دهی (در دو سطح 0/03 و 0/04 L/h)، [6]: نوع خوراک (شیر یا لاکتوز)، [7]: حجم تلقیح (در دوسطح 1 و 5% حجم فرمانتور)، [8]: نوع تلقیح (پروپیونی‌باکتریوم یا کشت همزمان پروپیونی‌باکتریوم و لاکتوباسیلوس)، [9]: زمان (در دو سطح 96 و 144 ساعت)، [10]: نوع منبع نیتروژن (عصاره مخمر یا شربت ذرت خیسانده) و [11]: غلظت منبع نیتروژن (در دو سطح 5 و 10 g/L)

† $Y_i = \sum_{i=0}^{N} Ai.Ki$ که در آن A_i ضریب و K_i سطح متغیر مورد نظر است.

* Exp مخفف Experimental و pre مخفف predicted است.

جدول2. محاسبه ضرایب متغیرها در تولید ویتامین ب12 در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده در طرح پلاکت-برمن

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

† $A_i = 1/N \sum_1^N x\,iki$؛ 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 $Se^2=\sum_{i=1}^{12}(Yi-yi)$ 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 (df=10 و α=0/05).

• بحث

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 mg/L مشاهده شد و نشانگر تأثیر چشمگیر متغیرهای فرایند بر تولید ویتامین ب12 است.

پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی زیرگونه *شرمانی‌یی* نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های تولید کننده 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 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 8/5-6/5 گزارش شده بود (11). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که 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 pH=6/5 انجام شده بود.

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که 30°C دمای بهینه برای تخمیر ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده این ویتامین توسط پ. *فرئودنریچی‌یی* می‌باشد. این در حالی بود که Quesada و همکاران گزارش دادند که دمای بهینه تولید ویتامین ب12، 40°C است (11). این اختلاف می‌تواند به تفاوت در میکروارگانیسم و سوبسترای مصرفی مرتبط باشد.

رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به غلظت سوبسترا بستگی دارد. غلظت بالای سوبسترا اثر ممانعت کنندگی بر رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها دارد (25). در این مطالعه، اثر افزایش غلظت سوبسترا روی رشد پ. *فرئودنریچی‌یی* ارزیابی شد. همانطور که در جدول2 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، میکروارگانیسم 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 خوراک‌دهی‌شده 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 mg/L.day)،

راندمان (14/37 g vit B_{12}/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 خوراک دهی پیوسته منجر به افزایش تولید شد که این مشاهده می تواند 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 میکروارگانیسم 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 میکروارگانیسم‌ها در محیط است.

به کارگیری کشت همِمان پ. *فرئودنریچی‌یی* 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. *فرئودنریچی‌یی* مقدار زیادی اسید 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 ملاس، 10 g/L شربت ذرت خیسانده ، 96 h تخمیر، استفاده از مایه تلقیح (%v/v)5 حاوی *پروپیونی‌باکتریوم فرئودنریچی‌یی* 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.

• References

1. 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.
2. 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.
3. Karmi O, Zayed A, Baraghethi S, Qadi M, Ghanem R. Measurement of vitamin B12 concentration: a review on available methods. The IIOAB journal. 2011; 2: 23-32.
4. 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. Martınez-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 B_{12} in Fed Batch System

*Zarean shahraki S[1], Ahmadi N[2], Khosravi-Darani K[*3], Mortazavian AM[4] , Koohi-Kamali P[5]*

1- M.Sc in Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

2- Students' Research Committee, Graguated 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 FoodTechnology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of MedicalSciences, 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 B_{12} 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 B_{12} 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 B_{12} 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 B_{12} (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 B_{12} 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 B_{12} production.

Conclusion: The best conditions for vitamin B_{12} 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 B_{12}, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*, Fed Batch System, Plackett-Burman Design, Fermentor