تأثير مصدر النتروجين في إنتاجية فيتامين B_{12} من مصل الجبن باستعمال بكتيريا *Propionibacterium freudenreichii*

آمنة جرجنازي*[(1)] وشريف صادق[(2)] وياسر العمر[(1)]

(1). كلية الطب البيطري، جامعة حماه، حماه، سورية.

(2). كلية الهندسة البترولية والكيميائية، جامعة البعث، حمص، سورية.

(*للمراسلة: الباحثة. آمنة جرجنازي. البريد الإلكتروني: aameenaa1982@gmail.com)

تاريخ الاستلام: 2020/09/09 تاريخ القبول: 2020/10/28

الملخص

أجريت هذه الدراسة في مخابر كلية الطب البيطري في جامعة حماه عام 2019 بهدف إنتاج فيتامين B12 باستعمال السلالة البكتيرية *Propionibacterium freudenreichii* المعزولة محلياً من مصل الجبن المدعم بمستخلص الخميرة WBM تحت ظروف تخمير لا هوائية عند درجة حرارة ^{O}C 30 لمدة أربعة أيام، كما تمت دراسة تأثير مصدر النتروجين المضاف إلى وسط التخمير في إنتاجية فيتامين B12 عند استخدام بكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً، حيث تم دراسة تأثير أربع مصادر للنتروجين هي (كازئين – ببتون – مستخلص الخميرة – نتريت الصوديوم) . أجريت عمليات التخمير في دوارق مخروطية (أرلينة) ذات سدادة قطنية سعة 500 ml في حاضنة لاهوائية، حيث تم إجراء ست مكررات لكل تجربة. استعمل جهاز HPLC لتقدير كمية فيتامين B_{12} الناتجة عن عملية التخمير. أثبتت نتائج الدراسة التي تم الحصول عليها أن أفضل مصدر نتروجين هو مستخلص الخميرة $P\leq0.05$ حيث بلغ متوسط إنتاجية فيتامين B_{12} الكلية عند استخدام سلالات بكتيرية من *P. freudenreichii* 635.59 µg/100 ml ، كما تحقق أفضل وزن خلايا رطبة من البادئ عند استخدام مستخلص الخميرة كمصدر للنتروجين حيث بلغ 0.285 g/100 ml.

الكلمات المفتاحية : B_{12}، *Propionibacterium freudenreichii* ، مصل الجبن ،التخمر.

المقدمة:

يعد فيتامين B12 (الكوبالامين) أول مركب عضوي طبيعي يحتوي على الكوبالت وهو أحد أكثر الجزيئات إثارة و روعة في عالم العلوم والطب . تم اكتشافه في الأصل كعامل مضاد لفقر الدم الخبيث في أوائل العشرينات من القرن الماضي عندما قام الطبيبان الأمريكيان مينوت وموروفي بعرضه على علاج فقر الدم الخبيث ، وهو اضطراب وصف لأول مرة في عام 1835 حيث قاما بعلاجه باتباع نظام غذائي يعتمد على تناول الكبد (Warren and Moore, 2012). يعد فيتامين B12 أكبر الفيتامينات وأكثرها تعقيداً، صيغته الكيميائية $C_{63}H_{88}CO\ N_{14}O_{14}P$ ، وكتلته الجزيئية 1355.37 g/mol، مظهره الخارجي عبارة عن بلورات حمراء داكنة أو مسحوق أحمر درجة انصهاره Melting point فوق 300 ºC. بنية فيتامين B12 معقدة وتتكون من حلقة كورين مع ذرة الكوبالت المركزية. يستخدم مصطلح فيتامين B12 لوصف مركبات عائلة الكوباميدات cobamide ولا سيما مجموعة الكوبالامين، وتختلف هذه الكوباميدات عن بعضها البعض بالسلاسل الجانبية المرتبطة بحلقة كورين. المركب الأكثر استخداماً في هذه المجموعة هو السيانوكوبالامين cyanocobalamin ، يجب أن يعزى مصطلح فيتامين B12 لمعناه الواسع ليشمل جميع مركبات الكوباميدات لمجموعة الكوبالامين ، والتي تشمل على وجه الخصوص السيانوكوبالامين CNCbl وهيدروكسي كوبالامين HOCbl وميثيل الكوبالامين MeCbl و 5– ديدوكسي أدينوزيل كوبالامينAdoCbl ، والتي تتميز بالسيانو أو الهيدروكسيل أو الميثيل أو – 5 desoxyadenosyl على التوالي .

من المعروف أن ميثيل الكوبالامين ومركبات 5– ديدوكسي أدينوزيل كوبالامين غير مستقرة للضوء في الشكل المعزول و يتم تحويلها بسهولة إلى هيدروكسي كوبالامين في محلول مائي، لهذا السبب فإن جميع مستحضرات فيتامين B12 التجارية تقريباً تتكون من السيانوكوبالامين المستقر ، وهو الشكل الكيميائي الذي لا يمكن العثور فيه على فيتامين B12 في الطبيعة (Watanabe, 2007); (Hunik, 2002); (Ball, 1998).

يتركز فيتامين B12 الذي تركبه البكتيريا بشكل أساسي في أجسام الكائنات الحية العليا في نظام السلسلة الغذائية الطبيعية. حيث تعد 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) . بعض الطحالب الخضراء المزرقة تحتوي على كميات كبيرة من فيتامين B12، أثبت فيما بعد أن مركبات فيتامين B12 الموجودة في الطحالب أو الأشنيات غير نشطة في الثدييات (Watanabe, 2007) ; (Watanabe *et al.*, 2002). تعد طحالب *Chlorella* إحدى أنواع الطحالب الدقيقة التي تحتوي على فيتامين B12 ، يتم إنتاج ألف طن سنوياً من مساحيق وأقراص Chlorella في الولايات المتحدة وتايوان واليابان وإندونيسيا والصين ويتم بيعها على نطاق واسع كمصادر غذائية وأغذية تكميلية (Jalilian *et al.*, 2019) .

تراوحت القيمة المقدرة لفيتامين B12 في فول الصويا بين 0.7 µg/100 g في التيمبيه الطازج (tempeh) إلى 8 µg/100 g أثناء التخزين ، يعد التيمبيه مع هذه القيم مصدراً بديلاً واعداً لـ B12 (Okada *et al.*, 1983). تراوحت القيمة المقدرة لفيتامين B12 في الأطعمة المشتقة من الحيوانات مثل الحليب (0.3– 0.4) µg/100 g، وفي البيض (0.9 – 1.4) µg/100 g، وفي اللحوم الحمراء الخالية من الدهن 3 µg/100 g وفي الأسماك 2 µg/100 g (Watanabe, 2007) .

يتم تصنيع فيتامين B12 فقط من خلال بعض أنواع السلالات البكتيرية (Watanabe, 2007) ; (Yoshii *et al*., 2019). حيث تشكل الكائنات الحية الدقيقة المنتجة لفيتامين B12 المصدر البيولوجي الأصلي لفيتامين B12 ، لذلك لا يوجد فيتامين B12 إلا في الأطعمة المخمرة بواسطة هذه البكتيريا أو تلك المستخلصة من أنسجة الحيوانات التي تناولت الأطعمة المحتوية على فيتامين B12. تقوم بعض أنواع البكتيريا في الحيوانات المجترة بتركيب فيتامين B12 وبالتالي فإن كبد هذه الحيوانات يعد مصدراً غنياً لفيتامين B12 (Baku and Dickerson, 1996) ; (Rowley and Kendall, 2019) ; (Yoshii *et al*., 2019) .

تعد كمية فيتامين B12 التي يتم تركيبها في البشر و الحيوانات اللاحمة ليست كافية، وبالتالي يجب الحصول عليه من الأغذية التي يتم تناولها، وفي معظم الأحيان من لحوم الحيوانات الأخرى، حيث يبلغ المدخول اليومي الموصى به 2.4 mg (Ellenbogen and Cooper, 1991) ; (Stabler and Allen, 2004) . يعد فيتامين B12 فيتامينياً مهماً للإنسان و الحيوانات ، يستخدم لعلاج فقر الدم الخبيث والتهاب الأعصاب ويستخدم كمكمل غذائي، كما يضاف فيتامين B12 في الأعلاف الحيوانية الهامة كمحسن للنمو وخاصة في صناعة الدواجن (Hunik ,2002) ; (Stabler and Allen, 2004) . يوجد فيتامين B12 بشكل طبيعي فقط في الأطعمة ذات الأصل الحيواني أو في بعض الأطعمة النباتية المخمرة أو المنتجات المدعمة به (Truswell, 2007) ; (Watanabe *et al*., 2013) . وفقاً لإحصائية أعدتها منظمة الصحة العالمية (WHO, 2008) قد يسبب نقص فيتامين B12 ونقص حمض الفوليك مشكلات صحية. ينتشر نقص فيتامين B12 على وجه الخصوص في البلدان النامية بسبب عدم كفاية استهلاك الأغذية الحيوانية (Allen, 2009); (Marsh *et al*., 2012) . كما يعد نقص فيتامين B12 الغذائي مشكلة خطيرة في شبه القارة الهندية والمكسيك وأمريكا الوسطى والجنوبية ومناطق مختارة في إفريقيا ، ويعد انتشار نقص فيتامين B12 الغذائي في القارة الآسيوية نادراً باستثناء النباتيين (Stabler and Allen, 2004).

تتمثل العلامات الرئيسية لنقص فيتامين B12 بفقر الدم الخبيث والاعتلال العصبي. يعد النباتيون والمسنون أكثر عرضة للإصابة بنقص فيتامين B12 مقارنة بغير النباتيين و يجب عليهم تناول الأطعمة المدعمة بفيتامين B12 أو المكملات الغذائية المحتوية على فيتامين B12 لمنع نقص فيتامين B12 (Watanabe, 2007). يعد فيتامين B12 فيتامين أساسي ومطلوب للحفاظ على الخلايا العصبية السليمة لإنتاج المواد الوراثية الضرورية للطاقة وللوظائف الهامة الأخرى (; (Piao *et al*., 2004 Wang *et al*., 2015) ((Rabah *et al*., 2017) .

يرتبط نقص فيتامين B12 بأعراض عصبية متعددة تتراوح من النسيان والإرهاق إلى الاضطرابات العصبية الوخيمة التي لا رجعة فيها. حيث يرتبط نقص فيتامين B12 في شكله الحاد بفقر الدم الخبيث واضطرابات عصبية حادة لا رجعة فيها، في حين أن الشكل المعتدل يمكن أن يحدث مع أعراض غير محددة مثل الخمول أو النسيان أو العقم أو الاكتئاب (Reynolds, 2006). تم الإبلاغ عن وجود نسبة كبيرة من الأشخاص كبار السن الذين لديهم مستويات منخفضة من فيتامين B12 في الدم دون فقر الدم الخبيث لديهم سوء امتصاص فيتامين B12 المرتبط بالبروتين الذي يدعى سوء امتصاص فيتامين B12 الغذائي (Baik and Russell ,1999). يوجد فيتامين B12 بشكل أساسي في الأطعمة المشتقة من الحيوانات لذلك فإن النباتيين والبشر الذين ليس لديهم قدرة في الحصول على هذه الأطعمة معرضون لخطر الإصابة بنقص فيتامين B12 (EFSA NDA Panel, 2015);(Pawlak *et al*., 2013). كما يواجه النباتيون والمسنون في البلدان الأكثر ثراء خطر نقص فيتامين B12 ((Allen, 2010 Pawlak *et al*., 2014)) .

من المحتمل أن يؤدي الاتجاه الحالي نحو إدخال أنظمة غذائية أكثر استدامة مع انخفاض استهلاك الأطعمة المشتقة من الحيوانات (Perignon *et al*., 2017) إلى تعريض عدد أكبر من البشر لخطر الإصابة بنقص فيتامين B12 ما لم يتم تصحيح هذه النواقص بواسطة المكملات الغذائية المحتوية على فيتامين B12 (Eshel *et al*., 2016) .

اقترح في السنوات الأخيرة تدعيم الأطعمة النباتية بالفيتامينات التي تنتجها البكتيريا في الغذاء كوسيلة محتملة لزيادة القيمة الغذائية لهذه المنتجات الغذائية دون زيادة تكاليف الإنتاج (Burgess *et al*., 2009). سيسمح في الوقت نفسه للمستهلكين بتعزيز مدخولهم من الفيتامينات من خلال استهلاك نظام غذائي متوازن (LeBlanc *et al*., 2011) والقضاء على الحاجة إلى المكملات الغذائية المحتوية على الفيتامينات المركبة كيميائياً (Capozzi *et al* ., 2012). بالإضافة لذلك فإن الاهتمام الحالي لاستبدال البروتينات الحيوانية بالبروتينات النباتية يمكن أن يخفض من استهلاك الغذاء الغني بفيتامين B12 في المستقبل (Elmadfa and ,2009) (Marsh *et al*., 2012) ; Singe)، لذلك يمكن أن يكون الحل المستدام لمعالجة نقص B12 هو تدعيم المنتجات النباتية بفيتامين B12 ويفضل بالوسائل الطبيعية مثل التدعيم بالتخمير باستعمال الكائنات الحية الدقيقة المنتجة لفيتامين B12. وقد بذلت جهوداً عديدةً لتدعيم الأطعمة المشتقة من النباتات بفيتامين B12 مثل التيمبي (Keuth and Bisping, 1994) والخضروات المخمرة (Babuchowski *et al*., 1999).

اكشف في العقد الماضي التحصينات الطبيعية للأطعمة بالفيتامينات عن طريق التخمير بالبكتريا من الدرجة الغذائية(Burgess *et al*., 2009) ; (LeBlanc *et al*., 2011) ; (Capozzi *et al*., 2012) ; (Patel *et al*., 2013). حيث تستخدم هذه الطريقة لزيادة القيمة الغذائية للمنتجات الغذائية دون زيادة تكاليف الإنتاج ، كما تسمح للمستهلكين بتعزيز مدخولهم من الفيتامينات في نظامهم الغذائي المعتاد (LeBlanc *et al*., 2011) ويقضي على الحاجة إلى المكملات الغذائية باستعمال مستحضرات الفيتامين المركبة كيميائياً أو حيوياً (Capozzi *et al*., 2012). ويختلف محتوى فيتامين B12 في هذه المنتجات اختلافاً كبيراً حيث يتراوح بين (1.6g/Kg 80–µ وزن طازج واحد) وذلك اعتماداً على نوع الكائنات الحية الدقيقة المستخدمة وشروط التخمير المطبقة (Mo *et al*., 2013 ; Watanabe *et al*., 2013).

تعد الكائنات الحية الدقيقة المسؤولة عن إنتاج فيتامين B12 في لبن فول الصويا المخمر (التيمبي) هي الملوثات الموجودة في فول الصويا *Citrobacter Freundii* و *Klebsiella pneumoniae* (Bisping and Keuth, 1994) Watanabe *et al*., 2013 ;). يصل محتوى فيتامين B12 إلى 180g µ في لبن فول الصويا المخمر باستعمال السلالة البكتيرية *Lactobacillus reuteri ZJ03* (Gu *et al*., 2015).

تم إنتاج حليب الصويا المخمّر باستعمال *L. reuteri* 1098 لتصحيح أعراض نقص فيتامين B12 في الفئران الحوامل (Molina, 2012) ، وتم تحليل فيتامين B12 في هذه الدراسات مع الفحص الميكروبيولوجي والذي يفتقر إلى خصوصية لتمييز الشكل الفعال من فيتامين B12 مع إضافة DMBI (5,6– dimethylbenzimidazole) من الشكل غير الفعال للجسم البشري بدون إضافة DMBI (Watanabe *et al*., 2013) .

يعد توصيف فيتامين B12 الشكل الفعال من الشكل غير الفعال في المنتجات المخمرة مهم جداً لأن العديد من الكائنات الحية الدقيقة تنتج نظائر فيتامين B12 التي تكون غير نشطة بيولوجياً للبشر (Watanabe *et al*., 2013). على سبيل المثال يقوم *L. reuteri*

بشكل خاص بتركيب فيتامين pseudovitamin B12 (Crofts *et al*., 2013); (Santos *et al*., 2007) ، ومن المعروف أن هذا الشكل من فيتامين B12 غير فعال في الجسم البشري (Nex and Stupperich, 1991) ; (Watanabe *et al*., 2013).

يمكن إنتاج فيتامين B12 بالطرق الكيمائية و الحيوية . حيث أن أول ما أنتج فيتامين B12 كيميائياً عام 1977 (Eschenmoser and Wintne, 1977). يعد فيتامين B12 واحد من أكثر الجزيئات الموجودة في الطبيعة تعقيداً والفيتامين الأكثر تعقيداً، نظراً لتعقيد وتكلفة التخليق الكيميائي لفيتامين B12 وصعوبتها من الناحية الفنية والتي تتطلب حوالي 70 خطوة على الأقل. يتم إنتاج الفيتامين بشكل حصري من خلال التخمير الميكروبي من قبل بعض الأنواع القليلة من البكتيريا، لذلك يستخدم التخمير باستعمال الأحياء الدقيقة الصناعية كطريقة بديلة لإنتاج فيتامين B12 (Martens *et al*. ,2002) ; (Murooka *et al*., 2005);(Burgess *et al*., 2009 ; Mohammed *et al*., 2014).

تتضمن عملية إنتاج فيتامين B12 حيوياً حوالي 30 خطوة إنزيمية متواصلة إما من خلال التخمير الهوائي عند استخدام *Pseudomonas denitrificans* أو من خلال التخمر اللاهوائي عند استخدام السلالات البكتيرية *Bacillus megaterium* ، *Propionibacterium shermanii* ، *Salmonella typhimurium* ، *Lactobacillus reuteri* (Martens *et al*., 2002) ; (Murooka *et al*., 2005); (Gu & Li, 2016) .

يبدو أن تحسين الظروف البيئية في إنتاج الفيتامين فعال لزيادة الإنتاج. يؤثر نوع وتركيز مصدر النيتروجين أيضاً على إنتاج فيتامين B12 (Massoud *et al*., 2020). قد تؤثر المركبات المحتوية على النيتروجين بشكل مباشر على عمليات التمثيل الغذائي الثانوية. يشكل النيتروجين حوالي 8–14٪ من وزن الخلايا الجافة وبالتالي فهو مطلوب كعامل نمو. تم استخدام من بين مصادر النيتروجين للتخمير خلاصة الخميرة على نطاق واسع في إنتاج الأحماض العضوية وفيتامين B12 (Wang and Yang, 2013). كما يعد شراب الذرة (وهو المنتج الثانوي لاستخراج النشا من الذرة) مصدر آخر للنيتروجين في عمليات التخمير وهو رخيص الثمن ويحتوي أيضاً على مجموعة متنوعة من الأحماض الأمينية الأساسية والفيتامينات والمعادن. عندما يكون مصدر النيتروجين أقل من مستوى معين يطيل خطوة التكيف كما يكون للكميات الأعلى تأثيرات مثبطة على النمو (Ozadali *et al*., 1996) ; (Chamlagain *et al*., 2016); (Massoud *et al*., 2020) .

– تعريف بكتيريا *Propionibacterium freudenreichii*: هي بكتيريا *Actinobacterium* التي تنتمي إلى ترتيب *Propionibacteriales* و العائلة *Propionibacteriaceae* و الجنس *Propionibacterium* (Watanabe, 2007) .

P. freudenreichii : هي بكتيريا إيجابية الغرام وغير متحركة تلعب دوراً مهماً في تكوين جبن إيمنتال وغيرها من الأجبان ويعد تركيزها في أنواع الجبن السويسرية أعلى من أي جبن آخر. تم اكتشاف *P. freudenreichii* لأول مرة وعزلها في أواخر القرن التاسع عشر من قبل E. von Freudenreich و S. Orla–Jensen. اكتشفوا البكتيريا أثناء دراسة تخمر حمض البروبيونيك في جبن إيمنتال. يدعى جنسها *Propionibacterium* نسبة لحمض البروبيونيك والذي تنتجه هذه البكتيريا. تم تسمية الأنواع *freudenreichii* على اسم E von Freudenreich (Watanabe, 2007).

الغرض من هذه الدراسة هوالتخلص من كميات كبيرة من مصل الجبن الذي يلقى في المجاري عادة فيؤدي إلى خلل في معظم أنواع أنظمة معالجة مياه الصرف الصحي أو يلقى في التربة فيسبب تلوثاً كبيراً في البيئة مما يساعد صناعة الألبان اقتصادياً والتحقق من

مدى ملاءمة مصل الجبن كركيزة لإنتاج فيتامين B12 بواسطة *Propionibacterium freudenreichii* المعزولة محلياً وحل مشكلة استيراده بأسعار باهظة الثمن.

مواد البحث وطرائقه:

–استعمل في البحث مصل جبن ناتج عن تصنيع الأجبان من شركة ألبان حماه ، قمنا بنزع خثرات الكازئين وجزيئات الدسم التي توجد في المصل، تعيق دقائق الكازئين عملية فصل الدسم وتؤثر على نقاوة المنتج لذلك يجب إزالتها أولاً باستعمال قماش ترشيح مناسب، ثم قمنا بفصل الدسم باستعمال الفارزة ، ثم حفظ المصل بعد تعقيمه في الثلاجة لوقت الاستخدام (Teixeira *et al.*, 2016).

– أخذت مسحة من البادئ *P. freudenreichii* المحفوظة بالتبريد (C° –80) في الغليسرين على أطباق YEL آجار وتم التحضين على الدرجة 30^{O} C لمدة 3–4 أيام في ظروف تخمير لاهوائية . تم زرع البادئ من الأطباق في 5 ml من وسط مصل الجبن المدعم بمستخلص الخميرة WBM وحضنت لمدة 3–4 أيام في 30^{O} C في ظل الظروف اللاهوائية. ثم إعادة عملية التنشيط ثلاث مرات قبل عملية التلقيح. بهذه الطريقة تم الحصول على بادئات نقية وحيدة السلالة جاهزة لعمليات التخمير التي سنجريها لاحقاً (Hugenschmidt *et al.*, 2010) ; (Chamlagain *et al.*, 2016) . تم إجراء عملية التخمير وفق طريقة (Deptula *et al.*, 2017) :

– تم تحضير وسط النمو وهو مصل الجبن المدعم بمستخلص الخميرة WBM المستخدم في عملية لتخمير عند درجة الحموضة 6.4 =PH وفقاً لطريقة (Hugenschmidt *et al.*, 2010) ; (Chamlagain *et al.*, 2016)، تمت بإضافة لكل لتر من المصل 10 g من مستخلص الخميرة و 13 g من محلول لاكتات الصوديوم (60 %w/w) و 0.1 g من Tween 80 و 0.2 g من كبريتات المغنيزيوم و 0.02 g من كبريتات المنغنيز و 100 ml من فوسفات البوتاسيوم الموقي .

– تم خلط 700 ml مصل الجبن درجة حموضته (pH=5) مع 150 ml من محلول (Tween 80–Mg–Mn) وتم تعقيمه عند درجة حرارة 12° C لمدة 15 دقيقة بشكل منفصل عن 150 ml محلول الخميرة و اللاكتات والفوسفات (pH 6.6). تم خلط الجزأين قبل الاستخدام مباشرة للحصول على لتر واحد من وسط WBM. تمت إضافة 5 mg/l محلول معقم من كلوريد الكوبالت بفلتر (µm 0.2) إلى الوسط . أجريت عملية التخمير حيث أخذ 225 ml من وسط النمو WBM (مصل الجبن المدعم بمستخلص الخميرة ومصدر الكربون) في 6 دوارق مخروطية (أرلينة) ذات سدادة قطنية في كل أرلينة 225 ml من وسط النمو . تم تلقيح وسط التخمير بالبادئ المنشط بمقدار 25 ml وتم إغلاق السدادة لتأمين التخمر اللاهوائي ، ثم قمنا بالتحضين على الدرجة 30 ^{O}C لمدة 4 أيام في ظروف لاهوائية في حاضنة لاهوائية (Teixeira *et al.*, 2016) .

عطل البادئ بعد الانتهاء من التخمير باستعمال 10 ml 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 (Deptula *et al.*, 2017) .

– تم قياس تركيز B12 في وسط التخمير وفي خلايا البادئ وذلك بعد تعطيل البادئ واستخلاص B12 من الخلايا. تم تحديد تركيز B12 باستعمال جهاز HPLC ياباني الصنع وفق طريقة (2010) , Van&Britz . جهاز HPLC المستخدم طراز Shimadzu ياباني الصنع: اسم العمود C18 LC–10AD VP (Spherisor b ODS–Z 150 *4.6 mm, 5µm ;Supelco). يعمل

الكاشف المستخدم في مجال الأشعة المرئية وفوق البنفسجية (VIS–UV) نموذج Waters 2487 Dual l Absorbance Detector موصول مع حاسوب يحوي البرامج الخاصة بهذا التحليل وهو البرنامج Lc solution ، وكان العمود المستخدم هو C18 أو ما يعرف وفق دستور الأدوية الأمريكي USP بالعمود L1 وهو يحوي الحشوة silane decyl octa، (ODS) المطعمة كيميائياً على سيليكا مسامية . الطور المتحرك هو (ماء مقطر : ميتانول) بنسبة (105:195) فنحصل على 300 ml من الطور المتحرك . تم القياس عند طول موجة λ = 254 nm والتدفق 1ml/min ودرجة حرارة ^{O}C 40 و حجم خلية الحقن 20 µl . زمن التحليل الكلي بحدود 15 min .

تم تحضير عينتين معياريتين بتركيزين مختلفين هما µg/ml(1000 و 40). كما قمنا بفلترة العينة قبل حقنها بالجهاز بفلاتر خاصة 0.5 ميكرومتر.

- تم تحضير العينة قبل القياس على جهاز HPLC، حيث وزنت كتلة الخلايا الرطبة ثم عطلت عن العمل مؤقتاً باستعمال 10 m/l من المحلول الموقي هيدروكسيد الصوديوم و حمض الخل عند PH=4.5 ثم أضيفت 100 µl من 1% سيانيد الصوديوم بهدف تحويل B12 ونظيره للشكل المناسب وتم تسخين في حمام مائي مغلي لمدة 30 دقيقة ثم تبرد الأنابيب في حمام ماء ثلجي ثم عطلت عن العمل الراسب المتبقي في 5 ml من المحلول الموقي PH=6.2 وتم الفصل بالطرد المركزي .
- **التحليل الإحصائي:**

عولجت النتائج إحصائياً بطريقة تحليل التباين باتجاه واحد One–way ANOVA واختبار فيشر F لمقارنة المتوسطات المتعددة للعينات باستعمال برنامج Minitab الإصدار 17.0 عند $P \geq 0.05$.

النتائج و المناقشة:

تم في هذه الدراسة استبدال مصدر النيتروجين في وسط التخمير بمصادر نيتروجينية مختلفة ودرسنا تأثيرها في إنتاجية فيتامين B12 ، حيث أظهرت النتائج أن إنتاجية فيتامين B12 تختلف باختلاف نوع مصدر النتروجين المضاف إلى وسط التخمير مع وجود فروق معنوية واضحة في إنتاجية فيتامين B12 حسب مصدر النتروجين المضاف لوسط التخمير $P \leq 0.05$ ،

يبين الجدول (1) نتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف لوسط التخمير في إنتاجية فيتامين B12 الكلية (وسط التخمير+ داخل الخلايا الميكروبية) عند استخدام البكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً باستعمال تقنية تحليل التباين باتجاه واحد ANOVA One– way.

الجدول (1). نتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف لوسط التخمير في إنتاجية فيتامين B12 الكلية عند استخدام بكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً.

مصدر النتروجين 10 g/l	الكازئين	ببتون	مستخلص الخميرة	نترات الصوديوم
حجم العينة N	6	6	6	6
المتوسط الحسابي تركيز B12 في وسط التخمير µg/100 ml	90 ^{C}	120.68^{B}	148.02^{A}	49.708 ^{D}
الانحراف المعياري	0.561	1.836	6.36	1.336
المتوسط الحسابي تركيز B12 في الخلايا الميكروبية µg/100 ml	306.99^{C}	394.84^{B}	487.56^{A}	197.53^{D}

الانحراف المعياري	1.828	4.52	1.981	2.18
مجموع المتوسط الحسابي لتركيز B12 الكلي في(الوسط +خلايا ميكروبية) µg/100 ml	396.83^{C}	514.60^{B}	635.01^{A}	247.08^{D}
الانحراف المعياري	2.364	5.76	7.72	3.29

المتوسطات التي لا تتشابه بالأحرف تكون مختلفة اختلافاً معنوياً كبيراً عند $P \leq 0.05$ ، المقارنة ضمن السطر الواحد.

ويبين الجدول (2) تحليل التباين باتجاه واحد One-way ANOVA لنتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف لوسط التخمير على إنتاجية فيتامين B12 الكلية عند استخدام بكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً.

الجدول (2). تحليل التباين باتجاه واحد One-way ANOVA لنتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف للوسط على إنتاجية فيتامين B12 الكلية عند استخدام البكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً.

مصدر التباين Source	درجات الحرية DF	مجموع المربعات SS	متوسط المربعات MS	قيمة F-Value	الاحتمال P-Value
مصدر النتروجين	3	494392	164797	604.15	0.000
الخطأ التجريبي	20	546	27	--	--
التباين الكلي	23	494937	--	--	--

نلاحظ من الجدول (2) أن قيمة $P \leq 0.05$ وبالتالي هناك فروق معنوية عند درجة حرية DF=3 في متوسط إنتاجية فيتامين B12 الكلية حسب مصدر النتروجين المضاف لوسط التخمير عند استخدام بكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً عند مستوى وثوقية 5% .

ويبين الجدول (3) نتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف لوسط التخمير في وزن الخلايا الرطبة عند إنتاج فيتامين B12 باستعمال البكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً باستعمال تقنية تحليل التباين باتجاه واحد One- way ANOVA.

الجدول (3). نتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف للوسط في وزن الخلايا الرطبة للبادئ عند إنتاج فيتامين B12 باستعمال البكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً .

مصدر النتروجين g/l 10	حجم العينة N	متوسط وزن الخلايا الرطبة g/100 ml	الانحراف المعياري
الكازئين	6	0.177 ^{C}	0.00816
ببتون	6	0.252 ^{B}	0.00983
مستخلص الخميرة	6	0.285 ^{A}	0.00548
نتريت الصوديوم	6	0.148 ^{D}	0.01835

المتوسطات التي لا تتشابه بالأحرف تكون مختلفة اختلافاً معنوياً كبيراً عند $P \leq 0.05$ ، المقارنة ضمن العمود الواحد.

كما يبين الجدول (4) تحليل التباين باتجاه واحد One-way ANOVA لنتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف للوسط في وزن الخلايا الرطبة للبادئ عند إنتاج فيتامين B12 باستعمال البكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً

الجدول (4). تحليل التباين باتجاه واحد One-way ANOVA لنتائج تأثير مصدر النتروجين المضاف للوسط في وزن الخلايا الرطبة للبادئ عند إنتاج فيتامين B12 باستعمال البكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً.

مصدر التباين Source	درجات الحرية DF	مجموع المربعات SS	متوسط المربعات MS	قيمة F-Value	الاحتمال P-Value
مصدر النتروجين	3	0.072946	0.024315	183.51	0.000
الخطأ التجريبي	20	0.002650	0.000132	--	--
التباين الكلي	23	0.075596	--	--	--

نلاحظ من الجدول (4) أن قيمة $P \leq 0.05$ وبالتالي هناك فروق معنوية عند درجة حرية DF=3 في وزن الخلايا الرطبة حسب مصدر النتروجين المضاف لوسط التخمير عند إنتاج فيتامين B12 استخدام بكتيريا *P. freudenreichii* المعزولة محلياً عند مستوى وثوقية 5% .

بينت النتائج أن أفضل مصدر نتروجين هو مستخلص الخميرة حيث بلغ متوسط إنتاجية فيتامين B12 الكلية (وسط التخمير + خلايا البادئ) عند استخدام سلالات بكتيرية من *P. freudenreichii* المعزولة محلياً 635.59 µg/100 ml. كما تشير النتائج إلى وجود فروق معنوية واضحة $P<0.05$ في متوسط وزن الخلايا الرطبة من البادئ البكتيري المتراكم في وسط التخمير عند استخدام مستخلص الخميرة كمصدر نتروجيني عند استخدام سلالات بكتيرية من *P. freudenreichii* المعزولة محلياً 0.148 g/100ml وهذا يتوافق مع Chamlagain *et al.*, (2016) و Hugenschmid *et al.*, (2011) و Massoud *et al.*, (2020) .

الاستنتاجات:

1- إمكانية إنتاج فيتامين B12 باستعمال سلالات بكتيرية من *P. freudenreichii* معزولة محلياً من مصل الجبن المدعم بمستخلص الخميرة في ظروف لا هوائية .

2- تحققت أعلى إنتاجية من فيتامين B12 باستعمال سلالات بكتيرية من *P. freudenreichii* المعزولة محلياً عند استخدام مستخلص الخميرة كمصدر نتروجين لعمليات التخمير 636.01 µg/100ml .

التوصيات:

- تحسن إنتاج فيتامين B12 عن طريق إجراء عملية التخمير في مفاعل حيوي حيث يتم التحكم بحموضة الوسط عن طريق الحفاظ على تركيز حمض البروبيونيك الذي يؤدي تراكمه في وسط التخمير إلى إعاقة إنتاج .

2- دراسة تأثير حمض البروبيونيك وDMBI و الريبوفلافين [RF] و النيكوتيناميد [NAM] على إنتاجية فيتامين B12 بواسطة *P. freudenreichii*.

3- نوصي بالبحث عن حلول مبتكرة لإدارة النفايات بالتقانة الحيوية الذي يقلل من تلوث البيئة ليس فقط عن طريق التخلص من النفايات ولكن أيضًا عن طريق تحويلها إلى منتجات صناعية مفيدة وقيمة.

4- تطوير أساليب التقانة الحيوية لزراعة الكائنات الحية الدقيقة باستعمال الأمواج فوق الصوتية لتحفيز نموها وتنميتها يمكن اعتبارها واعدة للغاية .

5- يوصى بمزيد من الدراسات المستقبلية حول إنتاج B12 بواسطة البكتيريا من جنس *Propionibacterium* مع أخذ بعين الاعتبار مجموعة أكبر من العوامل المترافقة والمؤثرة على الإنتاجية مثل تحسين ظروف التخمير عن طريق إضافة مصادر الكربون المناسبة للبادئ المستخدم أو استخدام المنشطات .

6- يوصى في الدراسات البحثية المستقبلية اختيار مادة أولية غنية بالكوبالت لزيادة إنتاج B12 بدون إضافة الكوبالت .

المراجع:

Allen, L. H. (2009). How common is vitamin B-12 deficiency?. The American journal of clinical nutrition, 89(2):693S-696S.

Allen, L. H. (2010). Bioavailability of vitamin B12. International Journal for Vitamin and Nutrition Research. 80(4): 330.

Babuchowski, A.; L. Laniewska-Moroz; and I. Warminska-Radyko (1999). Propionibacteria in fermented vegetables. Le Lait. 79(1):113-124.

Baik, H. W.; and R. M.Russell (1999). Vitamin B12 deficiency in the elderly. Annual review of nutrition. 19(1): 357-377.

Ball, G. F. M. (1998). Vitamin K. In BioaVailability and Analysis of Vitamins in Foods .Springer, Boston, MA. Pp. 241-266.

Ball, G.F.M. (2006). Vitamins in foods: analysis bioavailability and stability. Taylor & Francis, USA, Pp 814.

Basu, T. K.; and J. W. Dickerson (1996). Vitamins in human health and disease. Cab International.

Burgess, C. M.; E. J.Smid; and D. van Sinderen (2009). Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. International journal of food microbiology.133(1-2): 1-7.

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

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

Chamlagain, B.; T. A.Sugito; P. Deptula; M. Edelmann; S. Kariluoto; P.Varmanen; and V. Piironen (2018). In situ production of active vitamin B12 in cereal matrices using Propionibacterium freudenreichii. Food science & nutrition. 6(1): 67-76.

Crofts, T. S.; E. C. Seth; A. B. Hazra; and M. E. Taga (2013). Cobamide structure depends on both lower ligand availability and CobT substrate specificity. Chemistry and Biology.(20):1265–1274.

Deptula, P.; P. Kylli; B. Chamlagain; L. Holm; R. Kostiainen; V. Piironen; and P.Varmanen (2015). BluB/CobT2 fusion enzyme activity reveals mechanisms responsible for production of active form of vitamin B 12 by Propionibacterium freudenreichii. Microbial cell factories.14(1): 186.

Deptula, P. (2017). A multifaceted study of Propionibacterium freudenreichii, the food-grade producer of active vitamin B12. Dissertationes Schola Doctoralis Scientiae Circumiectalis, Alimentariae, Biologicae. ISSN 2342-5423.

Ellenbogen, L.; and B.A. Cooper (1991). Vitamin B12. In: Machlin, L.J. (Ed.), Handbook of Vitamins. Marcel Dekker Inc., New York. Pp. 491–536.

Elmadfa, I.; and I. Singer (2009). Vitamin B-12 and homocysteine status among vegetarians: a global perspective. The American journal of clinical nutrition. 89(5): 1693S-1698S.

Eschenmoser, A.; and C. E. Wintner (1977). Natural Product Synthesis and Vitamin B12. Science. 196(4297): 1410-1420

Eshel, G.; A. Shepon; E. Noor; and R. Milo (2016) . Environmentally optimal, nutritionally aware beef replacement plant-based diets. Environmental science & technology. 50(15): 8164-8168.

Gu, Q.; C. Zhang; D. Song; P. Li; and X. Zhu (2015). Enhancing vitamin B12 content in soy-yogurt by Lactobacillus reuteri. International journal of food microbiology. (206): 56-59.

Gu, Q.; and P. Li (2016). Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. Probiotics and prebiotics in human nutrition and health.

Hugenschmidt, S.; S. M. Schwenninger; N. Gnehm; and C. Lacroix (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.

Hugenschmidt, S.; S. M.Schwenninger; and C. Lacroix (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.

Hunik, J. H. (2002). "Process for the production of vitamin B12." U.S. Patent No. 6,492,141. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Jalilian, N.; G. D. Najafpour; and M. Khajouei (2019). Enhanced Vitamin B12 Production using Chlorella vulgaris. International Journal of Engineering. 32(1): 1-9.

Keuth, S.; and B. Bisping (1994). Vitamin B12 production by Citrobacter freundii or Klebsiella pneumoniae during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60(5): 1495-1499.

LeBlanc, J. G.; J. E. Laiño; M. J. del Valle; V. V .Vannini; D. van Sinderen; M. P. Taranto; and F. Sesma (2011). B- Group vitamin production by lactic acid bacteria–current knowledge and potential applications. Journal of applied microbiology.111(6): 1297-1309.

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

Massoud, R.; K. Khosravi-Darani; M. Golshahi; S.Sohrabvandi; and A. M. Mortazavian (2020) . Assessment of Process Variables on Vitamin B12 Production in Fermented Dairy Product Including Propionic Acid. Current Nutrition & Food Science. 16(2): 155-161.

Mo, H.; S. Kariluoto; V. Piironen; Y. Zhu; M. G. Sanders; J. P.Vincken; and M. R. Nout (2013). Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. Food chemistry. 141(3): 2418-2425.

Mohammed, Y.; B. Lee; Z. Kang; and G. Du (2014a). Development of a two-step cultivation strategy for the production of vitamin B12 by Bacillus megaterium. Microbial cell factories. 13(1):102.

Mohammed, Y.; B. Lee; Z. Kang; and G. Du (2014b). Capability of Lactobacillus reuteri to produce an active form of vitamin B12 under optimized fermentation conditions. Journal of Academia and Industrial Research (JAIR). 2(11): 617.

Moore, S. J.; and M. J. Warren (2012). The anaerobic biosynthesis of vitamin B12. Biochem. Soc. Trans. (40): 581–586.

Murooka, Y.; Y. Piao; P. Kiatpapan; and M. Yamashita (2005). Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of Propionibacterium freudenreichii. An overview. Le Lait. 85(1-2): 9-22.

Okada, N.; R. S. Hadioetomo; and S. Niekuni (1983). Vitamin B12 content of fermented foods in the tropics. Report of National Food Research Institute. (43): 126–129.

Ozadali, F.; B. A. Glatz; and C. E. Glatz (1996). Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production byPropionibacterium acidipropionici. Applied microbiology and biotechnology.44(6): 710-716.

Patel, A.; N. Shah; and J. B. Prajapat (2013). Biosynthesis of vitamins and enzymes in fermented foods by lactic acid bacteria and related genera-A promising approach. Croatian journal of food science and technology.5(2): 85-91.

Pawlak, R.; S. E. Lester; and T. Babatunde (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.

Perignon, M.; F.Vieux; L. G. Soler; G. Masset; and N. Darmon (2017). Improving diet sustainability through evolution of food choices: review of epidemiological studies on the environmental impact of diets. Nutrition reviews.75(1): 2-17.

Piao, Y.; M. Yamashita; N. Kawaraichi; R. Asegawa; H. Ono; and Y. Murooka (2004). Production of vitamin B12 in genetically engineered Propionibacterium freudenreichii. Journal of bioscience and bioengineering.98(3): 167-173.

Rabah, H.; R. do Carmo; F. Luiz; and G. Jan (2017). Dairy propionibacteria: versatile probiotics. Microorganisms. 5(2): 24.

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

Rowley, C. A.; and M. M. Kendall (2019). To B12 or not to B12: five questions on the role of cobalamin in host-microbial interactions. PLoS pathogens. 15(1).

Santos, F.; J. L. Vera; P. Lamosa; G. F. de Valdez; W. M. de Vos; H. Santos; and J. Hugenholtz (2007). Pseudovitamin is the corrinoid produced by Lactobacillus reuteri CRL1098 under anaerobic conditions. FEBS letters.581(25): 4865-4870.

Stabler, S. P.; and R. H. Allen (2004). Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. Annu. Rev. Nutr. (24): 299-326.

Stupperich, E.; and E. NEXØ (1991). Effect of the cobalt- N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B12 binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. European journal of biochemistry. 199(2): 299-303.

Teixeira, M. I.; J. C. R. Alva; and M. H. M. Rocha-Leão (2016). Whey permeate fermentation by Propionibacterium freudenreichii. Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN. 8(1):35.

Truswell, A. S. (2007). Vitamin B12. Nutrition and Dietetics. 64(s4).

Van Wyk, J.; and T. J. Britz (2010). A rapid HPLC method for the extraction and quantification of vitamin B 12 in dairy products and cultures of Propionibacterium freudenreichii. Dairy science & technology. 90(5): 509-520.

Wang, P.; Z. Zhang; Y. Jiao; S. Liu; and Y. Wang (2015). Improved propionic acid and 5, 6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B12 fermentation by Propionibacterium freudenreichii. Journal of biotechnology. (193): 123-129.

Watanabe, F.; S.Takenaka; H.Kittaka-Katsura; S. Ebara; and E. Miyamoto (2002). Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. Journal of nutritional science and vitaminology. 48(5): 325-331.

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

Watanabe, F.L; Y.Yabuta; Y. Tanioka; & T. Bito (2013). Biologically active vitamin B12 compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. Journal of agricultural and food chemistry.61(28): 6769-6775.

Wolkers–Rooijackers, J. C.; M. F. Endika; and E. J. Smid; (2018). Enhancing vitamin B12 in lupin tempeh by in situ fortification. Lwt. (96): 513-518.

Xia, W.; W. Chen; W. F. Peng; and K. T. Li (2015). Industrial vitamin B 12 production by Pseudomonas denitrificans using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. Bioprocess and biosystems engineering. 38(6): 1065-1073.

Xie, C., Coda, R.; B.Chamlagain; and P.Varmanen (2019). Co-fermentation of Propionibacterium freudenreichii and Lactobacillus brevis in Wheat Bran for in situ Production of Vitamin B12. Frontiers in microbiology.(10): 1541.

Xie, C. (2020). In situ fortification of vitamin B12 in grain materials by fermentation with Propionibacterium freudenreichii. Department of Food and Nutrition University of Helsink. ISSN 0355-1180

Ye, K.; M. Shijo; S. Jin; and K. Shimizu (1996). Efficient production of vitamin B12 from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. Journal of fermentation and bioengineering. 82(5): 484-491.

Yoshii, K.; K. Hosomi; K. Sawane; and J. Kunisawa (2019). Metabolism of dietary and microbial vitamin B family in the regulation of host immunity. Frontiers in nutrition.(6): 48.

Effect of Nitrogen Source on Vitamin B_{12} Production from Whey Cheese Using *Propionibacterium freudenreichii*

Amena Jarjanazii[(1)] * , Sharef Sadik [(2)] and Yaser Alomar [(1)]

(1). College of Veterinary Medicine, University of Hama, Hama, Syria.
(2).College of Petroleum and Chemical Engineering, Al-Baath University, Homs, Syria.
(*Corrsponding author: Amena Jarjanazii. E-Mail: Aameenaa1982@gmail.com).

Received: 09/09/2020 Accepted: 28/10/2020

Abstract

This study was conducted at the laboratories of the College of Veterinary Medicine, University of Hama in 2019 with the aim of producing vitamin B12 using *the Propionibacterium freudenreichii* bacterial strain locally isolated from cheese whey fortified with yeast extract WBM under anaerobic fermentation conditions at a temperature of 30 °C for a period of four days. Also, The effect of nitrogen addition to the fermentation medium on the production of vitamin B12 when using locally isolated *P. freudenreichii* bacteria was studied, where four nitrogen sources (casein - peptone - yeast extract - sodium nitrite) were used. Fermentation was performed in conical flasks (Arlene) with a 500 ml tampon in an anaerobic incubator. Six replicates were performed for each experiment. The HPLC was also used to estimate the amount of vitamin B12 resulting from the fermentation process. The results of the study obtained proved that the best source of nitrogen was yeast extract $P \leq 0.05$ as the average total productivity of vitamin B12 when using locally isolated bacterial strains of *P. freudenreichii* was µg / 100 ml 635.59, as well. Best fresh cell weight was achieved when using yeast extract as a source of nitrogen as 0.285 g / 100 ml.

Keyword: B12,*Propionibacterium freudenreichii*, Cheese whey, Fermentation.