



Ст а т ь я

Получение новых штаммов-продуцентов витамина B12 *Acetobacter Malorum* HFD 3141 и *Acetobacter orientalis* HFD 3031 из

Закваска домашнего брожения

Лиза Штумпф^{1,*}, Стефан Шильдбах¹ и Эйдан Коффи²¹ Кафедра пищевых технологий, Университет прикладных наук Фульда, 36037 Фульда, Германия; stefan.schildbach@lt.hs-fulda.de² Факультет биологических наук, Мюнстерский технологический университет, T12 P928 Корк, Ирландия; aidan.coffey@mtu.ie *

Адрес для переписки: lisa.stumpf@lt.hs-fulda.de

Аннотация: Витамин B12 является важнейшим питательным веществом для веганского и вегетарианского образа жизни, поскольку источник и витамин B12 встраиваются редко. Традиционные ферментированные продукты можно обогатить, добавив бактерии, продуцирующие витамин B12, что обеспечит источник и витаминов неживотного происхождения. Цель заключалась в том, чтобы выделить производителя витамина B12, который способен производить активный для человека витамин даже при низких значениях pH, что обычно можно было использовать при обогащении фруктовых соков. Поэтом ферментированные продукты (домашние и промышленные) и пробиотик были проверены на наличие штаммов, продуцирующих витамин B12. Модифицированный микробиологический анализ витамина B12 на основе *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20355 использовался для идентификации образцов, содержащих витамин B12, и наличия штаммов, продуцирующих витамин B12. В результате скрининга было выделено несколько штаммов, положительно на образование витамина B12, полученных из закваски. Масс-спектрометрия подтвердила биосинтез источника и физиологическая и активная формы человека. Идентификация видов, проведенная немецкой коллекцией штаммов микроорганизмов и клеточных культур, привела к выделению двух видов: *Acetobacter orientalis* и *Acetobacter Malorum*, из которых два изолята были дополнены характеристиками Потенциал биосинтеза кобаламина в пищевых матрицах был продемонстрирован для *A. malorum* HFD 3141 и *A. orientalis* HFD 3031 в яблочном соке при различных значениях pH (2,85–3,80). Изоляты синтезировали до 18,89 мг/л и 7,97 мг/л витамина B12 при pH 3,80. Результаты этого исследования показывают, что укуснокислые бактерии (ААБ) и ферментированные укуснокислые продукты являются многообещающими источниками витамина B12 и его производителей, на которые в прошлом могли не обращать внимания.

Ключевые слова: кобаламин; псевдокобаламин; ацетобактерия; укуснокислые бактерии; биофортификация пищевых продуктов; скрýтый голод



Цитирование: Штумпф, Л.; Шильдбах, С.;

Коффи А. Получение нового витамина

Продукционные штаммы B12 *Acetobacter**Malorum* HFD 3141 и *Acetobacter**orientalis* HFD 3031 из дома-

Ферментированная закваска. Прил.

Микробиол. 2024, 4, 986–999.

<https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030067>

Акademischer редактор: Сабина Фиджан

Поступила: 21 мая 2024 г.

Пересмотрено: 8 июня 2024 г.

Принято: 14 июня 2024 г.

Опубликовано: 23 июня 2024 г.



Копирайт: © 2024 автор.

Лицензия: MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе.

распространяется на условиях и

условия Creative Commons

Лицензия с указанием автора (CC BY)

([https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

1. Введение

Несмотря на то, что кобаламин (витамин B12) вырабатывается источником и не оторыми бактериями и археями, продукты животного происхождения (мясо, яйца и молоко) представляют собой основной источник кобаламина в рационе человека [1]. Если их пропустить, соблюдение рекомендуемого уровня ежедневного потребления может оказаться затруднительным. Немецкое веганское исследование (GVS) выявило значительный разрыв в потреблении витамина B12 среди веганов и вегетарианцев [2]. GVS обнаружил, что мужчины веганского питания всего 0,84 ± 1,21 мг/день, а женщины веганского питания 0,78 ± 2,14 мг/день кобаламина, что ниже рекомендуемой EFSA суточной дозы 4,0 мг [3]. Таким образом, обеспечение жизненно важными питательными веществами посредством ферментированных растительных продуктов представляет собой благоприятный и экономически эффективный подход к устранению неравенства в питании [4].

Не все бактерии способны продуцировать витамин B12, поэтому необходимо выделить и идентифицировать способные штаммы. Выявленные в литературе продуценты витамина B12 относятся к родам *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protiminobacterium*.

ter, Proteus, Pseudomonas, Rhizobium, Salmonella, Serratia, Streptomyces, Streptococcus, Xanthomonas [5], Propionibacterium (например [5,6]), Acetobacter [7,8], Gluconobacter [8] и Lactobacillus (например, [9,10]). В то время как денитрификаторы Pseudomonas и Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii используются для промышленных крупномасштабных производств, исследования по биофортификации пищевых продуктов сосредоточены на молочнокислых бактериях (МКБ) и пропионовокислых бактериях (ПАБ) [11], главным образом Propionibacterium freudenreichii [4]. LAB и P. freudenreichii обладают статусом GRAS («общепризнанными без опасными») согласно Управлению по контролю за продуктами и лекарствами, поэтому их применение понятно. Штаммы P. freudenreichii прототипны по всем аминокислотам и аминокислотам [12], что означает, что они несут только низкую потребность в питательных веществах. Предпочтительное значение pH для ПАБ находится в диапазоне от 6 до 7 [13], а толерантность к осмотическому давлению до pH 5,0 [14]. Как следует из названия, они производят острую пропионат, характерный для некоторых типов сыра [15], но может быть нежелателен в биообогащенных продуктах. МКБ производят менее острую молочную кислоту в качестве основного конечного продукта метаболизма; они чувствительны к осмотическому давлению и несут несколько аминокислот и витаминов [16] и требуют богатой питательными веществами среды для ферментации. Оптимальный pH зависит от штамма и колеблется от 5,5 до 6,2 для лактобацилл и от 4,5 до 6,5 для большинства штаммов рода Lactobacillus [17].

Для выделения и идентификации микрорганов-продуцентов витамина B12 из сложных матриц или коллекций штаммов используются различные подходы, в том числе методы, основанные на составе среды, наличии отдельных генов или прямом измерении витамина в ферментационной среде. Чаще всего используется культивирование потенциального роста в средах, не содержащих витамина B12, используется для селективного выращивания потенциально производящих штаммов. Гипотеза состоит в том, что на среде могут расти только бактерии, если они способны производить витамин. Витамин B12 действует как кофермент в различных прокаротиновых путях, например, в кобаламин-зависимой метионинсинтазе [18], глицеролдегидратазе и этаноламинамиаза [19]. Однако, поскольку не все бактерии используют кобаламин-зависимые пути и существуют независимые от кобаламина альтернативы [19], этот метод не является полностью дискриминационным по отношению к непродуцирующим организмам [20]. Этот метод был успешно применен, выделяя чистые штаммы Lactobacillus из Нукладзуке (японский маринованный огурец) [9]; один Bacillus sp. штамм Tya-Noa (несоленая ферментированная соя) [21]; и Lactobacillus Lactis, Levilactobacillus brevis и Pediococcus pentosaceus в результате промышленной ферментации Chlorella vulgaris [22]. Присутствие гомологов слитых генов bluB/cobT2 [23,24] или гена cbiK [20,25] использовалось в качестве маркера для идентификации вероятных производителей витамина B12. Эти гены кодируют специфические ферменты синтеза кобаламина: ферменты BluB и CobT2 катализируют образование низшего лиганда DMBI (5,6-диметилбензимидазола) витамина B12, а также его активацию и включение в молекулу кобаламина [24]. CbiK катализирует включение иона кобальта в структуру кобаламина [26]. Бхушан и др. применили трехфазный (среда, не содержащая витамина B12, добавление кобальта и скрининг гена cbiK) метод скрининга для выделения лактобацилл из образцов человеческого (грудное молоко и фекалии) [20]. В результате скрининга были выделены два штамма Lactiplantibacillus plantarum.

Хотя выделение было успешным, авторы приходят к выводу, что первые два этапа (или лактобациллы) должны быть более селективными и проводиться с использованием по скринингу гена cbiK, что обычно доступно для идентификации перспективных штаммов. Кумари и др. провели целенаправленную однократную идентификацию по гену cbiK и идентифицировали три штамма, продуцирующих витамин B12 (Limosilactobacillus reuteri F2, Lactiplantibacillus plantarum V7 и Lacticaseibacillus rhamnosus F5), выделенных из образцов фекалий младенцев [25]. Хугеншидт и др. скринировали штаммы PAB и LAB путем прямого измерения содержания кобаламина в культуральной среде методом ВЭЖХ, не ограничивая штаммы тестируемых высушенных методами [6].

После идентификации вероятных производителей витамина B12 их способность к образованию витамина B12 обычно проверяется с помощью микробиологического анализа с использованием Lactobacillus leichmannii ATCC 7830 (=L. delbrueckii subsp. Lactis DSM 20355) [10,21,22] или хроматографических методов (жидкостная хроматография). – тандемная масс-спектрометрия (ЖХ-МС/МС) [23] и сверхбыстрая жидкостная хроматография с диодным детектором (UFLC-DAD) [20]. Микробиологический анализ витамина B12 основан на эталонном соотношении индикаторного штамма витамина B12, который инкубируется с определенным объемом образца в среде для анализа, не содержащей витамина

шг амм, определяемый по оптич. еск ой плот ност и (ОП), является мерой к онц ент рац ии присут ст вующе о вит амина В12 . Что к асает ся физ иологи и пит ания, к райне важно уч ит ьват ь возможность т ого, ч т о мик роорган измымогут произ вод ит ь форм ы обаламина, к от орые не имеют физ иологи ч еск ой функ ц ии у ч еловек а (псевд ок обаламин). Од на к о у мик роорган измов эт и аналоги могут выпол нят ь т е же функ ц иональ ные свойст ва, ч т о и наст оящий вит амин В12 [23]. Хотя индик ат орный шг амм не может от лич ит ь акт ивный для ч еловек а вит амин В12 от неак т ивны х псевд овит аминов, хромат ог рафич еск ие проц едур ы т ак ие к ак LC-MS/MS, позво ляю т различ ат Акт ивные и неак т ивные форм ы вит амина В12 ч еловек а различ аю т ся по нижнему ак сially ному лиг анду. Нижним ак сially ным лиг андом псевд овит аминов является аденин, т ог да к ак у ч еловек а Д МБИ присут ст вует в акт ивной форм е [7,23].

Эт о исследование было направлено на выделение и идентифицирование ионов шг аммов, продуцирующих обаламин, из сложных продуктов ферментации и смешанных культур с использованием среды не содержащей вит амина В12. Изolat должен быть способен продуцировать физиологический и активный вит амин В12 и демонстрировать толерантность к низким значениям pH. Применение для биоферментации и пищевых продуктов было протестировано на яблочном соке для достижения заявленных концентратов вит амина В12 без необходимости регулирования pH или добавления веществ, способствующих росту (например, дрожжевого экстракта). Целевой была концентрация не менее 1,9 мкг вит амина В12/л, поскольку это требование для заявлений о вреде для здоровья в соответствии с Регламентом (ЕС) № 1169/2011 Европейского парламента и совета (ред а

2. Материалы и методы

2.1. Использование питательных сред для обогащения

и выделения mMBA (модифицированная микробная среда для анализа вит амина В12): всего в 42,3 г микробной среды для анализа вит амина В12 (M036, HiMedia, Thane, Индия) добавляли 5 мг/л кобальта (II). -гексагидрат хлора (Carl Roth, Карлсруэ, Германия) и 5 г/л глицерина (VWR Chemicals, Дармштадт, Германия) для накопления культуры Перед автоклавированием (121 °C, 15 мин) 9 мл среды разливали в культивальные пробирки емкостью 12 мл с завинчивающимися крышками. Для нанесения штрихов на чашки добавляли 1,5% агара.

РАВ (agar Propionibacterium): для целевого обогащения пропионовокислых бактерий использовали среду DSMZ 91 (10,0 г казеинового пептона, без витаминного (Carl Roth, Карлсруэ, Германия); 5,0 г дрожжевого экстракта; 10,0 г Na-лактата. (60% мас./об., ThermoScientific, Geel, Бельгия и 15,0 г агара (Carl Roth, Карлсруэ, Германия) в 1000 мл деминерализованной воды). В анаэробной банке чашки с агаром инкубировали в анаэробных условиях с использованием Anaerocult A (Merck, Дармштадт, Германия).

2.2. Образцы

Коммерческие образцы одной закусочки (Seitenbacher Natur Sauerteig, Seitenbacher Naturkost, Buchen, Германия), одного сока квашеной капусты («Sauerkrautsaft», dmBio, Карлсруэ, Германия) и одного ферментированного хлебного напитка («Original Kanne Brottrunk», Kanne Brottrunk GmbH und Co. Betriebsgesellschaft KG, Зельм-Борк, Германия) были куплены в местных супермаркетах; четыре образца сырого молока были получены из местных молочных ферм (территория Фольды ее окрестностей, Германия); и четыре пробиотика были заказаны онлайн. Содержащиеся ингредиенты ниже для отдельных продуктов; если они были реклассифицированы в ходе таксономической реорганизации в 2020 г. [27], дается новое видовое обозначение: • «Symbio Extra RedCare», Shop-Apotheke BV, Sevenum, Нидерланды

Lactobacillus acidophilus, Lacticaseibacillus paracasei, Lactococcus Lactis, Bifidobacterium Lactis; • «OMNi-BiOTiC® 10», APG Allergosan Pharma GmbH, Грац, Австрия: L. acidophilus W55, L. acidophilus W37, L. plantarum W1, B. Lactis W51, Enterococcus faecium W54, L. paracasei W20, Lacticaseibacillus rhamnosus W71, Ligilactobacillus salivarius W24, L. plantarum W62, Bifidobacterium bifidum W23;

• «BactoFlor 10/20», Dr. Wolz Zell GmbH, Гайзенхайм, Германия: B. bifidum, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum, L. acidophilus, L. paracasei, Limosilactobacillus reuteri, L. rhamnosus, L. plantarum, E. феци;

Последствия было сделано пять субкультуры, емпереноса 100 мл в 9 мл. Впоследствии было сделано пять субкультуры, емпереноса 100 мл в 9 мл мМБА после инкубации при 30 °С в течение 48–72 часов. Последняя субкультура использовалась для МБА, чтобы мМБА после инкубации при 30 °С в течение 48–72 часов. Последнюю субкультуру использовали для МБА для определения присутствия продуктов отов обаламина в микробном сообществе. Положительное определение наличия продуктов отов обаламина в микробном сообществе. Положительные образцы мМБА распределены на агаре мМБА и PAB (анализная инкубация) с

различных разведениях и инкубировали от 72 до 96 ч при 30 °С. Случайное количество колоний высевали шпательными соотвествующую средой и инкубировали в тех же условиях.

Отдельные колонии выделенных колоний переносили в ММБА и еще раз тестировали на рост индикаторного штамма. Изоленты помещали на кобаламин, культивировали в 200 мл ММБА и подвергали анализу ЖХ-МС/МС для определения уровня присутствующего кобаламина.

2.4. Подготовка проб. Для

исследования твердых (пищевых) проб и проб ионов 0,1 г пробы или содержимое одной капсулы растворяли в 9 мл физиологического раствора; Последующая подготовка была идентична для растворенных, жидких и ферментативных образцов.

Часть образца (4 мл) переносили в янтарную центрифужную пробирку и кипятили 10 мин после добавления 50 мкл 0,1% KCN (Carl Roth, Карлсруэ, Германия). Такое лечение разрушает микробные клетки; высвобождает кобаламин во внеклеточное пространство; и превращает его в наиболее стабильную форму — цианокобаламин [1]. После центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин (Megafuge 1.0R, Heraeus, Хану, Германия) 1 мл супернатанта переносили в 9 мл среды для анализа витамина B12, приоткрытой путем растворения 42,3 г/л тестируемой среды (M036, HiMedia, Индия) в жару. Если супернатант после центрифугирования был мутным, образец фильтровали через шприцевой фильтр (0,45 мкм, PES 25 мм, WICOM, Хелпенайм, Германия) перед переносом в тестируемую среду.

После автоклавирования (121 °С, 15 мин) и остывания в образцы вносили 50 мкл промывочного и разведенного индикатора.

2.5. Модифицированный микробный анализ витамина B12 (MBA)

Для модифицированного анализа витамина B12 использовали *L. delbrueckii* subsp. *Lactis* DSM 20355 использовали в качестве индикаторного штамма для определения присутствия кобаламина в образцах, смешанной культуры и последовательных выделенных культурах. Индикаторный штамм хранят при -80 °С и реактивируют (30 °С, 48–72 ч) в 9 мл бульона микробиологического, состоящего из 5,0 г пептона, 2,0 г дрожжевого экстракта, 10 г D-(-)-глюкозы, 2 г KH₂PO₄ и 0,1 г Tween 80 в 1000 мл деионизированной воды (все компоненты от Carl Roth, Карлсруэ, Германия). Перед использованием в микробиологических анализах индикаторную культуру промывали (4000 об/мин, 5 мин; Megafuge 1.0R, Heraeus, Хану, Германия) трижды физиологическим раствором (0,85% NaCl, Carl Roth, Карлсруэ, Германия) и разбавляли 10-процентным раствором склядыватъ.

Спектрофотометр (DR6000, Hach Lange, Даксельдорф, Германия) использовали для измерения роста индикатора при $\lambda = 600$ нм (OD₆₀₀) после 48 ч инкубации при 30 °С. Образцы оптимальной плотности по крайней мере, в два раза превышающей контрольное значение, считались положительными на витамин B12.

2.6. Условия роста и определение биологических и активных форм витамина B12

Для анализа ЖХ-МС/МС шесть изолентов культивировали в 200 мл ММБА (1%-об/об инокулята после культивирования на трех субкультурах в 9 мл ММБА) в колбе Эрленмейера в течение семи дней при 30 °С. *Acidipropionibacterium acidipropionici* DSM 20273 культивировали идентично эталонному штамму. Пробоподготовку проводили согласно литературе [28]. Для этого в качестве внутреннего стандарта был добавлен 15N-цианокобаламин. Стандарт был подготовлен и предоставлен Lenz et al. [28] в соответствии с режимом, описанным Wang et al. [29]. Образцы были предварительно расщеплены ацетилом из *Aspergillus oryzae* и папаином из латекса папайи (оба фермента от Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия). Очистку проводили на иммуоаффинных колонках (EASI-EXTRACT®). витамин B12; R-Biopharm, Дармштадт, Германия).

Различие между активными веществами человека и псевдовитамин было установлено авторами, описывающими метод, с использованием системы ВЭЖХ (жидкостной хроматографии сверхвысокого давления), соединенной с масс-спектрометрией с ионной ловушкой [28].

2.7. Идентификация выделенных продукционных штаммов.

Анализ изюлотов проводился с использованием MALDI-TOF MS (матричная лазерная десорбция, ионизация, времяпролетный масс-спектрометр) от DSMZ Services, Leibniz-Institut DSMZ — Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Брауншвейг, Германия (Немецкая коллекция штаммов микроорганизмов и клеточных культур).

A. orientalis был первоначально описан в 2001 г. Lisdiyanti et al. [30]. Типштамм этого вида — 21F-2T (= NRIC 0481T = IFO 16606T = JCM 11195T), выделенный из цыпков анны. Штамм производит 2-кет о-D-глюконовую кислоту из глюкозы но не 5-кет о-D-глюконовую кислоту или 2,5-дикет о-D-глюконовую кислоту, и растет при pH от 3,5 до 8,0 [30].

A. malorum был первоначально описан в 2002 г. Cleenwerck et al. [31]. Типштамм вида — LMG 1746T (= DSM 14337T), выделенный из гниющего яблока. Он производит 2-кет о-D-глюконовую кислоту из глюкозы но не 5-кет о-D-глюконовую кислоту. Оптимальный pH колеблется от pH 4,5 до 7,0 [32].

Сообщения о видах *A. orientalis* и *A. malorum* редки, и ни одно из них не связано с синтезом витамина B12. Поиск PubMed по запросу «*Acetobacter orientalis*» возвращает 20 результатов, тогда как поиск по «*Acetobacter Malorum*» возвращает 23 результата.

2.8. Тестирование роста при низком pH на яблочном соке

Определение способности к росту при низком pH проводили на яблочном соке с различными значениями pH (pH 2,85, 3,05, 3,30 (исходный pH яблочного сока), 3,55 и 3,80). Яблочный сок был выбран потому, что это региональный продукт, который также потребляется во всем мире и доступен круглый год по относительно низкой цене. Кроме того, низкий уровень pH подвигает рост бацилл и, следовательно, представляет собой сложную среду. Эти значения pH были выбраны для исследования нижних пределов способности к росту и потенциала образования продуктов, поскольку ожидалось, что это позволит дифференцировать уксуснокислые бактерии от LAB и PAB. Яблочный сок покупали в местном супермаркете («Рио д'Оро», Aldi Süd, Фульда, Германия) и pH регулировали с помощью уксусной кислоты или гидроксида натрия (Carl Roth, Карлсруэ, Германия). Перед автоклавированием (121 °C, 15 мин) 30 мл приоткрытого яблочного сока разливали в лабораторные стеклянные флаконы емкостью 100 мл.

Инокулированные образцы были взяты в трех экземплярах, а холостые образцы — в двух экземплярах.

Перед инокуляцией культуры реактивировали после хранения (-80 °C, глицерин) в яблочном соке с добавлением 5 г/л дрожжевого экстракта и доводили pH до 5,6 (72 часа, 30 °C).

Реактивированные культуры доращивали с 0,1 л на 9,9 мл дистиллированного яблочного сока (pH 3,30, 72 часа, 30 °C) перед переносом 300 мкл (1% по объему) в 30 мл ферментационной среды. Были проведены субкультуры яблочного сока, чтобы обеспечить адаптацию к низкому значению pH яблочного сока. Культуры инкубировали в течение 7 дней при температуре 30 °C на линейной встряхивающейся водяной бане (1083, GFL, Бургвельд, Германия). После инкубации определяли оптическую плотность OD600 (DR6000, Hach Lange, Дюссельдорф, Германия), pH (InLab Flex-Micro и SevenExcellence, Mettler Toledo, Гиссен, Германия) и конечную концентрацию витамина B12 (MBA).

2.9. Процедура количественного определения с помощью юмикробного анализа витамина B12 (MBA)

Для количественного определения использовали микробиологическую среду для анализа B12 от Millipore (B3801, Дармштадт, Германия). Было использовано руководство по производству с некоторыми изменениями.

Всего 20 мл пробы 50 мкл KCN (1%) смешивали с 50 мл буферного раствора разложения (1,29 г динатригидрофосфата, 1,1 г лимонной кислоты и 1,0 г метабисульфата натрия в 100 мл дистиллированной воды) перед автоклавированием (121 °C, 15 мин). После охлаждения pH доводили до 6,0 и объем дополняли водой до 100 мл. Всего 1 мл центрифугированной (4000 об/мин, 10 мин) пробы переносили в 5 мл аналитической среды и доводили до 10 мл водой. Калибровочные конечные концентрации витамина B12 (Carl Roth, Карлсруэ, Германия) были устанавлены на уровне 25, 50, 75, 100, 125, 150 и 175 пг/мл.

Перед промывкой, разведением и инокуляцией инкубировали 1 мл индикаторной культуры в 9 мл тестуемой среды в течение 48 ч для истощения культуры обаламина.

Определение проводили в трех повторах для образцов и стандартных. Оптический плотность (OD600) образцов измеряли по воде. Концентрация образцов определяли с использованием полулогарифмического графика зависимости оптической плотности от стандартной концентрации.

3.

Результаты 3.1. Выделение производителей

Кобаламина Семь из шестнадцати образцов продукта дали положительный ответ на первый проведенный MBA (таблица 1), включая все образцы молока ($n = 4$), хлебного напитка, один пробиотик, один образец домашней ферментированной закваски, а также положительный контроль. При проверке микробного сообщества этих образцов только образец закваски дал положительный результат на кобаламин. Для большинства категорий продуктов исключение не оторых образцов на стадии микробного сообщества не стало сюрпризом.

Таблица 1. Сводная информация о положительных и отрицательных образцах, проверенных MBA на разных этапах изоляции.

Пок азат ель Рост	К олич еств о продук т ов	Мик робное сообще ст во	Изоля т ы
Отриц ате ль ный	9	6	15
Позит ив ный	7	1 (закваска)	
	Л. реут ери DSM 20016	Л. реут ери DSM 20016	6 Л. реут ери, DSM 20016

Витамин В12 в молоке синтезируется микробиотой рубца коровы и накапливается в тканях [1]. До сих пор ведутся споры о том, является ли молочная железа стерильным органом, выявили микроорганизмы с молоком и концентрацией при отборе пробиотиков существует ли молочный микробиом [33]. Однако доказано, что состав микробиома рубца более разнообразен и существенно отличается от микробиома молока [34]. Ожидалось определение кобаламина в молоке, но выявление отвестенных производителей не предполагалось. В один пробиотик («Darmflora plus select»), который дал положительный результат на кобаламин, добавлено 2,5 мг витамина В12 на капсулу. Положительный результат микробного сообщества изомолочного напитка был ожидаемым, поскольку у бутылке указано содержание витамина В12 1,36 мг/л. Витамин вырабатывается закваской, которая не деактивируется в конечном продукте. Однако микроорганизмы отвестенных за образование витамина В12 в хлебном напитке, не смогли проявить себя на второй фазе в такой степени, что было бы возможно измерить уровень витамина В12.

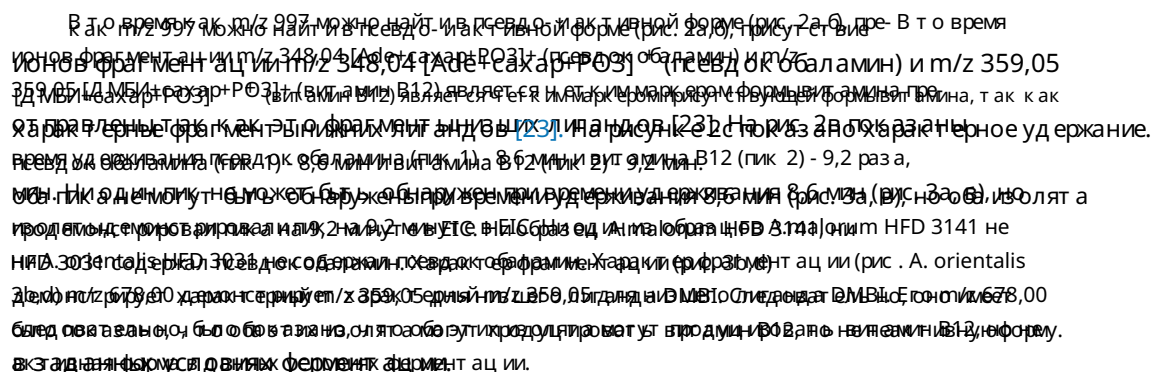
Поскольку только микробное сообщество одной закваски было положительным на витамин, на чашках с агаром были выделены только колонии этих образцов. Шесть из двадцати одной случайно собранной колонии были положительными в ходе анализа MBA и, следовательно, были идентифицированы DSMZ после определения присутствующей формы витамина В12.

3.2. Идентификация изолированных

штаммов. Анализ шести изолятов, отобранных в DSMZ, показал, что пять изолятов очень похожи и могут быть отнесены к виду *Acetobacter Malorum*. Напротив, шестой изолят идентифицирован как *Acetobacter orientalis* HFD 3031. Соответственно, предполагается, что изоляты *Acetobacter Malorum* представляют собой один штамм, который был выделен несколько раз. Поэтому в дальнейшем будет рассмотрено только один штамм, *A. malorum* HFD 3141.

3.3. XX-MS/MS. Проверка образования витамина В12. XX-MS/

MS использовали для определения присутствующего витамина В12. Характерный фрагментация витамина В12 можно четко отличить от такого псевдовитамина при масс-спектрометрии (рис. 2).



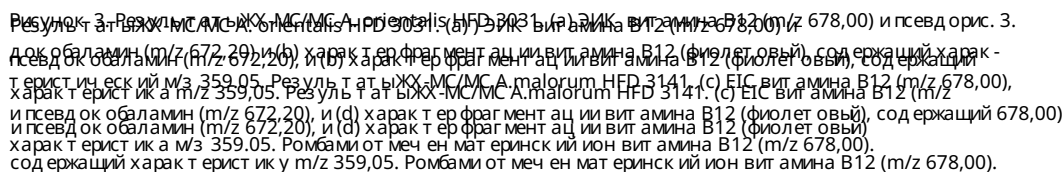
[illegible]

Таблица 2. Влияние количества повторных измерений на достоверность определения параметров смеси асфальта

[illegible][illegible]

из олирует. При pH 3,80 *A. orientalis* производит 18,89 мкг/л вит амина B12, а *A. malorum* — 7,97 мкг/л. Можно предположить дальнейшее усиление роста и синтеза вит амина B12 при более высоких исходных значениях pH, поскольку у оптимальный pH *Acetobacter* sp. составляет 5,0–6,5 [35]. Снижение pH при ферментации происходит за счет вероятного образования глуконовой кислоты из глюкозы [30,31]. Несмотря на неблагоприятные условия роста в яблочном соке (низкий pH и бедный аминокислотный состав), оба штамма смогли расти даже при исходном pH и продуцировать значительные количества вит амина.

4. Дискуссия

Пок азано, что для выделения кобаламинообразователей из сложных продуктов ферментации целесообразно использовать среду, не содержащую вит амина B12. Хотя экспериментально обогащению и выделению были нацелены на PAB и LAB, были выделены два новых сильных действующих штамма вит амина B12, принадлежащих AAB. Эти штаммы были идентифицированы с помощью MALDI-TOF MS как *A. malorum* и *A. orientalis*. Однако идентификация AAB особенно сложна из-за высокой степени сходства между последовательностями гена 16S rRNA близкородственных видов.

Виме и др. (2014) не смогли отличить *A. malorum* LMG 1746 от штаммов *Acetobacter cerevisiae* с помощью MALDI-TOF MS-анализа [36]. Даже сравнения 16S rRNA *A. malorum* и *A. cerevisiae* недостаточно для четкой идентификации этих видов. Следователь но, в литературе для идентификации AAB рекомендуются другие методы, такие как использование внутреннего ранскрибируемого спейсера (ITS) между генами 16S и 23S rRNA. Этот метод позволяет различать эти близкородственные виды [37]. Следователь но, возможно, что существующие изолаты идентифицированные методами, более адаптированными для AAB, должны быть переклассифицированы. Если необходимо провести дополнительные испытания, программа испытаний должна включать источники пищевых продуктов, ферментированных уксусной кислотой, и среду для ферментации, специально разработанную для AAB, например, специальноную среду с pH 3,5 [38]. Хотя выделение и идентификация через среду, не содержащую вит амина B12, являются живыми неспособными, последующий анализ для определения присутствующей формы кобаламина необходим, чтобы исключить псевдокобаламина.

Причина, по которой до нашей публикации были идентифицированы только два других AAB [7,8], заключается в том, что перед скринингом прошедшие скрининг изолаты предварительно отбираются по их роду или даже виду. Этот предварительный отбор включает использование легко идентифицируемых генотипических штаммов (PAB и LAB) [6,20], окрасивание по Граму [9,20,22], морфологический внешний вид под микроскопом [9,22], активность каталазы [9,22]. [20,22], а также обнаружение образования молочной кислоты этанола [9]. PAB являются грамположительными, неподвижными, от анаэробных до аэротолерантными [39] и каталазоположительными. LAB являются грамположительными, факультативными анаэробами и каталазоотрицательными [40]. Поскольку AAB являются грамотрицательными, каталазоположительными, облигатными аэробами и продуцируют уксусную кислоту в результате утилизации этанола [41], их предварительно отфильтровывают. Представляющий скрининг легко идентифицируемых штаммов AAB или целенаправленное выделение из пищевых матриц с помощью упомянутых выше стратегий (например, свобод вит амина B12 и гены *cbiK* или *bluB/cobT2* в качестве маркеров), вероятно, приведут к выявлению большего количества производителей кобаламина в группе AAB. Скрининг специфических генов, участвующих в синтезе вит аминов, в идеале должен учитывать вариации последовательностей гомологов. Было показано, что вариации последовательностей *cobU/T*-подобных гомологов от ветственных селективных различных низших лигандов, включенных в кобамид [42–44]. Хотя широко распространено предположение ДМБИ, в кобамид могут быть включены другие низшие лиганды в зависимости от присутствующего гомолога и условий окружающей среды [43]. Следователь но, если ДМБИ не обеспечивает ферментацию ионной средой или продукцией ионными штаммами, могут образовываться кобамиды не выполняющие функцию вит амина B12 у человека. Поэтому скрининг и идентификация, основанные на присутствии специфических ферментов синтеза вит амина B12, должны включать знание синтеза ДМБИ и селективности иго.

Биобогащение пищевых продуктов *Acetobacter* sp. отк рывает высокий потенциал для триационных пищевых ферментации. Поскольку метаболитические способности менее ограничены чем у LAB, они могут расти в менее богатых питательными веществами средах, обладая высокой аэротолерантностью и низкими значениями pH, а псевдокобаламин не был обнаружен в наших образцах. Эти характеристики позволяют *A. orientalis* HFD 3031 и *A. malorum* HFD 3141 обогащать вит амином B12 ферментацией.

не подходит для других производителей. В этой работе была успешно продемонстрирована их способность расти и производить витамин B12 в яблочном соке. Концентрация 1,9 мг/л, достаточная для медико-фармацевтических целей, была превышена *A. orientalis* HFD 3031 (3,19 мг/л) при исходном значении pH яблочного сока и *A. Malorum* HFD 3141 при pH 3,55 с 3,81 мг/л. Однако рост и конечная концентрация были отнесены к небольшим, и необходимо изучить меры по увеличению концентрации. В экспериментах по обогащению *L. reuteri* витамином B12 в фуру (ферментированном тофу) [25,45] и соевом молоке [25] были достигнуты концентрации 141,7 мг/кг в сырой массе и 132,2 мг/л соответственно. Во время ферментации изредкой оксидной водной помощи *L. plantarum* DW12 может быть достигнута концентрация витамина B12 14 мг/мл [46]. При совместном культивировании *P. freudenreichii* и *Bifidobacterium Animalis* subsp. *Lactis* содержание витамина B12 в соевом сыворотке достигало 8,93 мг/л, тогда как при однокультурной ферментации *P. freudenreichii* обнаружено 5,72 мг/л [47]. Ферментация соевых культур пшеницы отрубей с помощью *P. freudenreichii* привела к образованию 55 мг/л витамина B12 посредством совместной ферментации с молочнокислыми бактериями и дрожжами [48].

В большинстве случаев концентрации витаминов, оторванных от остальной части, аналогичны тем, оторванным от азаны в литературе при обогащении продуктов питания, хотя в некоторых случаях обнаруживаются значительные более высокие уровни. Но эксперименты проведенные по оценке толерантности и изотопов к pH в низком диапазоне, показывают, что максимальный потенциал синтеза витамина B12 еще не достигнут. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить влияние различных параметров ферментации, таких как более высокие значения pH, различные типы культурных сред, температуры ферментации и скорости аэрации, на синтез. Исследования того, как влияет ли добавление предшественников (ДМБИ, рибофлавин, никотинамид и т. д.) такой же стимулирующий эффект, как и ПАВ [49], так же позволят глубже понять особенности синтеза шламмов.

Обогащение растительных продуктов путем ферментации может обеспечить соответствующие концентрации в веганских и вегетарианских диетах. Использование шламмов, неспособных продуцировать аналоги, обеспечивает надежный источник физиологически активной формы. Перспективным является включение *A. malorum* HFD 3141 и *A. orientalis* HFD 3031 в ферментационные закваски, оторванные в природе содержат ААБ. Примерами применения выделенных шламмов могут быть скоби (чайный гриб), кефирные зерна (кефир и водный кефир), уксусная матка (уксус) [50] и закваска [51]. Поскольку ААБ уже являются частью их процентного содержания ферментации, характеристики продукта не должны радикально меняться. Кроме того, эти перечисленные продукты ферментации ААБ, должны быть проверены на содержание витамина B12, поскольку имеющиеся данные в этой области считаются недостаточными.

Это исследование демонстрирует необходимость расширения поиска потенциальных шламмов для биобогащения пищевых продуктов витамином B12. Предыдущие авторы сосредоточились на проверке способности LAB и PAB к образованию обаламина. Наши результаты а также результаты Bernhard et al. [7] и Кеттидр [7,8] позволяют предположить, что обнаружение большего количества производителей витамина B12 в группе ААБ вполне вероятно. Выделение большего количества ААБ даст более широкий спектр производственных характеристик, таких как различные типы культурных сред, урожайность, устойчивость к pH, использование сахара и толерантность к питанию.

Вклад авторов: Концептуализация, LS; методология, LS; валидация, LS; формальный анализ, LS; исследование, ЛС; ресурсы LS; курирование данных, LS; письмо – подготовка первоначального черновика, LS; написание – обзор и редактирование, LS, SS и AC; визуализация, ЛС; надзор, СС и AC; администрирование проекта, СС, AC и LS; приобретение финансирования, н/д. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Данное исследование не получило внешнего финансирования.

Заявление Института национальной наблюдательного совета: Неприменимо.

Заявление об доступности данных: Оригинальные материалы представлены в исследовании, включены в статью дальнейшие запросы можно направить соответствующему автору/ам.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Рек омендац ии

1. Ват анаб, Ф.; Бит о, Т. Ист оч ник и вит амина В12 и мик робное взаимодейст вие. Эк сп. Биол. Мед. 2018, 243, 148–158. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

2. Валь дманн А.; К ошц к е, JW; Лейц манн, К. ; Хан, А. Диет ич еск ое пит ание и фак т орыобраз а жив ни веганск ого населения в Германии: Резуль т ат ынемец к ого веганск ого исслед ования. Евро. Дж. К лин. Нут р. 2003, 57, 947–955. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

3. К омиссия по нераз г лашениюEFSA. Науч ное мнение о диет ич еск их нормах к обаламина (вит амина В12). EFSA J. 2015, 13, 4150. [\[CrossRef\]](#)

4. Гомес Соареш М.; Бевилак ва, Грец ия; Марк онд ес Т асси, ЁМ; Реолон Шмид т, VС Фермент ированные продук т ыи напит к и: пот енц иал биофорт ифик ац ии вит амина В12 in situ — обз ор лит ерат уры Межд. Дж. Пищевая наук а. Нут р. 2023, 74, 655–667. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

5. Фанг, Х.; К анг, Дж.; Чжан Д. Мик робное производ ст во вит амина В12: обз ори перспек т ивына будущее. Мик роб. К лет оч ный фак т . 2017, 16, 15. [\[CrossRef\]](#)

6. Хугеншмид т, С.; Швенninger, С.М.; Гнем, Н.; Лак руа, К . Ск рининг ест ест венного биораз нообраз ия молоч нок ислык и пропионовык к ислот ных бак т ерий на выработ ку фолат а и вит амина В12 в пермеат е сыворот к и с д обавк ами. Межд. Молоч ный журнал. 2010, 20, 852–857. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

7. Бернхардт, К. ; Чжу, Х.; Шюц, Д. ; Фишер, М.; Биспинг, Б. К обаламин производ ит ся Acetobacter Pasteurianus DSM 3509. Appl. Микробиол. Биот ехнология. 2019, 103, 3875–3885. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#) [\[PubMed\]](#)

8. К ат о, К. ; Хаяши, М.; К амик убо, Т. Выделение к офермента 5,6-димет илбенз имидаз олилк обамид а в кач ест ве к офак т ора глут ама т а Образование из Acetobacter suboxydans. Биохим. Биофиз. Acta 1968, 165, 233–237. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#) [\[PubMed\]](#)

9. Масуда, М.; Иде, М.; Уц уми, Х.; Нииро, Т. ; Шимакура, Ю Мурат а, М. Эффек т ивнос т ь производ ст ва фолат а, вит амина В12 и т иамина молоч нок ислыми бак т ериями, выделенными из японск их солений. Биология. Биот ехнология. Биохим. 2012, 76, 2061–2067. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

10. Де Анджелис, М.; Бот т ач ини, Ф.; Фоссо, Б.; К елехер, П.; К алассо, М.; ДиК ань о, Р.; Вент ура, М.; Пик арди, Э.; ван Синдерен, Д.; Гоббет т и, М. Lactobacillus rossiae, продуц ент вит амина В12, пред ст авляет собой мет аболич еск и универсаль ный вид рода Lactobacillus. PLoS ONE 2014, 9, e107232. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#) [\[PubMed\]](#)

11. Ранаи, В.; Пилевар, З.; Ханега, АМ; Хоссейни, Х. Пропионовая к ислот а: способпроиз вод ст ва, современное сост ояние и перспек т ивы Пищевая Т ехнол. Биот ехнология. 2020, 58, 115–127. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

12. Фалент ин, Х.; Дойч, С.-М.; Ян, Г.; Лу, В.; Т ь ерри, А.; Парайр, С.; Майяр, М.-Б.; Дербек ур, Ж.; К узен, Ф.Дж.; Жарден, Дж.; и другие. Полный геном Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA1, уст ойч ивой акт инобак т ерии, использ уемой в пищевык продук т ах и пробиот иках. PLoS ONE 2010, 5, e11748. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

13. Пивоварек, К. ; Липинская, Е.; Хац -Шиманч ук, Э.; К от, АМ; К елишек, М.; Бонин, С. Исполъ зование шг аμμα Propionibacterium freudenreichii T82 для эффек т ивног о биосинт еза пропионовой к ислот ыи т регализов сред ес эк т ракт ом яблоч нык выжимок ист оч ными водами к арт офеля. Молекулы2021, 26, 3965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Ребергер, Дж.Л.; Глат ц, Б.А. Реак ц ия куль т урпропионибак т ерий на к ислот у и низк ий уровень рН: т олерант ност ь и ингибирование. J. Пищевая защит а. 1998, 61, 211–216. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

15. Т ь ерри, А.; Дойч, С.-М.; Фалент ин, Х.; Далласо, М.; К узен, Ф.Дж.; Ян, Г. Новые взгля дына физиолог ии мет аболиз м Propionibacterium freudenreichii. Межд. J. Пищевая микробиол. 2011, 149, 19–27. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

16. Теусинк, Б.; Моленар, Д. Сист емная биология молоч нок ислык бак т ерий: для ед ыи раз мышлений. К урс. Мнение. Сист. Биол. 2017, 6, 7–13. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

17. К ениг, Х.; Берг ель манн-Лё нерт ц, Б. Поддержание мик роорганиз мов, связаннх с вином. Биология мик роорганиз мов на виноград е, в сусле и вине; К ениг Х., Унден Г., Фрелих Дж., ред.; Springer: Берлин/Гейдель берг, Германия, 2009 г.; ст р. 451–468, ISBN 9783540854623.

18. Банерджи, Р.; Рэгсдейл, Юо-Запад. Многолик ост ь вит амина В12: к ат ализ к обаламин-з ависимыми фермент ами. Анну. Препод обный Биохим. 2003, 72, 209–247. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#) [\[PubMed\]](#)

19. Шелтон, А.Н.; Сет, ЕС; Мок, К Ц; Хан, АW; Джек сон, С.Н.; Хафт, Д.Р.; Тага, МЭ. Неравномерное распределение и з ависимост ь биосинт еза к обамид а у бак т ерий, предс казанные с помощь ю сравнит ельной геномик и. ISME J. 2019, 13, 789–804. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#) [\[PubMed\]](#)

20. Бхушан, Б.; Т омар, СК; Мандал, С. Фенот ипич еск ий и генот ипич еск ий ск рининг лак т обацилл ч еловеч еск ого происхождения на пред мет пот енц иала производ ст ва вит амина В12 : проверк а проц есса с помощь юмик роанализ а и UFLC. Прил. Микробиол. Биот ехнология. 2016, 100, 6791–6803. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

21. Окада, Н.; Чет т аначит ара, К. ; Даенг субха, В. Ск рининг бак т ерий, продуц ирующих вит амин В12, из Т уа-Нао в Таиланд е. Япония. Межд. Рез. Ц ент. Сель ск ое хозяйст во. наук. 1995, 2, 49–57.

22. Рибейро, М.; Масиель, К. ; К руз, П.; Д армансь е, Х.; Ногейра, Т. ; К ост а, М.; Ларанжейра, Дж.; Мораис, RMSC; Т ейшейра, П. Исполъ зование пот енц иаль нык пробиот ич еск их молоч нок ислык бак т ерий, выделенных из фот обioreак т оров Chlorella vulgaris, в кач ест ве многообещающих производ ителей вит амина В12. Foods 2023, 12, 3277. [\[CrossRef\]](#)

23. Дудк о Д.; Милк ер, С.; Холт манн, Д. ; Бухгаупт, М. Идент ифик ац ия бак т ерий, продуц ирующих вит амин В12, на основе присут ст вия Гомологи bluB/cobT2. Биот ехнология. Лет т. 2023, 45, 563–572. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

24. Делт ула, П.; К илили, П.; Чамлагайн, Б.; Холм, Л.; К ост иайнен, Р.; Пийронен, В.; Савийок и, К. ; Варманен, П. Акт ивнос т ь фермента слияния BluB/CobT2 раскр ывает механиз мь от вет ст венные за выработ ку акт ивной формывит амина В12 Propionibacterium freudenreichii. Микроб. К лет оч ный фак т . 2015, 14, 186. [\[CrossRef\]](#)

25. К умари, М.; Бхушан, Б.; К ок к илигадда, А.; К умар В.; Бехаре, П.; Т омар, С.К. Биообогащение соевог о молока вит амином В12 посред ст вом оп т имиз ированной фермент ац ии с помощь ю втек лет оч нык изолят ов лак т обацилл ч еловеч еск ого фек аль ног о происхождения, продуц ирующих В12. К урс. Рез. Пищевая наук а. 2021, 4, 646–654. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Ро, Э.; Термес, К.; Хиткот, П.; Рамбах, А.; Уоррен, М.Дж. Роль *Salmonella typhimurium* cbiK в кобаламине (витамин B12) и биосинтезе сиротемы Дж. Бактериол. 1997, 179, 3202–3212. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

27. Чжан Дж.; Виттук, С.; Салветти, Э.; Франц, СМАР; Харрис, ИСБ; Маттарелли, П.; Отул, РВ; Пот, Б.; Вандам, П.; Уолтерс, Дж.; и другие. Таксономическая заметка о роде *Lactobacillus*: описание 23 новых родов, исправленное описание рода *Lactobacillus* Beijerinck 1901 и Союзов *Lactobacillaceae* и *Leuconostocaceae*. Межд. Дж. Сист. Эвол. Микробиол. 2020, 70, 2782–2858. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

28. Ленц Т.; Максонес, А.; Пичнер, Р.; Бирринджер, М. Определение витамина B12 в коммерческих препаратах пепсина с использованием иммуноаффинной хроматографии и ЖХ-МС/МС. Прил. Рез. 2023, 2, e202200112. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

29. Ван, М.; Асам, С.; Чен, Дж.; Эрманн, М.; Рынлик М. Получение четырех меченных ¹⁵N кобаламинов путем биосинтеза с использованием пропионибактерии *freudenreichii*. Передний. Микробиол. 2021, 12, 713321. [\[CrossRef\]](#)

30. Лисдиант, П.; Кавасаки, Х.; Секи, Т.; Ямада, Ю. Учимура, Т.; Комагата, К. Идентификация штаммов *Acetobacter*, выделенных из индонезийских источников, и предложения *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov. и *Acetobacter orientalis* sp. ноябрь J. Gen. Appl. Микробиол. 2001, 47, 119–131. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

31. Кливер, И.; Вандемюлебр, К.; Янссенс, Д.; Свингс, Дж. Повторное исследование рода *Acetobacter* с описанием *Acetobacter cerevisiae* sp. ноябрь и *Acetobacter Malorum* sp. ноябрь Межд. Дж. Сист. Эвол. Микробиол. 2002, 52, 1551–1558. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

32. Эс-Сбат, А.; Лахлифи, Т.; Ятим, М.; Эль-Абид, Х.; Белхадж, А.; Хафиди, М.; Зухайр, Р. Скрининг и молекулярная характеристика новых термостойких аэроаналитических штаммов *Acetobacter Malorum*, выделенных из двух биомов марокканских плодов кактуса. Биотехнология. Прил. Биохим. 2021, 68, 476–485. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Райнард, П. Микробиотамолочной железой молочных жвачных животных: факт или вымысел? Ветеринар. Рез. 2017, 48, 25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Уильямсон-младший; Каллауэй, ТР; Лоренко, ЖМ; Райман В.Е. Характеристика микробиоты рубца, кала и молока при лактации Молочные орошения Передний. Микробиол. 2022, 13, 984119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

35. Гомес, Р.Дж.; Борхес, МдФ; Роза, МдФ; Кастро-Гомес, RJN; Спиноза, В.А. Укусноиспользование бактерий в пищевой промышленности: систематический обзор, характеристика и применение. Пищевая Технол. Биотехнология. 2018, 56, 139–151. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

36. Виме, А.Д.; Спиталс, Ф.; Аэртс, М.; де Бройне, К.; ван Ландшут, А.; Вандам, П. Влияние питательной среды на время пролета масс-спектров с помощью компьютерной десорбции-ионизации: пример укусноиспользования бактерий. Прил. Оксужающая среда. Микробиол. 2014, 80, 1528–1538. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

37. Валера, МФЛайх, Ф.; Гонсалес, СС; Тория, М; Матео, Э.; Мас, А. Разнообразие укусноиспользования бактерий, присутствующих в здоровом винограде с Конарских островов. Межд. J. Пищевая микробиол. 2011, 151, 105–112. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

38. Ямада, Ю. Хосоно, Р.; Лисдиант, П.; Видьяут, Ю. Саоно, С.; Учимура, Т.; Комагата, К. Идентификация укусноиспользования бактерий, выделенных из индонезийских источников, особенно из олят, отнесенных к роду *Glucobacter*. J. Gen. Appl. Микробиол. 1999, 45, 23–28. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

39. Гонсалес-Гарсия, Р.; МакКаббин, Т.; Навоне, Л.; Стюартс, К.; Нильсен, Л.; Марселлин, Э. Производство пропионовой кислоты микробиомом. Брожение 2017, 3, 21. [\[CrossRef\]](#)

40. Амелия Р.; Филип, К.; Пратама, ЮЕ.; Пурвати, Э. Характеристика и пробиотический потенциал молочнокислых бактерий, выделенных из Дади, отобранных на Западной Суматре. Пищевая наука. Технол. 2021, 41, 746–752. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

41. Малимас, Т.; Тиан Ву, Х.; Мурамац, Ю. Юфан, П.; Анасуват, С.; Ямада, Ю. Систематический обзор укусноиспользования бактерий; Сенгун, И. Ю. Ред.; Серия: Серия по пищевой биологии | Книга научного издания: CRC Press: Бокс-Ратон, Флорида, США, 2017 г.; стр. 3–43, ISBN 9781315153490.

42. Крофтс, Т.С.; Сет, ЕС; Хазра, АБ; Тага, Мн. Структура кобаламина зависит как от наличия низшего лиганда, так и от CoBT. Специфичность субстрата. хим. Биол. 2013, 20, 1265–1274. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

43. Хазра, А.Б.; Тран, JLA; Крофтс, Т.С.; Тага, М.Э. Анализ субстратной специфичности гомологов CoBT показывает широкий распространенный предпочтение DMB, нижнего аксиального лиганда витамина B12. хим. Биол. 2013, 20, 1275–1285. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

44. Соколовская ОМ; Мок, КЦ; Парк, Джей Ди; Тран, JLA; Ванстром, Калифорния; Тага, М.Э. Селективность контакта в метилмалонил-коэнзим А-мутазе, модельном кобаламиназависимом ферменте. mBio 2019, 10, e01303-19. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Бао, Х.; Сян, С.; Чен, Дж.; Ши, Ю. Чен, Ю. Ван, Х.; Чжу, Х. Влияние *Lactobacillus reuteri* на содержание витамина B12 и микробиоты. Состав ферментации Фуру. ЛВТ 2019, 100, 138–143. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

46. Кантатот, Д.; Ратанабури, А.; Хайисама-э, В.; Сухом, А.; Нункью Т. Использование потенциального пробиотика *Lactobacillus plantarum* DW12 для производства нового функционального напитка из зерелой кокосовой воды Дж. Функци. Продукты питания 2017, 32, 401–408. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

47. Тинджау, Р.; Чуа, Ж-Ю. Лю-К. Совместное культивирование *Propionibacterium freudenreichii* и *Bifidobacterium Animalis* subsp. *Lactis* улучшает содержание орошечных жирных кислот и витамина B12 в соевой сыворотке. Пищевая микробиол. 2024, 121, 104525. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

48. Чамлагин, Б.; Эдельманн, М.; Катина, К.; Варманен, П.; Пирионен, В. Производство витамина B12 в экстракте соевых бобов с иммобилизованным белком Биотрансформации пшеницы отрубей *Propionibacterium freudenreichii*. LWT 2024, 192, 115731. [\[CrossRef\]](#)

49. Чамлагин, Б.; Деппула, П.; Эдельманн, М.; Крилуот, С.; Гратепанч, Ф.; Лапуа, К.; Варманен, П.; Пирионен, В. Влияние предшествующих низших лигандов на выработку витамина B12 пищевыми пропионибактериями. ЛВТ 2016, 72, 117–124. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

50. Яссунак а Хат а, Н.Н.; Сурек , М.; Сарт ори, Д.; Вассолер Серрат о, Р.; Aparecida Spinosa, W. Роль ук суснок ислъх бак т ерий в продук т ах пит ания и Напит к и. Пищевая Т ехнол. Биот ехнология. 2023, 61, 85–103. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

51. Лэнд ис, Э.А.; Оливер ио, АМ; Мак к енни, Э.А.; Ник олс, LM; К фури, Н.; Бъ янго-Дэниелс, М.; Шелл, ЛК ; Мэд ден, А.А.; Шапиро, Л.; Сак унала, С.; и друг ие. Раз нообразие и функ ц ии мик робиомов з ак васк и. Элайф 2021, 10, е61644. [\[Перек рест ная ссылк а\]](#)

От к аз от от вет ст венност и/Примеч ание из дат еля: Заявления, мнения и даннь е, содержащи еся во всех публик ац иях, принадлежат иск люч ит ель но от дель ному авт ору(ам) и соавт орам(ам), а не MDPI и/или редак т ору(ам). MDPI и/или редак т ор(ь) не несут от вет ст венност и за л юбой вред л юдям или имущест ву, возник ший в резуль т ат е л юбъ х ид ей, мет од ов, инст рук ц ий или продук т ов, упомянут ьх в конт ент е.