



Article

Obtention de nouvelles souches de production de vitamine B12 , Acetobacter malorum HFD 3141 et Acetobacter orientalis HFD 3031 à partir de

Levain fermenté maison

Lisa Stumpf ^{1,*}, Stefan Schildbach ¹ et Aidan Coffey ²

¹ Département de technologie alimentaire, Université des sciences appliquées de Fulda, 36037 Fulda, Allemagne ; stefan.schildbach@lt.hs-fulda.de

² Département des sciences biologiques, Université technologique de Munster, T12 P928 Cork, Irlande ; aidan.coffey@mtu.ie *

Correspondance : lisa.stumpf@lt.hs-fulda.de

Résumé : La vitamine B12 est un nutriment essentiel dans les modes de vie végétaliens et végétariens, car les sources de vitamines d'origine végétale sont rares. Les aliments fermentés traditionnels pourraient être enrichis en ajoutant des bactéries productrices de vitamine B12 pour offrir des sources de vitamines non animales. L'objectif était d'isoler un producteur de vitamine B12 capable de produire la vitamine active pour l'homme même à de faibles valeurs de pH afin qu'elle puisse être utilisée dans l'enrichissement des jus de fruits. Par conséquent, les aliments fermentés (artisanaux et industriels) et les probiotiques ont été criblés pour détecter les souches productrices de vitamine B12. Un test microbiologique modifié de la vitamine B12 basé sur *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355 a été utilisé pour identifier des échantillons contenant de la vitamine B12 et la présence de souches productrices de vitamine B12. Le dépistage a permis d'isoler plusieurs souches positives pour la formation de vitamine B12 dérivée du levain. La spectrométrie de masse a confirmé la biosynthèse uniquement de la forme physiologiquement active humaine. L'identification des espèces effectuée par la Collection allemande de souches de micro-organismes et de cultures cellulaires a donné naissance à deux espèces : *Acetobacter orientalis* et *Acetobacter malorum*, dont deux isolats ont été caractérisés plus en détail. Le potentiel de biosynthèse de la cobalamine dans les matrices alimentaires a été démontré pour *A. malorum* HFD 3141 et *A. orientalis* HFD 3031 dans le jus de pomme à différentes valeurs de pH (2,85 à 3,80). Les isolats ont synthétisé jusqu'à 18,89 µg/L et 7,97 µg/L de vitamine B12 à pH 3,80. Les résultats de cette étude suggèrent que les bactéries acétiques (AAB) et les aliments fermentés à base d'acide acétique constituent des ressources prometteuses pour la vitamine B12 et ses producteurs, qui auraient pu être négligées dans le passé.

Mots clés : cobalamine ; la pseudocobalamine; Acétobactérie ; bactéries d'acide acétique; biofortification des aliments ; faim cachée



Référence : Stumpf, L. ; Schildbach, S. ; Coffey, A. Obtention d'une nouvelle vitamine Souches de production B12 *Acetobacter malorum* HFD 3141 et *Acetobacter orientalis* HFD 3031 de Accueil-
Levain fermenté. Appl. Microbiol. 2024, 4, 986-999.
<https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030067>

Rédactrice académique : Sabina Fijan

Reçu : 21 mai 2024

Révisé : 8 juin 2024

Accepté : 14 juin 2024

Publié : 23 juin 2024



Copyright : © 2024 par les auteurs.
Licencié MDPI, Bâle, Suisse.
Cet article est un article en libre accès distribué selon les termes et conditions des Creative Commons Licence d'attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Même si la cobalamine (vitamine B12) est exclusivement produite par certaines bactéries et archées, les aliments d'origine animale (viande, œufs et lait) représentent la principale source de cobalamine dans l'alimentation humaine [1]. En les omettant, il peut être difficile d'atteindre les niveaux d'apport quotidien recommandés. L'étude allemande sur les végétaliens (GVS) a révélé une lacune significative dans l'absorption de la vitamine B12 dans la communauté végétalienne et végétarienne [2]. Le GVS a constaté que les hommes végétaliens consomment seulement $0,84 \pm 1,21$ µg/jour et que les femmes végétaliennes consomment $0,78 \pm 2,14$ µg/jour de cobalamine, ce qui est inférieur à l'apport quotidien recommandé par l'EFSA de 4,0 µg [3]. Ainsi, l'apport de nutriments essentiels via des aliments fermentés à base de plantes représente une approche prometteuse et rentable pour remédier à cette disparité nutritionnelle [4].

Toutes les bactéries ne sont pas capables de produire de la vitamine B12, il est donc nécessaire d'isoler et d'identifier les souches capables. Les producteurs de vitamine B12 identifiés dans la littérature appartiennent aux genres *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobac-*

ter, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Xanthomonas* [5], *Propionibacterium* (par exemple, [5,6]), *Acetobacter* [7,8] *Gluconobacter* [8] et *Lactobacillus* (par exemple, [9,10]). Alors que les dénitrifiants *Pseudomonas* et *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* sont utilisées pour des productions industrielles à grande échelle, la recherche sur la biofortification alimentaire se concentre sur les bactéries lactiques (LAB) et les bactéries propioniques (PAB) [11], principalement *Propionibacterium freudenreichii* [4]. LAB et *P. freudenreichii* possèdent le statut GRAS (« généralement reconnu comme sûr ») selon la Food and Drug Administration, leur application est donc compréhensible. Les souches de *P. freudenreichii* sont prototrophes pour tous les acides aminés et nucléotides [12], ce qui signifie que les besoins en milieux de fermentation sont relativement faibles. La valeur de pH préférée du PAB se situe entre 6 et 7 [13], et la tolérance va jusqu'à pH 5,0 [14]. Comme son nom l'indique, il produit le propionate piquant, caractéristique de certains types de fromages [15], mais qui n'est peut-être pas souhaité dans les aliments biofortifiés. LAB produit l'acide lactique le moins piquant comme produit final métabolique majeur ; ils sont souvent auxotrophes envers plusieurs acides aminés et vitamines [16] et nécessitent des milieux de fermentation riches en nutriments. Le pH optimal dépend de la souche et varie de 5,5 à 6,2 pour les lactobacilles et de 4,5 à 6,5 pour la plupart des souches du genre *Lactobacillus* [17].

Différentes approches sont utilisées pour isoler et identifier les micro-organismes producteurs de vitamine B12 à partir de matrices complexes ou de collections de souches, notamment des méthodes basées sur la composition du milieu, la présence de gènes individuels ou la mesure directe de la vitamine dans le milieu de fermentation. Le plus souvent, on teste le potentiel de croissance des isolats sur des milieux sans vitamine B12 pour cultiver de manière sélective des souches de production potentielles. L'hypothèse est que seules les bactéries peuvent se développer sur le milieu si elles peuvent produire la vitamine. La vitamine B12 fonctionne comme une coenzyme dans diverses voies procaryotes, par exemple la méthionine synthase dépendante de la cobalamine [18], la glycérol déshydratase et l'éthanolamine ammoniacale [19]. Cependant, comme toutes les bactéries ne dépendent pas des voies dépendantes de la cobalamine et que des alternatives indépendantes de la cobalamine sont présentes [19], cette technique n'est pas entièrement discriminatoire à l'égard des organismes non producteurs [20]. Cette méthode a été appliquée avec succès, isolant quatre souches de *Lactobacillus* de Nukazuke (cornichon japonais) [9] ; un *Bacillus* sp. souche de Tua-Noa (soja fermenté non salé) [21] ; et *Lactobacillus lactis*, *Levilactobacillus brevis* et *Pediococcus pentosaceus* provenant de fermentations industrielles de *Chlorella vulgaris* [22]. La présence d'homologues des gènes de fusion *bluB/cobT2* [23,24] ou du gène *cbiK* [20,25] ont été utilisées comme marqueurs pour identifier les producteurs probables de vitamine B12. Ces gènes codent pour des enzymes spécifiques de la synthèse de la cobalamine : les enzymes *BluB* et *CobT2* catalysent la formation du ligand inférieur DMBI (5,6-Diméthylbenzimidazole) de la vitamine B12 ainsi que son activation et son incorporation dans la molécule de cobalamine [24]. *CbiK* catalyse l'incorporation de l'ion cobalt dans la structure cobalamine [26]. Bhushan et coll. ont appliqué une méthode de dépistage en trois phases (milieu sans vitamine B12, supplémentation en cobalt et recherche du gène *cbiK*) pour isoler les lactobacilles à partir d'échantillons humains (lait maternel et matières fécales) [20]. Le criblage a abouti à deux souches de *Lactiplantibacillus plantarum*.

Bien que l'isolement ait réussi, les auteurs concluent que les deux premières étapes – ou lactobacilles – doivent être plus sélectives et uniquement rechercher le gène *cbiK* pour être suffisantes pour identifier les souches prometteuses. Kumari et coll. a suivi l'identification en une seule phase prévue par le gène *cbiK* et a identifié trois souches productrices de vitamine B12 (*Limosilactobacillus reuteri* F2, *Lactiplantibacillus plantarum* V7 et *Lactocaseibacillus rhamnosus* F5) isolées à partir d'échantillons fécaux de nourrissons [25]. Hugenschmidt et coll. ont criblé les souches PAB et LAB en mesurant directement la teneur en cobalamine des milieux de culture par HPLC, sans restreindre les souches testées à l'aide des méthodes ci-dessus [6].

Après l'identification des producteurs probables de vitamine B12, leur capacité de formation de vitamine B12 est généralement vérifiée par un test microbiologique utilisant *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 (= *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355) [10,21,22] ou des méthodes chromatographiques (chromatographie liquide – spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) [23] et chromatographie liquide ultra-rapide avec détecteur à barrette de diodes (UFLC-DAD) [20]). Le dosage microbiologique de la vitamine B12 est basé sur cette souche indicatrice auxotrophe de la vitamine B12, qui est incubée avec un volume d'échantillon défini dans un milieu de dosage sans vitamine B12. La croissance de l'indicateur

La souche, déterminée par la densité optique (DO), est une mesure de la concentration de vitamine B12 présente. Concernant la physiologie nutritionnelle, il est crucial de considérer la possibilité que des micro-organismes puissent produire des formes de cobalamine qui n'ont aucune fonction physiologique chez l'homme (pseudocobalamine). Cependant, chez les micro-organismes, ces analogues peuvent remplir les mêmes propriétés fonctionnelles que la vraie vitamine B12 [23]. Bien que la souche indicatrice ne puisse pas faire la distinction entre la vitamine B12 active chez l'homme et les pseudovitamines inactives, les procédures chromatographiques telles que LC-MS/MS permettent de distinguer les formes humaines actives et non actives de vitamine B12 s'écarter par leur ligand axial inférieur. Le ligand axial inférieur des pseudovitamines est l'adénine, alors que le DMBI est présent sous la forme active humaine [7,23].

Cette étude visait à isoler et identifier de nouvelles souches productrices de cobalamine à partir de produits de fermentation complexes et de cultures mixtes en utilisant un milieu sans vitamine B12. L'isolat doit être capable de produire la vitamine B12, active physiologique, et démontrer une tolérance aux faibles valeurs de pH. L'application de biofortification alimentaire a été testée sur du jus de pomme pour atteindre les concentrations revendiquées en vitamine B12 sans nécessiter un ajustement du pH ni l'ajout de substances favorisant la croissance (par exemple, extrait de levure). Une concentration d'au moins 1,9 µg de vitamine B12/L a été ciblée, car c'est l'exigence pour les allégations de santé selon le règlement (CE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil (version du 1e

2. Matériels et méthodes

2.1. Milieux de culture utilisés pour l'enrichissement et

l'isolement mMBA (milieu de test de vitamine B12 microbienne modifié) : au total, 42,3 g du milieu de test de vitamine B12 microbienne (M036, HiMedia, Thane, Inde) ont été complétés avec 5 mg/L de cobalt-(II) -chlorure hexahydraté (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) et 5 g/L Glycérol (VWR Chemicals, Darmstadt, Allemagne) pour la culture d'enrichissement. Avant l'autoclavage (121 °C, 15 min), 9 ml du milieu ont été aliquotés dans des tubes de culture de 12 ml munis de bouchons à vis.

Pour les plaques en stries, de la gélose à 1,5 % a été ajoutée.

PAB (Gélose Propionibacterium) : le milieu DSMZ 91 a été utilisé pour l'enrichissement ciblé des bactéries de l'acide propionique (10,0 g de peptone de caséine, sans vitamines (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) ; 5,0 g d'extrait de levure ; 10,0 g de lactate de Na. (60 % p/v, ThermoScientific, Geel, Belgique) et 15,0 g d'agar (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) dans 1 000 ml de H₂O). Dans un pot anaérobie, des plaques de gélose ont été incubées dans des conditions anaérobies en utilisant Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Allemagne).

2.2.

Échantillons Échantillons commerciaux d'une levain (Seitenbacher Natur Sauerteig, Seitenbacher Naturkost, Buchen, Allemagne), d'un jus de choucroute (« Sauerkrautsaft », dmBio, Karlsruhe, Allemagne) et d'une boisson au pain fermenté (« Original Kanne Brottrunk », Kanne Brottrunk GmbH und Co. Betriebsgesellschaft KG, Selm-Bork, Allemagne) ont été achetés dans des supermarchés locaux ; quatre échantillons de lait cru ont été obtenus auprès de fermes laitières locales (zone située dans et autour de Fulda, Allemagne) ; et quatre probiotiques ont été commandés en ligne. Les espèces contenues sont répertoriées ci-dessous pour chaque produit individuel ; s'ils ont été reclassés lors de la réorganisation taxonomique de 2020 [27], la nouvelle désignation d'espèce est donnée :

- « Symbio Extra RedCare », Shop-Apotheke BV, Sevenum, Pays-Bas : *Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* ;
- « OMNi-BiOTiC® 10 », APG Allergosan Pharma GmbH, Graz, Autriche : *L. acidophilus* W55, *L. acidophilus* W37, *L. plantarum* W1, *B. lactis* W51, *Enterococcus faecium* W54, *L. paracasei* W20, *Lactocaseibacillus rhamnosus* W71, *Ligilactobacillus salivarius* W24, *L. plantarum* W62, *Bifidobacterium bifidum* W23 ;
- « BactoFlor 10/20 », Dr. Wolz Zell GmbH, Geisenheim, Allemagne : *B. bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, E .

- « Darmflora plus select », Dr Wolz Zell GmbH, Geisenheim, Allemagne : *L. acidophilus*, • « Darmflora plus select », Dr Wolz Zell GmbH, Geisenheim, Allemagne : *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. breve*, *Streptococcus thermophilus*, *B. bifidum*, *B. lactis*.

Quatre échantillons de levain fermenté maison et un kimchi fermenté maison ont été testés. Les échantillons n'ont pas été préparés par les auteurs eux-mêmes mais ont été mis à disposition suite à une demande de contacts personnels. Ces seize échantillons ont été analysés en demande de contacts personnels. Ces seize échantillons ont été analysés en souches productrices d'amine B12 et de vitamine B12. *Mimosilactobacillus reuteri* DSM 20016 (ATCC 23272) a été utilisée comme contrôle positif pendant la procédure d'isolement. Cette souche a été utilisée comme contrôle positif pendant la procédure d'isolement. Cette souche était sélectionnée comme contrôle positif car il réalise une croissance rapide sur le mMBA, et le pseudo- sélectionné comme contrôle positif car il réalise une croissance rapide sur le mMBA et le La synthèse de docobalamine est bien décrite dans la littérature [7, 23]. Une synthèse de pseudocobalamine mMBA non inoculée est bien décrite dans la littérature [7, 23]. Un non inoculé a été utilisé comme contrôle négatif. mMBA a été utilisé comme contrôle négatif.

2.3. Aperçu de la procédure d'isolement

La procédure de sélection est illustrée à la figure 1. Dans la première phase, les produits alimentaires ont été analysés pour la présence de vitamines B12 par la MABA, 100 µl de l'échantillon ont été transférés dans 900 µl de MRS-H175 (Carlsberg, København, Danemark) et incubés à 30 °C pendant 48 h avant de mesurer les valeurs. Lorsque la quantité de B12 a été détectée, la culture a été lavée trois fois dans une eau stérilisée. Et la culture la plus élevée en concentration a été transférée dans MRS-H175 et incubée pendant 48 h à 30 °C. Si aucune vitamine B12 n'est détectée, la culture MRS est échantillon a été jeté. a été

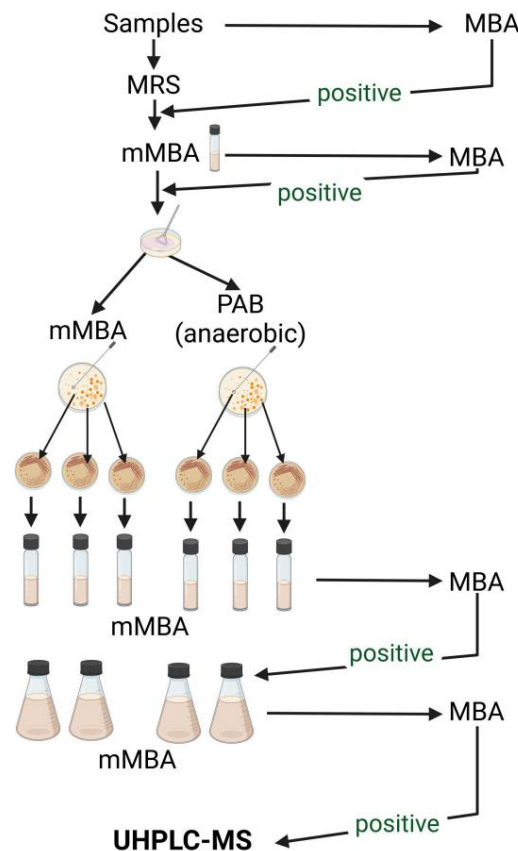


Figure 1. Procédure d'isolement et de sélection des producteurs de cobalamine dans différents échantillons alimentaires
Figure 1. Procédure d'isolement et de criblage des producteurs de cobalamine dans différents échantillons
alimentaires et probiotiques. MBA : test microbien, PAB : gélose Propionibacterium et mMBA : microbien modifié
probiotiques. MBA : test microbien, PAB : gélose Propionibacterium et mMBA : milieu de test
microbien vit-vitamine B12 modifié. Créé avec [BioRender.com](https://www.biorender.com), consulté le 20 juin 2024.

Par la suite, cinq sous-cultures ont été réalisées en transférant 100 µL dans 9 mL de mMBA après une incubation à 30 °C pendant 48 à 72 h. La dernière sous-culture a été utilisée pour le mMBA après incubation à 30 °C pendant 48 à 72 h. La dernière sous-culture a été utilisée pour le mMBA afin de déterminer la présence de producteurs de cobalamine dans la communauté microbienne. Le positif déterminer la présence de producteurs de cobalamine dans la communauté microbienne. Les échantillons mBAs positifs ont été étalés sur gélose mMBA et PAB (incubation anaérobie) avec

différentes dilutions et incubé pendant 72 à 96 h à 30 °C. Un nombre aléatoire de colonies a été étalé en stries sur le milieu respectif et incubé dans les mêmes conditions.

Des colonies individuelles des colonies isolées ont été transférées dans le mMBA et testées à nouveau pour la croissance de la souche indicatrice. Les isolats positifs pour la cobalamine ont été cultivés dans 200 ml de mMBA et soumis à des analyses LC-MS/MS pour déterminer le niveau de cobalamine présent.

2.4. Préparation des

échantillons Pour examiner les échantillons solides (alimentaires) et les probiotiques, 0,1 g de l'échantillon ou le contenu d'une capsule a été dissous dans 9 ml de solution saline ; la préparation suivante était identique pour les échantillons dissous, liquides et fermentés.

Une partie de l'échantillon (4 ml) a été transférée dans un tube à centrifuger ambré et bouillie pendant 10 minutes après avoir ajouté 50 µL de KCN à 0,1 % (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne). Ce traitement rompt les cellules microbiennes ; libère la cobalamine dans l'espace extracellulaire ; et le convertit en sa forme la plus stable, la cyanocobalamine [1]. Après centrifugation à 4000 tr/min pendant 10 min (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Allemagne), 1 mL de surnageant a été transféré dans 9 mL du milieu de dosage de la vitamine B12, préparé en dissolvant 42,3 g/L du milieu de test (M036, HiMedia, Inde) sous chaleur. Si le surnageant était trouble après centrifugation, l'échantillon était filtré à travers un filtre seringue (0,45 µm, PES 25 mm, WICOM, Heppenheim, Allemagne) avant d'être transféré dans le milieu de test.

Après autoclavage (121 °C, 15 min) et refroidissement, les échantillons ont été inoculés avec 50 µL de l'indicateur lavé et dilué.

2.5. Test de vitamine B12 microbienne modifiée (MBA)

Pour le test de vitamine B12 modifié, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355 a été utilisé comme souche indicatrice pour déterminer la présence de cobalamine dans les échantillons, la culture mixte et les cultures isolées séquentiellement. La souche indicatrice est conservée à -80 °C et réactivée (30 °C, 48–72 h) dans 9 ml de bouillon microinoculum, composé de 5,0 g de peptone, 2,0 g d'extrait de levure, 10 g de D-(+)-glucose, 2 g de KH₂PO₄ et 0,1 g de Tween 80 dans 1000 mL demi. eau (tous les composants proviennent de Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne). Avant utilisation dans les tests microbiologiques, la culture indicatrice a été lavée (4 000 tr/min, 5 min ; Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Allemagne) trois fois dans une solution saline (NaCl à 0,85 %, Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) et diluée à 10 %. pli.

Un spectrophotomètre (DR6000, Hach Lange, Düsseldorf, Allemagne) a été utilisé pour mesurer la croissance de l'indicateur à $\lambda = 600$ nm (DO600) après 48 h d'incubation à 30 °C. Les échantillons présentant une densité optique au moins deux fois supérieure à la valeur à blanc ont été considérés comme positifs à la vitamine B12.

2.6. Conditions de croissance et détermination des formes bioactives de vitamine B12

Pour les analyses LC-MS/MS, les six isolats ont été cultivés dans 200 mL de mMBA (inoculum 1%- v/v après culture sur trois sous-cultures dans 9 mL de mMBA) dans un flacon Erlenmeyer pendant sept jours à 30 °C. *Acidipropionibacterium acidipropionici* DSM 20273 a été cultivé de manière identique à une souche de référence. La préparation des échantillons a été réalisée conformément à la littérature [28]. À cette fin, de la 15N-cyanocobalamine a été ajoutée comme étalon interne. La norme a été préparée et fournie par Lenz et al. [28] suivant le régime rapporté par Wang et al. [29]. Les échantillons ont été pré-digérés avec de la taka-diaxase d'*Aspergillus oryzae* et de la papaïne du latex de papaye (deux enzymes de Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne). La purification a été réalisée à l'aide de colonnes d'immunoaffinité (EASI-EXTRACT® Vitamine B12 ; R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne).

La distinction entre l'actif humain et la pseudovitamine, à l'aide d'un système UHPLC (chromatographie liquide à ultra haute pression) couplé à un spectromètre de masse à piège à ions, a été établie par les auteurs décrivant la méthode [28].

2.7. identification des souches de production

isolées Braunschweig , Allemagne (Collection allemande de souches de micro-organismes et de cultures cellulaires).

A. orientalis a été initialement décrit en 2001 par Lisdiyanti et al. [30]. Le type de souche de l'espèce est 21F-2T (= NRIC 0481T = IFO 16606T = JCM 11195T), isolée de la fleur de canna. La souche produit de l'acide 2-céto-D-gluconique à partir du glucose, mais pas de l'acide 5-céto-D-gluconique ou de l'acide 2,5-dicéto-D-gluconique, et pousse entre 3,5 et 8,0 [30].

A. malorum a été initialement décrit en 2002 par Cleenwerck et al. [31]. Le type de souche de l'espèce est LMG 1746T (= DSM 14337T), isolée de pomme pourrie. Il produit de l'acide 2-céto-D-gluconique à partir du glucose mais pas de l'acide 5-céto-D-gluconique. Le pH optimal varie de 4,5 à 7,0 [32].

Les rapports sur les espèces *A. orientalis* et *A. malorum* sont rares et aucun n'est associé à la synthèse de la vitamine B12 . La recherche PubMed pour « *Acetobacter orientalis* » renvoie 20 résultats, tandis que la recherche pour « *Acetobacter malorum* » renvoie 23 résultats.

2.8. Test de croissance à faible pH sur le jus de pomme

La détermination de la capacité de croissance à faible pH a été réalisée sur du jus de pomme ajusté à différentes valeurs de pH (pH 2,85, 3,05, 3,30 (pH initial du jus de pomme), 3,55 et 3,80). Le jus de pomme a été choisi car il s'agit d'un produit régional également consommé dans le monde entier et disponible toute l'année à un prix relativement bas. De plus, le faible pH inhibe la croissance de la plupart des bactéries et constitue donc un milieu difficile. Ces valeurs de pH ont été sélectionnées pour étudier les limites inférieures de la capacité de croissance et du potentiel de formation de produits, car cela permettrait de différencier les bactéries acétiques des LAB et des PAB. Le jus de pomme a été acheté dans un supermarché local («rio d'oro», Aldi Süd, Fulda, Allemagne) et son pH a été ajusté avec de l'acide chlorhydrique ou de l'hydroxyde de sodium (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne). Avant l'autoclavage (121 °C, 15 min), 30 ml de jus de pomme préparés ont été aliquotés dans 100 ml de flacons en verre de laboratoire. Les échantillons inoculés ont été réalisés en triple et les blancs en double.

Avant l'inoculation, les cultures ont été réactivées après stockage (-80 °C, glycérol) dans du jus de pomme additionné de 5 g/L d'extrait de levure et un pH ajusté à 5,6 (72 h, 30 °C). Les cultures réactivées ont été repiquées deux fois avec 0,1 L sur 9,9 mL de jus de pomme pur (pH 3,30, 72 h, 30 °C) avant de transférer 300 µL (1 % v/v) dans 30 mL du milieu de fermentation. Des repiquages de jus de pomme ont été réalisés pour permettre une adaptation au faible pH du jus de pomme. Les cultures ont été incubées pendant 7 jours à 30 °C dans un bain-marie à agitation linéaire (1083, GFL, Burgwedel, Allemagne). La densité optique OD600 (DR6000, Hach Lange, Düsseldorf, Allemagne), le pH (InLab Flex-Micro et SevenExcellence, Mettler Toledo, Gießen, Allemagne) et la concentration en vitamine B12 (MBA) ont été déterminés après incubation.

2.9. Procédure de quantification par dosage microbien de la vitamine B12 (MBA)

Le milieu de test microbiologique B12 de Millipore (B3801, Darmstadt, Allemagne) a été utilisé pour la quantification. Le manuel du fabricant a été suivi, avec quelques modifications.

Au total, 20 ml des échantillons et 50 µL de KCN (1 %) ont été mélangés à 50 ml de la solution tampon de décomposition (1,29 g d'hydrogénophosphate disodique, 1,1 g d'acide citrique et 1,0 g de métabisulfite de sodium dans 100 ml). d'eau distillée) avant autoclavage (121 °C, 15 min). Après refroidissement, le pH a été ajusté à 6,0 et le volume a été rempli jusqu'à 100 ml d'eau. Au total, 1 ml de l'échantillon centrifugé (4 000 tr/min, 10 min) a été transféré dans 5 ml du milieu de test et rempli à 10 ml d'eau. Les concentrations d'étalonnage de l'étalon de vitamine B12 (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) ont été fixées à 25, 50, 75, 100, 125, 150 et 175 pg/mL.

Avant le lavage, la dilution et l'inoculation, 1 ml de la culture indicatrice a été incubé dans 9 mL du milieu d'essai pendant 48 h pour épuiser la culture de cobalamine.

La détermination a été effectuée en triple pour les échantillons et les standards. La densité optique (OD600) des échantillons a été mesurée par rapport à l'eau. La concentration de l'échantillon a été déterminée à l'aide du tracé semi-logarithmique de la densité optique sur la concentration standard.

3. Résultats

3.1. Isolement des producteurs de

cobalamine Sept des seize échantillons de produits ont eu des réponses positives au premier MBA réalisé (Tableau 1), y compris tous les échantillons de lait (n = 4), la boisson au pain, un probiotique, un échantillon de levain fermenté maison, plus le contrôle positif. Lors de la vérification de la communauté microbienne de ces échantillons, seul l'échantillon de levain s'est révélé positif à la cobalamine. L'élimination de certains échantillons au stade de la communauté microbienne n'était pas surprenante pour la plupart des catégories de produits.

Tableau 1. Récapitulatif des échantillons dépistés positifs et négatifs par MBA sur les différentes phases d' isolement.

Indicateur Croissance	Nombre de produits	Communauté microbienne	Isole
Négatif	9	6	15
Positif	7 L. reuteri DSM 20016	1 (levain) L. reuteri DSM 20016	6 L. reuteri DSM 20016

La vitamine B12 présente dans le lait est synthétisée par le microbiote ruminal de la vache et accumulée par les tissus [1]. Il reste encore à déterminer si la glande mammaire est un organe stérile, si les micro-organismes présents dans le lait cru sont causés par une contamination lors du prélèvement ou s'il existe un microbiome du lait [33]. Cependant, il a été prouvé que la composition du microbiome du rumen est plus diversifiée et diffère considérablement de celle des micro-organismes présents dans le lait (34). La détermination de la cobalamine dans le lait était attendue, mais la détection des producteurs responsables n'était pas supposée. Le seul probiotique (« Darmflora plus select ») testé positif à la cobalamine est complété par 2,5 µg de vitamine B12 par capsule. Le résultat positif de la communauté microbienne de la boisson au pain fermenté était attendu, car la bouteille est étiquetée avec une teneur en vitamine B12 de 1,36 µg/L. La vitamine est produite par les levains , qui ne sont pas désactivés dans le produit final. Cependant, les micro-organismes responsables de la formation de vitamine B12 dans la boisson au pain n'ont pas pu s'affirmer au cours de la deuxième phase au point de pouvoir mesurer la vitamine B12 .

Comme seule la communauté microbienne d'un levain était positive pour la vitamine, seules les colonies de ces échantillons ont été isolées sur plaques de gélose. Six des vingt et une colonies collectées aléatoirement se sont révélées positives lors de l'analyse MBA et ont donc été identifiées par la DSMZ après détermination de la forme de vitamine B12 présente.

3.2. Identification des souches isolées L'analyse

des six isolats envoyés à la DSMZ a révélé que cinq isolats sont très similaires et peuvent être attribués à l'espèce *Acetobacter malorum*. En revanche, le sixième isolat est identifié comme étant *Acetobacter orientalis* HFD 3031. Par conséquent, on suppose que les isolats d'*Acetobacter malorum* constituent une seule souche qui a été isolée plusieurs fois. Par conséquent, une seule souche, *A. malorum* HFD 3141, sera examinée dans les considérations suivantes.

3.3. Vérification LC-MS/MS de la formation de vitamine

B12 La LC-MS/MS a été utilisée pour déterminer la forme de vitamine B12 présente. Les schémas de fragmentation de la vitamine B12 peuvent être clairement distingués de ceux de la pseudovitamine en spectrométrie de masse (Figure 2).

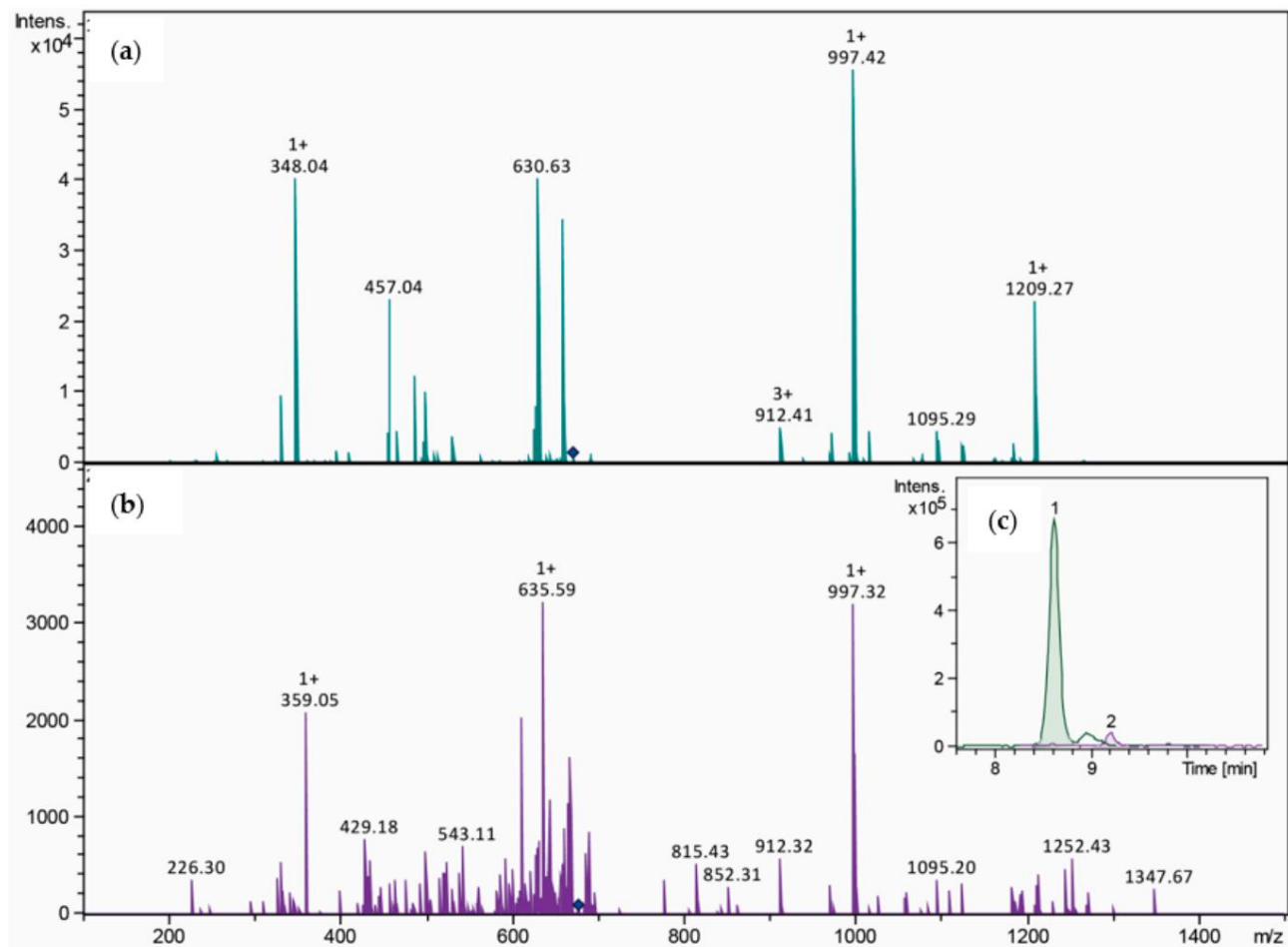


Figure 2. Résultats LC-MS/MS de *A. acidipropionici* DSM 20273. (a) Schéma de fragmentation de la pseudocobalamine la forme active (contenant le radical cation m/z 449,2448), (b) de la vitamine B12 (bleu) contenant l'ester d'acide m/z 359,05. Les masses marquent l'ion parent respectif des deux formes de cobalamine de m/z 678,00 (vitamine B12) et m/z 672,20 (pseudocobalamine). (c) ELC de vitamine B12 (m/z 678,00, violet) et pseudocobalamine (m/z 672,20, vert) avec leurs différences de temps de rétention.

Alors que m/z 997 peut être trouvé sous la forme pseudo et active (Figure 2a, b), la présence des ions de fragmentation m/z 348,04 [Acé-sucrose+P⁺3] pseudocobalamine m/z 359,05 [DMBI-sucrose+P⁺3] (vitamine B12) fournit un marqueur clair de la forme vitaminique présente, car qu'il y ait de nombreux fragments de m/z 123. La figure 2c montre la caractéristique temps de rétention de la pseudocobalamine (pour la vitamine B12 qui a m/z 678,00, la B12 (pic 1) à 8,2 fois plus. Aucun pic n'a été détecté au temps de rétention de 9,2 min (Figure 2c), mais les deux isolats ont présenté un pic à 9,2 minutes dans l'ELC. Ni l'un ni l'autre des échantillons D 31 ni l'un ni l'autre des échantillons D 302 ni l'un ni l'autre des échantillons de pseudocobalamine de la culture de fermentation (Figure 3) figure A. Alors que m/z 678,00 et 672,20 se distinguent 359,05 de DMBI et inférieur DMBI. Il a, de m/z 678,00, formé consécutivement, il a été démontré que ces deux isolats peuvent produire de la vitamine B12, mais pas la transformation dans les conditions de fermentation données.

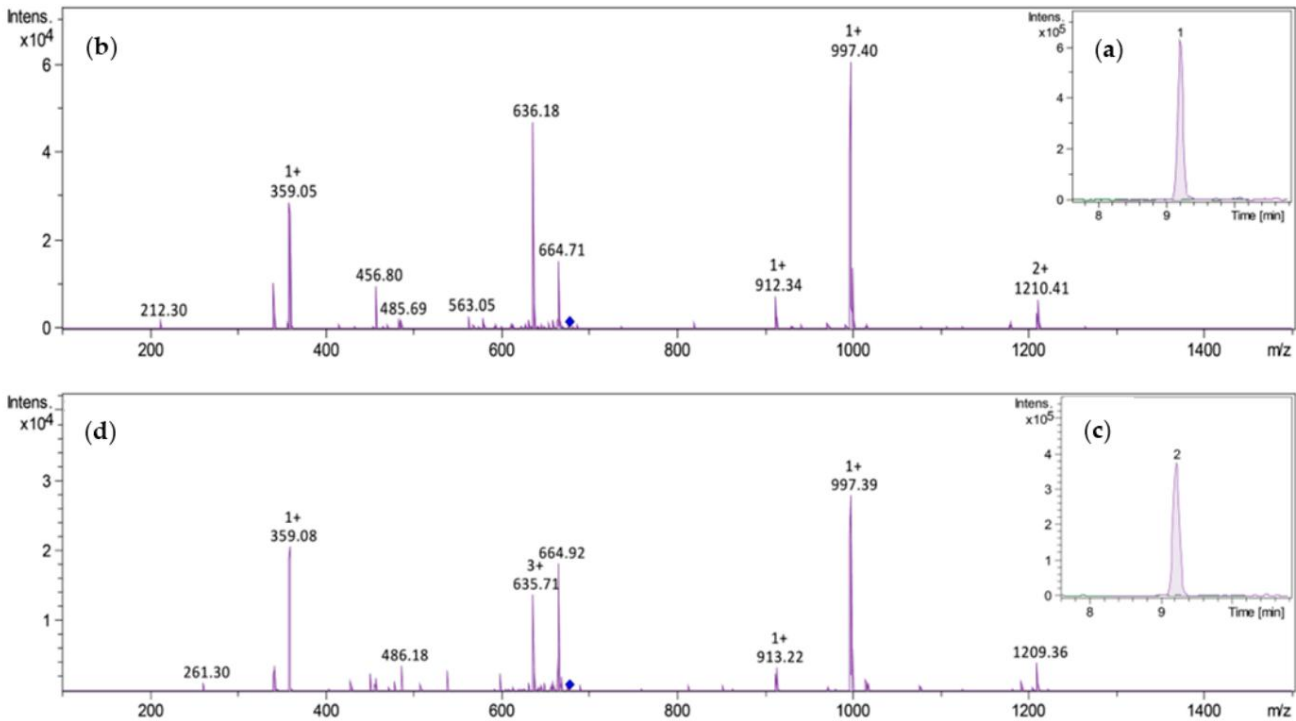


Figure 3. Résultats LC-MS/MS de *A. orientalis* HFD 3031 (a) EIC de la vitamine B12 (m/z 678,00) et (b) schéma de fragmentation de la vitamine B12 (m/z 678,00) contenant du charac- pseudocobalamine (m/z 672,20) et (c) EIC de la vitamine B12 (m/z 678,00) et (d) schéma de fragmentation de la vitamine B12 (m/z 678,00) contenant du charac- pseudocobalamine (m/z 672,20). Résultats LC-MS/MS de *A. malorum* HFD 3141. (c) EIC de la vitamine B12 (m/z 678,00) caractéristique et pseudocobalamine (m/z 672,20), et (d) schéma de fragmentation de la vitamine B12 (m/z 678,00) et de la pseudocobalamine (m/z 672,20), et (d) schéma de fragmentation de la vitamine B12 (m/z 678,00) caractéristique m/z 359,05. Les losanges marquent l'ion parent de la vitamine B12 (m/z 678,00). Les losanges marquent l'ion parent de la vitamine B12 (m/z 678,00).

3.4. Test de tolérance à un pH faible

Les résultats des tests de tolérance pH sont affichés dans le tableau 2. Les valeurs OD600 sont corrigées par l'entrée de turbidité du milieu, c'est-à-dire moins la valeur à blanc, et le pH corrigé par l'entrée de la température du milieu, c'est-à-dire moins la valeur à blanc. Les deux isolats, *A. orientalis* HFD 3031 et *A. malorum* HFD 3141, peuvent pousser sur du jus de pomme sans supplément d'acides aminés ou de vitamines. La tolérance aux pH bas est similaire pour les deux souches.

Tableau 2: Effet du pH initial sur la modification de la DO600, de la valeur du pH et de la concentration en vitamine B12 après sept jours.

A. orientalis HFD 3031					A. malorum HFD 3141				
orientalis HFD 3031					A. malorum HFD 3141				
pH initial	Vitamine B12				Vitamine B12				Vitamine B12
	ΔOD600	ΔpH	ΔOD600	ΔpH	ΔOD600	ΔpH	ΔOD600	ΔpH	
2,85	0,068 ± 0,24	-0,05	2,85	0,068 ± 0,24	0,000 ± 0,008	0,35 ± 0,90	0,000 ± 0,008	-0,05	<LOD
3,05	0,193 ± 0,42	-0,05	3,30	0,063 ± 0,07	2,68 ± 0,92	0,059 ± 0,018	2,68 ± 0,92	-0,08	0,89 ± 0,92
3,30	0,063 ± 0,07	3,55	0,349 ± 0,064	-0,26	3,19 ± 0,13	0,069 ± 0,005	10,29 ± 0,50	-0,18	0,21 ± 0,96
inférieure à la limite de détection (LOD)	0,26 ± 0,26	3,80	0,438 ± 0,026	-0,33	0,008 ± 0,008	0,008 ± 0,008	0,008 ± 0,008	-0,22	3,81 ± 1,42
3,80					± 2,33	0,181 ± 0,024		-0,38	7,97 ± 1,56

* valeur inférieure à la limite de détection (LOD).

Une légère augmentation de la DO600 a été observée à pH 2,85 pour *A. orientalis* HFD 3031 et à pH 3,05 pour *A. malorum* HFD 3141. Comme cette augmentation se produit en même temps qu'un grand standard écarts types dans les concentrations de DO600 et de vitamine B12, c'est le seuil de tolérance minimum des souches respectives. La plage de tolérance pour les deux isolats est donc définie respectivement de pH 3,05 et 3,30, respectivement. Avec une valeur initiale de pH croissante, la modification de la densité optique, la baisse du pH et la concentration en vitamine B12 augmentent. Le plus haut la densité optique, la baisse du pH et la concentration en vitamine B12 augmentent. La croissance et la synthèse de produits les plus élevées ont été observées à la valeur de départ du pH la plus élevée pour les deux isolats.

isole. À pH 3,80, *A. orientalis* produit 18,89 µg/L de vitamine B12 et *A. malorum* en produit 7,97 µg/L. On peut émettre l'hypothèse d'une augmentation supplémentaire de la croissance et de la synthèse de la vitamine B12 à des valeurs de pH initiales plus élevées, car le pH optimal d'*Acetobacter* sp. est de 5,0 à 6,5 [35]. La diminution du pH pendant la fermentation est due à la formation probable d'acide gluconique à partir du glucose [30,31]. Malgré les conditions de croissance défavorables dans le jus de pomme (pH faible et mauvaise composition en acides aminés), les deux souches ont pu se développer même au pH d'origine et produire des quantités considérables de vitamine.

4. Discussion

Il a été démontré que l'utilisation d'un milieu sans vitamine B12 pour isoler les formateurs de cobalamine des produits de fermentation complexes est viable. Bien que les expériences d'enrichissement et d'isolement visaient PAB et LAB, deux nouvelles souches puissantes de vitamine B12 appartenant à AAB ont été isolées. Ces souches ont été identifiées par MALDI-TOF MS comme *A. malorum* et *A. orientalis*. Cependant, l'identification de l'AAB est particulièrement difficile en raison du degré élevé de similitude entre les séquences génétiques de l'ARNr 16S d'espèces étroitement apparentées.

Wieme et coll. (2014) n'ont pas pu distinguer *A. malorum* LMG 1746 des souches d'*Acetobacter cerevisiae* par analyse MALDI-TOF MS [36]. Même la comparaison des ARNr 16S d'*A. malorum* et d'*A. cerevisiae* n'est pas suffisante pour identifier clairement ces espèces. Par conséquent, d'autres méthodes, telles que la région d'espacement transcrit interne (ITS) entre les gènes d'ARNr 16S et 23S, sont recommandées dans la littérature pour l'identification des AAB. Cette technique permet de différencier ces espèces étroitement apparentées [37]. Par conséquent, il est possible que les isolats actuels, lorsqu'ils sont identifiés par des méthodes plus adaptées à l'AAB, doivent être reclassés. Si des essais similaires devaient être menés, le programme d'essai devrait inclure des sources alimentaires fermentées à l'acide acétique et des milieux de fermentation spécialement conçus pour l'AAB, comme le milieu désigné à pH 3,5 [38]. Bien que l'isolement et l'identification via le milieu sans vitamine B12 soient viables, une analyse ultérieure pour déterminer la forme de cobalamine présente est nécessaire afin d'exclure la synthèse de pseudocobalamine.

La raison pour laquelle seulement deux autres AAB [7,8] avaient été identifiés avant notre publication est que les isolats criblés sont présélectionnés par leur genre ou même leur espèce avant le criblage. Les étapes de présélection impliquent l'utilisation de souches facilement identifiées génotypiquement (PAB et LAB) [6,20], la coloration de Gram [9,20,22], l'aspect morphologique au microscope [9,22], l'activité catalase [20,22], et la détection de la formation d'acide lactique et d'éthanol [9]. Les PAB sont Gram positifs, non mobiles, anaérobies à aérotolestants [39] et catalase positifs. Les LAB sont des Gram positifs, des anaérobies facultatifs et des catalase négatives [40]. Comme les AAB sont à Gram négatif, catalase positive, aérobies obligatoires et produisent de l'acide acétique à partir de l'utilisation de l'éthanol [41], ils sont préalablement filtrés. Le prochain criblage de souches d'AAB facilement isolées ou l'isolement ciblé à partir de matrices alimentaires par les stratégies mentionnées ci-dessus (par exemple, milieux sans vitamine B12 et gènes *cbiK* ou *bluB/cobT2* comme marqueurs) conduira probablement à l'identification d'un plus grand nombre de producteurs de cobalamine au sein du groupe AAB. Le criblage par les gènes spécifiques impliqués dans la synthèse des vitamines devrait idéalement prendre en compte les variations de séquence des homologues. Il a été démontré que les variations de séquence des homologues de type *cobU/T* sont responsables de la sélectivité des différents ligands inférieurs incorporés dans le cobamide (42-44). Bien qu'il existe une préférence généralisée pour le DMBI, d'autres ligands inférieurs peuvent être incorporés au cobamide en fonction de l'homologue présent et des conditions environnementales [43]. Par conséquent, si le DMBI n'est pas apporté par le milieu de fermentation ou les souches de production, des cobamides peuvent se former qui ne remplissent pas la fonction de la vitamine B12 chez l'homme. Le criblage et l'identification basés sur la présence des enzymes spécifiques de la synthèse de la vitamine B12 doivent donc inclure la connaissance de la synthèse du DMBI et de la sélectivité des homologues.

La biofortification des aliments par *Acetobacter* sp. présente un potentiel élevé pour les fermentations alimentaires traditionnelles. Puisque leurs capacités métaboliques sont moins restreintes que celles des LAB, ils peuvent se développer dans des milieux moins riches en nutriments, ils ont une haute tolérance aux pH faibles et la pseudocobalamine n'a pas été détectée dans nos échantillons. Ces caractéristiques qualifient *A. orientalis* HFD 3031 et *A. malorum* HFD 3141 pour fortifier la vitamine B12 dans les milieux de fermentation.

inadapté aux autres producteurs. Leur capacité à cultiver et à produire de la vitamine B12 dans le jus de pomme a été démontrée avec succès dans ces travaux. La concentration de 1,9 µg/L suffisante pour les allégations de santé a été dépassée par *A. orientalis* HFD 3031 (3,19 µg/L) à la valeur pH originale du jus de pomme et par *A. malorum* HFD 3141 à pH 3,55 avec 3,81 µg/L. Cependant, la croissance et les concentrations finales étaient relativement faibles et des mesures visant à augmenter les concentrations devraient être étudiées. Dans des expériences sur l'enrichissement en vitamine B12 par *L. reuteri* dans le furu (tofu fermenté) [25,45] et le lait de soja [25], des concentrations de 141,7 µg/kg de poids humide et 132,2 µg/L, respectivement, ont été atteintes. Lors de la fermentation de l'eau de coco mature avec *L. plantarum* DW12, une concentration en vitamine B12 de 14 µg/mL a pu être atteinte [46]. Par la co-culture de *P. freudenreichii* et de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, la teneur en vitamine B12 a atteint jusqu'à 8,93 µg/L dans le lactosérum de soja, alors que dans la fermentation en culture unique de *P. freudenreichii*, 5,72 µg/L a été détectée [47]. La fermentation du son de blé solubilisé avec *P. freudenreichii* a abouti à la production de 55 µg/L de vitamine B12 par co-fermentation avec des bactéries lactiques et des levures [48].

Dans la plupart des cas, les concentrations en vitamines que nous obtenons sont similaires à celles trouvées dans la littérature lors de l'enrichissement des aliments, même si dans certains cas, des niveaux nettement plus élevés sont constatés. Mais les expériences menées pour évaluer la tolérance au pH des isolats dans la plage basse indiquent que le potentiel maximum de synthèse de la vitamine B12 n'a pas encore été atteint. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour déterminer l'impact de différents paramètres de fermentation, tels que des valeurs de pH plus élevées, différents types de jus de fruits, températures de fermentation et taux d'aération, sur la synthèse. Des études visant à déterminer si l'ajout de précurseurs (DMBI, riboflavine, nicotinamide, etc.) ont un effet promoteur similaire à celui du PAB [49] fourniraient également un aperçu plus approfondi des caractéristiques de synthèse des souches.

L'enrichissement des aliments végétaux par fermentation peut fournir des concentrations pertinentes dans les régimes végétaliens et végétariens. L'utilisation de souches incapables de produire des analogues constitue une source fiable de forme physiologiquement active. L'incorporation d'*A. malorum* HFD 3141 et d'*A. orientalis* HFD 3031 dans des cultures starter de fermentation, qui contiennent naturellement de l'AAB, est prometteuse. Le scoby (kombucha), les grains de kéfir (kéfir et kéfir d'eau), la mère vinaigre (vinaigre) [50] et le levain [51] pourraient être des exemples d'application des souches isolées. Comme les AAB font déjà partie de ces processus de fermentation, les caractéristiques du produit ne doivent pas être radicalement modifiées. De plus, ces aliments fermentés avec de l'AAB doivent être testés sur leur teneur en vitamine B12, car les données disponibles dans ce domaine sont considérées comme ins

Cette étude démontre la nécessité d'élargir la recherche de souches potentielles dans la biofortification alimentaire en vitamine B12. Les auteurs précédents se sont concentrés sur le criblage des LAB et PAB pour leurs capacités de formation de cobalamine. Nos résultats, ainsi que ceux de Bernhardt et al. [7] et Keto et al. [7,8], autorisent la conjecture selon laquelle la découverte de plus de producteurs de vitamine B12 au sein du groupe AAB est probable. L'isolement d'un plus grand nombre d'AAB donnera une plus grande variété de caractéristiques de production, comme différents types d'aliments, rendements, tolérance au pH, utilisation du sucre et besoins nutritionnels.

Contributions de l'auteur : Conceptualisation, LS ; méthodologie, LS ; validation, LS ; analyse formelle, LS ; enquête, LS ; ressources, LS ; conservation de données, LS ; rédaction – préparation du projet original, LS ; rédaction – révision et édition, LS, SS et AC ; visualisation, LS ; supervision, SS et AC ; administration de projet, SS, AC et LS ; acquisition de financement, N/A. Tous les auteurs ont lu et accepté la version publiée du manuscrit.

Financement : Cette recherche n'a reçu aucun financement externe.

Déclaration du comité d'examen institutionnel : sans objet.

Déclaration de disponibilité des données : les contributions originales présentées dans l'étude sont incluses dans l'article, des demandes complémentaires peuvent être adressées aux auteurs correspondants.

Conflits d'intérêts : Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

Les références

1. Watanabe, F. ; Bito, T. Sources de vitamine B12 et interaction microbienne. *Exp. Biol. Méd.* 2018, 243, 148-158. [\[Référence croisée\]](#)
2. Waldmann, A. ; Koschizke, JW; Leitzmann, C. ; Hahn, A. Apports alimentaires et facteurs de mode de vie d'une population végétalienne en Allemagne : Résultats de l'étude végétalienne allemande. *EUR. J. Clin. Nutr.* 2003, 57, 947-955. [\[Référence croisée\]](#)
3. Groupe scientifique NDA de l'EFSA. Avis scientifique sur les valeurs nutritionnelles de référence pour la cobalamine (vitamine B12). *EFSA J.* 2015, 13, 4150. [\[CrossRef\]](#)
4. Gomes Soares, M. ; Bevilacqua, GC; Marcondes Tassi, É.M. ; Reolon Schmidt, VC Aliments et boissons fermentés : un potentiel de biofortification in situ de la vitamine B12 – Une revue de la littérature. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2023, 74, 655-667. [\[Référence croisée\]](#)
5. Croc, H. ; Kang, J. ; Zhang, D. Production microbienne de vitamine B12 : examen et perspectives d'avenir. *Microbe. Fait cellulaire.* 2017, 16, 15. [\[Réf. croisée\]](#)
6. Hugenschmidt, S. ; Schwenninger, SM; Gnehm, N. ; Lacroix, C. Criblage d'une biodiversité naturelle de bactéries lactiques et propioniques pour la production de folate et de vitamine B12 dans un perméat de lactosérum supplémenté. *Int. Laiterie J.* 2010, 20, 852-857. [\[Référence croisée\]](#)
7. Bernhardt, C. ; Zhu, X. ; Schütz, D. ; Fischer, M. ; Bisping, B. La cobalamine est produite par *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509. *Appl. Microbiol. Biotechnologie.* 2019, 103, 3875-3885. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
8. Kato, K. ; Hayashi, M. ; Kamikubo, T. Isolement du coenzyme 5,6-diméthylbenzimidazolyl cobamide en tant que cofacteur du glutamate Formation à partir d'*Acetobacter suboxydans*. *Biochimie. Biophysique. Actes* 1968, 165, 233-237. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
9. Masuda, M. ; Idé, M. ; Utsumi, H. ; Niino, T. ; Shimamura, Y. ; Murata, M. Puissance de production de folate, de vitamine B12 et de thiamine par des bactéries lactiques isolées de cornichons japonais. *Biosci. Biotechnologie. Biochimie.* 2012, 76, 2061-2067. [\[Référence croisée\]](#)
10. De Angelis, M. ; Bottacini, F. ; Fosso, B. ; Kelleher, P. ; Calasso, M. ; Di Cagno, R. ; Ventura, M. ; Picardi, E. ; van Sinderen, D. ; Gobbetti, M. *Lactobacillus rossiae*, un producteur de vitamine B12, représente une espèce métaboliquement polyvalente au sein du genre *Lactobacillus*. *PLoS ONE* 2014, 9, e107232. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
11. Ranaei, V. ; Pilévar, Z. ; Khaneghah, AM; Hosseini, H. Acide propionique : méthode de production, état actuel et perspectives. *Technologie alimentaire. Biotechnologie.* 2020, 58, 115-127. [\[Référence croisée\]](#)
12. Falentin, H. ; Deutsch, S.-M. ; janvier, G. ; Loux, V. ; Thierry, A. ; Parayre, S. ; Maillard, M.-B. ; Dherbecourt, J. ; Cousin, FJ; Jardin, J. ; et coll. Le génome complet de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, une actinobactérie rustique avec des applications alimentaires et probiotiques . *PLoS ONE* 2010, 5, e11748. [\[Référence croisée\]](#)
13. Piwowarek, K. ; Lipinska, E. ; Hańc-Szymańnczuk, E. ; Kot, UN M; Kieliszek, M. ; Bonin, S. Utilisation de la souche *Propionibacterium freudenreichii* T82 pour une biosynthèse efficace de l'acide propionique et du tréhalose dans un milieu avec de l'extrait de marc de pomme et des eaux usées de pommes de terre. *Molécules* 2021, 26, 3965. [\[CrossRef\]](#) [\[Pub Med\]](#)
14. Rehberger, JL; Glatz, BA Réponse des cultures de *Propionibacterium* à l'acide et au faible pH : tolérance et inhibition. *J. Protection alimentaire.* 1998, 61, 211-216. [\[Référence croisée\]](#)
15. Thierry, A. ; Deutsch, S.-M. ; Falentin, H. ; Dalmaso, M. ; Cousin, FJ; Jan, G. Nouvelles connaissances sur la physiologie et le métabolisme de *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Microbiol. alimentaire.* 2011, 149, 19-27. [\[Référence croisée\]](#)
16. Teusink, B. ; Molenaar, D. Biologie des systèmes des bactéries lactiques : pour l'alimentation et la réflexion. *Curr. Avis. Système. Biol.* 2017, 6, 7-13. [\[Référence croisée\]](#)
17. König, H. ; Berkelmann-Löhnertz, B. Maintenance des micro-organismes associés au vin. En *Biologie des Microorganismes du Raisin, du Moût et du Vin* ; König, H., Uden, G., Fröhlich, J., éd.; Springer : Berlin/Heidelberg, Allemagne, 2009 ; pp. 451-468, ISBN 9783540854623.
18. Banerjee, R. ; Ragsdale, SW Les nombreux visages de la vitamine B12 : catalyse par des enzymes dépendantes de la cobalamine. *Ann. Révérend Biochem.* 2003, 72, 209-247. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
19. Shelton, AN; Seth, CE; Mok, KC ; Han, AW; Jackson, SN ; Haft, DR ; Taga, ME Distribution inégale de la biosynthèse du cobamide et de la dépendance des bactéries prédites par la génomique comparative. *ISME J.* 2019, 13, 789-804. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
20. Bhushan, B. ; Tomar, Saskatchewan ; Mandal, S. Criblage phénotypique et génotypique des lactobacilles d'origine humaine pour le potentiel de production de vitamine B12 : validation du processus par micro-essai et UFLC. *Appl. Microbiol. Biotechnologie.* 2016, 100, 6791-6803. [\[Référence croisée\]](#)
21. Okada, N. ; Chettanachitara, C. ; Daengsubha, W. Dépistage des bactéries produisant de la vitamine B12 à partir de Tua-Nao en Thaïlande. *Jpn. Int. Rés. Cent. Agric. Sci.* 1995, 2, 49-57.
22. Ribeiro, M. ; Maciel, C. ; Cruz, P. ; Darmancier, H. ; Nogueira, T. ; Costa, M. ; Laranjeira, J. ; Morais, RMSC; Teixeira, P. Exploiter les bactéries lactiques probiotiques potentielles isolées des photobioréacteurs de *Chlorella vulgaris* en tant que producteurs prometteurs de vitamine B12. *Aliments* 2023, 12, 3277. [\[CrossRef\]](#)
23. Dudko, D. ; Milker, S. ; Holtmann, D. ; Buchhaupt, M. Identification des bactéries productrices de vitamine B12 basée sur la présence de Homologues bluB/cobT2. *Biotechnologie. Lett.* 2023, 45, 563-572. [\[Référence croisée\]](#)
24. Deptula, P. ; Kylli, P. ; Chamlagain, B. ; Holm, L. ; Kostiaainen, R. ; Piironen, V. ; Savijoki, K. ; Varmanen, P. L'activité enzymatique de fusion bluB/cobT2 révèle les mécanismes responsables de la production de la forme active de la vitamine B12 par *Propionibacterium freudenreichii*. *Microbe. Fait cellulaire.* 2015, 14, 186. [\[Réf. croisée\]](#)
25. Kumari, M. ; Bhushan, B. ; Kokkilgadda, A. ; Kumar, V. ; Béhare, P. ; Tomar, SK Biofortification en vitamine B12 du lait de soja grâce à une fermentation optimisée avec des isolats de lactobacilles extracellulaires produisant de la B12 d'origine fécale humaine. *Curr. Rés. Science alimentaire.* 2021, 4, 646-654. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)

26. Raux, E. ; Thermes, C. ; Heathcote, P. ; Rambach, A. ; Warren, MJ Un rôle pour *Salmonella typhimurium* cbiK dans la cobalamine (vitamine B12) et Biosynthèse du Sirohème. *J. Bactériol.* 1997, 179, 3202-3212. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
27. Zheng, J. ; Wittouck, S. ; Salvetti, E. ; Franz, CMAP; Harris, HMB; Mattarelli, P. ; O'Toole, PW ; Pot, B. ; Vandamme, P. ; Walter, J. ; et coll. Une note taxonomique sur le genre *Lactobacillus* : description de 23 nouveaux genres, description modifiée du genre *Lactobacillus* Beijerinck 1901 et Union des *Lactobacillaceae* et *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Évol. Microbiol.* 2020, 70, 2782-2858. [\[Référence croisée\]](#)
28. Lenz, T. ; Maxones, A. ; Pichner, R. ; Birringer, M. Détermination de la vitamine B12 dans les préparations commerciales de pepsine par chromatographie d'immunoaffinité et LC-MS/MS. *Appl. Rés.* 2023, 2, e202200112. [\[Référence croisée\]](#)
29. Wang, M. ; Asam, S. ; Chen, J. ; Ehrmann, M. ; Rychlik, M. Production de quatre cobalamines marquées au 15N via biosynthèse en utilisant *Propionibacterium freudenreichii*. *Devant. Microbiol.* 2021, 12, 713321. [\[CrossRef\]](#)
30. Lisdiyanti, P. ; Kawasaki, H. ; Seki, T. ; Yamada, Y. ; Uchimura, T. ; Komagata, K. Identification des souches d'*Acetobacter* isolées de sources indonésiennes et propositions d'*Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., et *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J. Gén. Appl. Microbiol.* 2001, 47, 119-131. [\[Référence croisée\]](#)
31. Cleenwerck, I. ; Vandemeulebroecke, K. ; Janssens, D. ; Swings, J. Réexamen du genre *Acetobacter*, avec descriptions d'*Acetobacter cerevisiae* sp. nov. et *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int. J. Syst. Évol. Microbiol.* 2002, 52, 1551-1558. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
32. Es-Sbata, I. ; Lakhlifi, T. ; Yatim, M. ; El-Abid, H. ; Belhaj, A. ; Hafidi, M. ; Zouhair, R. Criblage et caractérisation moléculaire de nouvelles souches d'*Acetobacter malorum* thermo-tolérantes à l'éthanol isolées de deux biomes de fruits de cactus marocains. *Biotechnologie. Appl. Biochimie.* 2021, 68, 476-485. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
33. Rainard, P. Microbiote mammaire des ruminants laitiers : réalité ou fiction ? *Vétérinaire. Rés.* 2017, 48, 25. [\[Réf. croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
34. Williamson, JR ; Callaway, TR ; Lourenço, JM; Ryman, VE Caractérisation du microbiote du rumen, des matières fécales et du lait pendant l'allaitement Vaches laitières. *Devant. Microbiol.* 2022, 13, 984119. [\[Réf. croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
35. Gomes, RJ; Borges, MDF ; Rosa, MDF ; Castro-Gómez, RJH ; Spinoso, WA Bactéries acides acétiques dans l'industrie alimentaire : systématique, caractéristiques et applications. *Technologie alimentaire. Biotechnologie.* 2018, 56, 139-151. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
36. Wieme, AD; Spitaels, F. ; Aerts, M. ; de Bruyne, K. ; van Landschoot, A. ; Vandamme, P. Effets du milieu de croissance sur les spectres de masse à temps de vol de désorption-ionisation laser assistée par matrice : une étude de cas sur les bactéries de l'acide acétique. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80, 1528-1538. [\[Référence croisée\]](#)
37. Valera, MJ; Laich, F. ; González, SS ; Torija, MJ; Mateo, E. ; Mas, A. Diversité des bactéries de l'acide acétique présentes dans les raisins sains des îles Canaries. *Int. J. Microbiol. alimentaire.* 2011, 151, 105-112. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
38. Yamada, Y. ; Hosono, R. ; Lisdiyanti, P. ; Widyastuti, Y. ; Saono, S. ; Uchimura, T. ; Komagata, K. Identification des bactéries acétiques isolées de sources indonésiennes, en particulier des isolats classés dans le genre *Gluconobacter*. *J. Gén. Appl. Microbiol.* 1999, 45, 23-28. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
39. Gonzalez-Garcia, R. ; McCubbin, T. ; Navone, L. ; Stowers, C. ; Nielsen, L. ; Marcellin, E. Production microbienne d'acide propionique. *Fermentation* 2017, 3, 21. [\[CrossRef\]](#)
40. Amélia, R. ; Philippe, K. ; Pratama, OUI ; Purwati, E. Caractérisation et potentiel probiotique des bactéries lactiques isolées de Dadiah échantillonnées dans l'ouest de Sumatra. *Science alimentaire. Technologie.* 2021, 41, 746-752. [\[Référence croisée\]](#)
41. Malimas, T. ; Thi Lan Vu, H. ; Muramatsu, Y. ; Yukphan, P. ; Tanasupawat, S. ; Yamada, Y. Systématique des bactéries acides acétiques. Dans les bactéries acides acétiques ; Sengun, IY, éd. ; Série : Série sur la biologie alimentaire | Un livre pour un éditeur scientifique ; CRC Press : Boca Raton, FL, États-Unis, 2017 ; pp. 3-43, ISBN 9781315153490.
42. Crofts, TS; Seth, CE; Hazra, Alberta; Taga, ME La structure du cobamide dépend à la fois de la disponibilité inférieure du ligand et du CobT Spécificité du substrat. *Chimique. Biol.* 2013, 20, 1265-1274. [\[Référence croisée\]](#)
43. Hazra, Alberta ; Tran, JLA; Crofts, TS; Taga, ME L'analyse de la spécificité du substrat dans les homologues CobT révèle une préférence généralisée pour le DMB, le ligand axial inférieur de la vitamine B12. *Chimique. Biol.* 2013, 20, 1275-1285. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
44. Sokolovskaya, OM ; Mok, KC ; Parc, JD ; Tran, JLA; Quanstrom, KA; Taga, ME Sélectivité des cofacteurs dans la méthylmalonyl coenzyme A Mutase, une enzyme modèle dépendante du cobamide. *mBio* 2019, 10, e01303-19. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
45. Bao, X. ; Xiang, S. ; Chen, J. ; Shi, Y. ; Chen, Y. ; Wang, H. ; Zhu, X. Effet de *Lactobacillus reuteri* sur la teneur en vitamine B12 et le microbiote Composition de la Fermentation Furu. *LWT* 2019, 100, 138-143. [\[Référence croisée\]](#)
46. Kantachote, D. ; Ratanaburee, A. ; Hayisama-ae, W. ; Sukhoom, A. ; Nunkaew, T. L'utilisation du probiotique potentiel *Lactobacillus plantarum* DW12 pour la production d'une nouvelle boisson fonctionnelle à partir d'eau de coco mature. *J. Fonct. Aliments* 2017, 32, 401-408. [\[Référence croisée\]](#)
47. Tindjau, R. ; Chua, J.-Y. ; Liu, S.-Q. Co-culture de *Propionibacterium freudenreichii* et de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* améliore la teneur en acides gras à chaîne courte et en vitamine B12 du lactosérum de soja. *Microbiol. alimentaire.* 2024, 121, 104525. [\[Réf. croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
48. Chamlagain, B. ; Edelmann, M. ; Katina, K. ; Varmanen, P. ; Piironen, V. Production de vitamine B12 dans un extrait protéique solubilisé de Son de blé biotransformé avec *Propionibacterium freudenreichii*. *LWT* 2024, 192, 115731. [\[CrossRef\]](#)
49. Chamlagain, B. ; Deptula, P. ; Edelmann, M. ; Kariluoto, S. ; Grattepanche, F. ; Lacroix, C. ; Varmanen, P. ; Piironen, V. Effet des précurseurs du ligand inférieur sur la production de vitamine B12 par les propionibactéries de qualité alimentaire. *LWT* 2016, 72, 117-124. [\[Référence croisée\]](#)

-
50. Yassunaka Hata, NN ; Surek, M. ; Sartori, D. ; Vassoler Serrato, R. ; Aparecida Spinosa, W. Rôle des bactéries acétiques dans les aliments et Breuvages. Technologie alimentaire. Biotechnologie. 2023, 61, 85-103. [\[Référence croisée\]](#)
51. Landis, EA; Oliverio, AM; McKenney, EA; Nichols, LM; Kfoury, N. ; Biango-Daniels, M. ; Coquille, LK ; Madden, AA; Shapiro, L. ; Sakunala, S. ; et coll. La diversité et la fonction des microbiomes de démarrage du levain. Elife 2021, 10, e61644. [\[Référence croisée\]](#)

Avis de non-responsabilité/Note de l'éditeur : Les déclarations, opinions et données contenues dans toutes les publications sont uniquement celles du ou des auteurs et contributeurs individuels et non de MDPI et/ou du ou des éditeurs. MDPI et/ou le(s) éditeur(s) déclinent toute responsabilité pour tout préjudice corporel ou matériel résultant des idées, méthodes, instructions ou produits mentionnés dans le contenu.