



Artículo

Obtención de nuevas cepas productoras de vitamina B12 *Acetobacter malorum* HFD 3141 y *Acetobacter orientalis* HFD 3031 de

Masa madre fermentada en casa

Lisa Stumpf 1,* , Stefan Schildbach ¹ y Aidan Coffey ² ¹ Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Ciencias Aplicadas de Fulda, 36037 Fulda, Alemania; stefan.schildbach@lt.hs-fulda.de² Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Tecnológica de Munster, T12 P928 Cork, Irlanda; Aidan.coffey@mtu.ie *

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

Resumen: La vitamina B12 es un nutriente fundamental en los estilos de vida veganos y vegetarianos, ya que las fuentes de vitaminas de origen vegetal son escasas. Los alimentos fermentados tradicionales podrían enriquecerse añadiendo bacterias productoras de vitamina B12 para ofrecer fuentes de vitaminas no animales. El objetivo era aislar un productor de vitamina B12 que sea capaz de producir la vitamina activa en humanos incluso a valores de pH bajos para poder utilizarla en la fortificación de zumos de frutas. Por lo tanto, se analizaron alimentos fermentados (caseros e industriales) y probióticos para detectar cepas productoras de vitamina B12. Un ensayo microbiológico modificado de vitamina B12 basado en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355 se utilizó para identificar muestras que contenían vitamina B12 y la presencia de cepas productoras de vitamina B12. El examen dio como resultado el aislamiento de varias cepas positivas para la formación de vitamina B12 derivada de la masa madre. La espectrometría de masas confirmó la biosíntesis únicamente de la forma fisiológicamente activa humana. La identificación de especies realizada por la Colección Alemana de Cepas de Microorganismos y Cultivos Celulares dio como resultado dos especies: *Acetobacter orientalis* y *Acetobacter malorum*, de las cuales se caracterizaron dos aislados. Se demostró el potencial de la biosíntesis de cobalamina en matrices alimentarias para *A. malorum* HFD 3141 y *A. orientalis* HFD 3031 en jugo de manzana a diferentes valores de pH (2,85–3,80). Los aislados sintetizaron hasta 18,89 µg/L y 7,97 µg/L de vitamina B12 a pH 3,80. Los resultados de este estudio sugieren que las bacterias del ácido acético (AAB) y los alimentos fermentados con ácido acético son recursos prometedores para la vitamina B12 y sus productores, que podrían haberse pasado por alto en el pasado.

Palabras clave: cobalamina; pseudocobalamina; *Acetobacter*; bacterias del ácido acético; biofortificación de alimentos; hambre oculta



Cita: Stumpf, L.; Schildbach, S.; Coffey, A.

Obtención de una nueva vitamina

Cepas de producción de B12 *Acetobacter**malorum* HFD 3141 y *Acetobacter**orientalis* HFD 3031 de casa-Masa Madre Fermentada. *Aplica.**Microbiol.* 2024, 4, 986–999.[https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030067)[applmicrobiol4030067](https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030067)

Editora Académica: Sabina Fiján

Recibido: 21 de mayo de 2024

Revisado: 8 de junio de 2024

Aceptado: 14 de junio de 2024

Publicado: 23 de junio de 2024



Copyright: © 2024 por los autores.

Licenciario MDPI, Basilea, Suiza.

Este artículo es un artículo de acceso abierto.

distribuido bajo los términos y

condiciones de los Creative Commons

Licencia de atribución (CC BY)

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

1. Introducción

Aunque la cobalamina (vitamina B12) es producida exclusivamente por determinadas bacterias y arqueas, los alimentos de origen animal (carne, huevos y leche) representan la principal fuente de cobalamina en la dieta humana [1]. Al omitirlos, alcanzar los niveles de ingesta diaria recomendados puede resultar un desafío. El Estudio Vegano Alemán (GVS) reveló una brecha significativa en la absorción de vitamina B12 en la comunidad vegana y vegetariana [2]. El GVS encontró que los hombres veganos consumen sólo $0,84 \pm 1,21$ µg/día, y las mujeres veganas consumen $0,78 \pm 2,14$ µg/día de cobalamina, que es inferior a la ingesta diaria recomendada por la EFSA de 4,0 µg [3]. Por lo tanto, el suministro de nutrientes vitales a través de alimentos fermentados de origen vegetal representa un enfoque auspicioso y rentable para abordar esta disparidad nutricional [4].

No todas las bacterias son capaces de producir vitamina B12 y, por tanto, es necesario aislar e identificar cepas capaces. Los productores de vitamina B12 identificados en la literatura pertenecen al género *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobac-*

ter, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Xanthomonas* [5], *Propionibacterium* (p. ej., [5,6]), *Acetobacter* [7,8] *Gluconobacter* [8] y *Lactobacillus* (ej., [9,10]). Mientras que los denitrificantes *Pseudomonas* y *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* se utilizan para producciones industriales a gran escala, la investigación sobre biofortificación de alimentos se centra en bacterias del ácido láctico (BAL) y bacterias del ácido propiónico (PAB) [11], principalmente *Propionibacterium freudenreichii* [4]. LAB y *P. freudenreichii* poseen estatus GRAS ("generalmente reconocido como seguro") según la Administración de Alimentos y Medicamentos, por lo que su aplicación es comprensible. Las cepas de *P. freudenreichii* son prototróficas para todos los aminoácidos y nucleótidos [12], lo que significa que los requisitos de medios de fermentación son relativamente simples. El valor de pH preferido de PAB se encuentra entre 6 y 7 [13], y la tolerancia varía hasta pH 5,0 [14]. Como sugiere el nombre, produce el picante propionato, característico de ciertos tipos de queso [15], pero puede no ser deseable en alimentos biofortificados. Las BAL producen ácido láctico, menos picante, como principal producto final metabólico; a menudo son auxótrofos hacia varios aminoácidos y vitaminas [16] y requieren medios de fermentación ricos en nutrientes. El pH óptimo depende de la cepa y oscila entre 5,5 y 6,2 para los lactobacilos y entre 4,5 y 6,5 para la mayoría de las cepas del género *Lactobacillus* [17].

Se utilizan diferentes enfoques para aislar e identificar microorganismos productores de vitamina B12 a partir de matrices complejas o colecciones de cepas, incluidos métodos basados en la composición del medio, la presencia de genes individuales o la medición directa de la vitamina en el medio de fermentación. Lo más común es probar el potencial de crecimiento de los aislados en medios sin vitamina B12 para cultivar cepas de producción potencial de forma selectiva. La hipótesis es que sólo las bacterias pueden crecer en el medio si pueden producir la vitamina. La vitamina B12 funciona como coenzima en varias vías procarióticas, por ejemplo, metionina sintasa dependiente de cobalamina [18], glicerol deshidratasa y etanolamina amoniaco liasa [19].

Sin embargo, como no todas las bacterias dependen de las vías dependientes de cobalamina y existen alternativas independientes de cobalamina [19], esta técnica no es del todo discriminatoria contra los organismos no productores [20]. Este método se aplicó con éxito y se aislaron cuatro cepas de *Lactobacillus* de Nukazuke (pepinillo japonés) [9]; un *Bacillus* sp. cepa de Tua-Noa (soja fermentada sin sal) [21]; y *Lactobacillus lactis*, *Levilactobacillus brevis* y *Pediococcus pentosaceus* de fermentaciones industriales de *Chlorella vulgaris* [22]. La presencia de homólogos de los genes de fusión *bluB/cobT2* [23,24] o del gen *cbiK* [20,25] se han utilizado como marcadores para identificar probables productores de vitamina B12. Esos genes codifican enzimas específicas de la síntesis de cobalamina: las enzimas *BluB* y *CobT2* catalizan la formación del ligando inferior DMBI (5,6-dimetilbencimidazol) de la vitamina B12, así como su activación e incorporación a la molécula de cobalamina [24]. *CbiK* cataliza la incorporación del ion cobalto en la estructura de cobalamina [26]. Bhushan et al. aplicó un método de detección de tres fases (medio libre de vitamina B12, suplementación con cobalto y detección del gen *cbiK*) para aislar lactobacilos de muestras humanas (leche materna y materia fecal) [20]. El cribado dio como resultado dos cepas de *Lactiplantibacillus plantarum*.

Aunque el aislamiento fue exitoso, los autores concluyen que los dos primeros pasos (o lactobacilos) deben ser más selectivos y detectar únicamente el gen *cbiK* para que sea suficiente para identificar cepas prometedoras. Kumari et al. Siguió la identificación monofásica propuesta mediante el gen *cbiK* e identificó tres cepas productoras de vitamina B12 (*Limosilactobacillus reuteri* F2, *Lactiplantibacillus plantarum* V7 y *Lactocaseibacillus rhamnosus* F5) aisladas de muestras fecales infantiles [25]. Hugenschmidt y cols. Se examinaron cepas de PAB y LAB midiendo directamente el contenido de cobalamina de los medios de cultivo mediante HPLC, sin restringir las cepas analizadas utilizando los métodos anteriores [6].

Después de la identificación de los probables productores de vitamina B12, su capacidad de formación de vitamina B12 generalmente se verifica mediante un ensayo microbiológico utilizando *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 (= *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355) [10,21,22] o métodos cromatográficos (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) [23] y cromatografía líquida ultrarrápida con un detector de matriz de diodos (UFLC-DAD) [20]). El ensayo microbiológico de vitamina B12 se basa en esta cepa indicadora auxotrófica de vitamina B12, que se incuba con un volumen de muestra definido en un medio de ensayo sin vitamina B12. El crecimiento del indicador

La cepa, determinada por la densidad óptica (DO), es una medida de la concentración de vitamina B12 presente. En cuanto a la fisiología nutricional, es fundamental considerar la posibilidad de que los microorganismos puedan producir formas de cobalamina que no tienen función fisiológica en los humanos (pseudocobalamina). Sin embargo, en los microorganismos, estos análogos pueden cumplir las mismas propiedades funcionales que la vitamina B12 real [23]. Si bien la cepa indicadora no puede discriminar entre la vitamina B12 activa en humanos y las pseudovitaminas inactivas, los procedimientos cromatográficos como LC-MS/MS permiten la distinción entre las formas [23].

Las formas humanas activas y no activas de vitamina B12 se desvían por su ligando axial inferior. El ligando axial inferior de las pseudovitaminas es la adenina, mientras que el DMBI está presente en la forma activa humana [7,23].

Este estudio tuvo como objetivo aislar e identificar nuevas cepas productoras de cobalamina a partir de productos de fermentación complejos y cultivos mixtos utilizando un medio libre de vitamina B12. El aislado debe ser capaz de producir la vitamina B12 fisiológicamente activa y demostrar tolerancia a valores bajos de pH. La aplicación de biofortificación de alimentos se probó en jugo de manzana para alcanzar concentraciones declarables de vitamina B12 sin necesidad de ajustar el pH ni agregar sustancias promotoras del crecimiento (p. ej., extracto de levadura). El objetivo era una concentración de al menos 1,9 µg de vitamina B12/L, ya que este es el requisito para las declaraciones de propiedades saludables según el Reglamento (CE) n.º 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo (versión del 1 de octubre de 2011).

2. Materiales y métodos

2.1. Medios de cultivo usados para enriquecimiento y

aislamiento mMBA (medio de ensayo microbiano de vitamina B12 modificado): en total, 42,3 g del medio de ensayo microbiano de vitamina B12 (M036, HiMedia, Thane, India) se complementaron con 5 mg/l de cobalto-(II). -cloruro hexahidrato (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) y 5 g/L de glicerol (VWR Chemicals, Darmstadt, Alemania) para el cultivo de enriquecimiento. Antes de esterilizar en autoclave (121 °C, 15 min), se repartieron alícuotas de 9 ml del medio en tubos de cultivo de 12 ml con tapones cónicos. Para las placas de estría, se añadió agar al 1,5%.

PAB (agar Propionibacterium): para el enriquecimiento dirigido de bacterias del ácido propiónico se utilizó medio DSMZ 91 (10,0 g de peptona de caseína, sin vitaminas (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania); 5,0 g de extracto de levadura; 10,0 g de lactato de Na (60 % p/v, ThermoScientific, Geel, Bélgica); y 15,0 g de agar (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) en 1000 ml de H₂O. En un frasco anaeróbico, se incubaron placas de agar en condiciones anaeróbicas utilizando Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemania).

2.2. Muestras

Muestras comerciales de una masa madre (Seitenbacher Natur Sauerteig, Seitenbacher Naturkost, Buchen, Alemania), un jugo de chucrut ("Sauerkrautsaft", dmBio, Karlsruhe, Alemania) y una bebida de pan fermentado ("Original Kanne Brottrunk", Kanne Brottrunk GmbH und Co. Betriebsgesellschaft KG, Selm-Bork, Alemania) se compraron en supermercados locales; se obtuvieron cuatro muestras de leche cruda de granjas lecheras locales (área de Fulda y sus alrededores, Alemania); y se ordenaron cuatro probióticos en línea. Las especies contenidas se enumeran a continuación para los productos individuales; si fueron reclasificadas durante la reorganización taxonómica en 2020 [27], se otorga la nueva designación de especie: • "Symbio Extra RedCare", Shop-Apotheke BV, Sevenum,

Países Bajos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis*; • "OMNi-BiOTiC® 10", APG Allergosan Pharma GmbH, Graz, Austria: *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, Alemania: *B. bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *E. faecio*;

El procedimiento de selección se muestra en la Figura 1. En la primera fase, los productos alimenticios para analizar la presencia de vitamina B12 y mMBA analizaron 100 μ L de la muestra. Se transfirió 1 mL de MRS 10:1 (Carlotto, Karureha, Alemania) y se incubó a 30 °C durante 48 h para romper las células viables. Cuando se detectó vitamina B12, el cultivo se lavó 3 veces en vesícula coloidal, salino 100 μ L de los cultivos resultantes se transfirió en mMBA y se incubó durante 48 h a 30 °C. Si no se detectó vitamina B12, el cultivo MRS de la muestra se descartó.

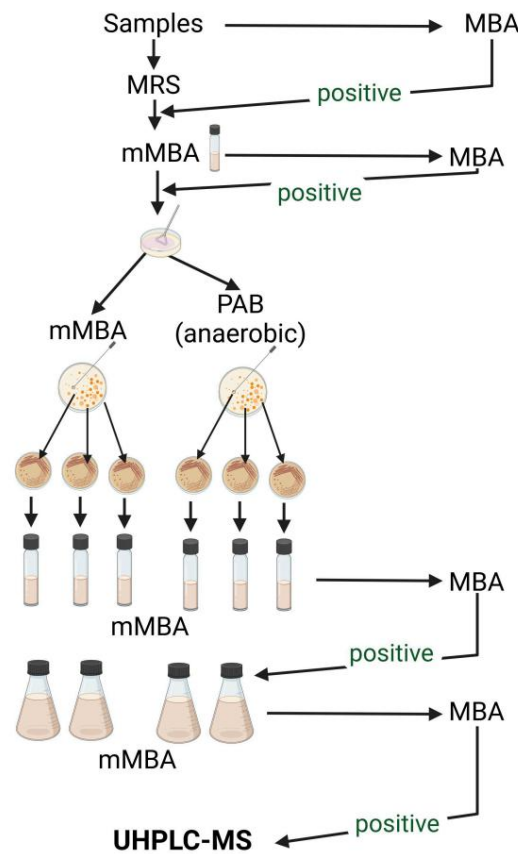


Figura 1. Procedimiento de aislamiento y detección de productores de cobalamina en diferentes muestras de alimentos. Figura 1. Procedimiento de aislamiento y cribado de productores de cobalamina en diferentes muestras de alimentos y probióticos. MBA: ensayo microbiano, PAB: agar Propionibacterium y mMBA: ensayo microbiano modificado. probióticos. MBA: ensayo microbiano, PAB: agar Propionibacterium y mMBA: medio de ensayo microbiano modificado de vit. vitamina B12. Creado con [BioRender.com](https://www.bio-render.com/), consultado el 20 de junio de 2024.

Posteriormente se realizaron cinco subcultivos transfiriendo 100 µL en 9 mL del mMBA después de incubar a 30 °C durante 48–72 h. La última subcultura fue utilizada por el MBA para determinar la presencia de productores de cobalamina en la comunidad microbiana. Lo positivo determinar la presencia de productores de cobalamina en la comunidad microbiana. Las muestras positivas de MBA se extendieron en placas sobre agar mMBA y PAB (incubación anaeróbica) con

diferentes diluciones y se incubaron durante 72 a 96 h a 30 °C. Se sembró en placas un número aleatorio de colonias en el medio respectivo y se incubaron en las mismas condiciones. Se transfirieron colonias individuales de las colonias aisladas al mMBA y se analizó una vez más el crecimiento de la cepa indicadora. Los aislados positivos para cobalamina se cultivaron en 200 ml de mMBA y se sometieron a análisis LC-MS/MS para determinar el nivel de cobalamina presente.

2.4. Preparación de

muestras Para examinar las muestras sólidas (alimentos) y los probióticos, se disolvieron 0,1 g de la muestra o el contenido de una cápsula en 9 ml de solución salina; la siguiente preparación fue idéntica para las muestras disueltas, líquidas y de fermentación.

Parte de la muestra (4 ml) se transfirió a un tubo de centrifuga de color ámbar y se hirvió durante 10 minutos después de agregar 50 µl de KCN al 0,1 % (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania). Este tratamiento rompe las células microbianas; libera cobalamina al espacio extracelular; y lo convierte a su forma más estable, cianocobalamina [1]. Después de la centrifugación a 4000 rpm durante 10 min (Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Alemania), se transfirió 1 ml de sobrenadante a 9 ml del medio de ensayo de vitamina B12, preparado disolviendo 42,3 g/l del medio de prueba (M036, HiMedia, India) bajo calor. Si el sobrenadante estaba turbio después de la centrifugación, la muestra se filtró a través de un filtro de jeringa (0,45 µm, PES 25 mm, WICOM, Heppenheim, Alemania) antes de transferirla al medio de prueba.

Después de esterilizarlas en autoclave (121 °C, 15 min) y enfriarlas, las muestras se inocularon con 50 µL del indicador lavado y diluido.

2.5. Ensayo de vitamina B12 microbiana modificada (MBA)

Para el ensayo de vitamina B12 modificado, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20355 se utilizó como cepa indicadora para determinar la presencia de cobalamina en las muestras, el cultivo mixto y los cultivos aislados secuencialmente. La cepa indicadora se almacena a -80 °C y se reactiva (30 °C, 48–72 h) en 9 ml de caldo de microinóculo, compuesto por 5,0 g de peptona, 2,0 g de extracto de levadura, 10 g de D-(+)-glucosa, 2 g de KH₂PO₄ y 0,1 g de Tween 80 en 1000 ml de agua (todos los componentes de Carl Roth, Karlsruhe, Alemania). Antes de su uso en los ensayos microbiológicos, el cultivo indicador se lavó (4000 rpm, 5 min; Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Alemania) tres veces en solución salina (NaCl al 0,85%, Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) y se diluyó 10- doblar.

Se utilizó un espectrofotómetro (DR6000, Hach Lange, Düsseldorf, Alemania) para medir el crecimiento del indicador a $\lambda = 600$ nm (OD₆₀₀) después de 48 h de incubación a 30 °C. Las muestras con una densidad óptica de al menos el doble del valor en blanco se consideraron positivas para vitamina B12.

2.6. Condiciones de crecimiento y determinación de formas bioactivas de vitamina B12.

Para los análisis LC-MS/MS, los seis aislados se cultivaron en 200 ml de mMBA (inóculo al 1% v/v después del cultivo en tres subcultivos en 9 ml de mMBA) en un matraz Erlenmeyer durante siete días a 30 °C. *Acidipropionibacterium acidipropionici* DSM 20273 se cultivó de forma idéntica a la cepa de referencia. La preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con la literatura [28]. Para ello se añadió 15N-cianocobalamina como patrón interno. El estándar fue preparado y proporcionado por Lenz et al. [28] siguiendo el régimen informado por Wang et al. [29]. Las muestras fueron predigeridas con taka-diastasa de *Aspergillus oryzae* y papaína de látex de papaya (ambas enzimas de Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). La purificación se realizó mediante columnas de inmunoafinidad (EASI-EXTRACT® Vitamina B12; R-Biopharm, Darmstadt, Alemania).

Los autores que describen el método determinaron la distinción entre el activo humano y la pseudovitamina, utilizando un sistema UHPLC (cromatografía líquida de presión ultraalta) acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones [28].

2.7. Identificación de las cepas de producción aisladas Se llevó a

cabo un análisis de los aislados utilizando MALDI-TOF MS (espectros de masas de tiempo de vuelo, ionización y desorción láser asistida por matriz) por DSMZ Services, Leibniz-Institut DSMZ—Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig , Alemania (Colección alemana de cepas de microorganismos y cultivos celulares).

A. orientalis fue descrita inicialmente en 2001 por Lisdiyanti et al. [30]. El tipo de cepa de la especie es 21F-2T (=NRIC 0481T = IFO 16606T = JCM 11195T), aislada de flor de canna. La cepa produce ácido 2-ceto-D-glucónico a partir de glucosa, pero no ácido 5-ceto-D-glucónico ni ácido 2,5-diceto-D-glucónico, y crece entre pH 3,5 y 8,0 [30].

A. malorum fue descrita inicialmente en 2002 por Cleenwerck et al. [31]. El tipo de cepa de la especie es LMG 1746T (=DSM 14337T), aislada de manzana podrida. Produce ácido 2-ceto-D-glucónico a partir de glucosa, pero no ácido 5-ceto-D-glucónico. El pH óptimo oscila entre 4,5 y 7,0 [32].

Los informes sobre las especies *A. orientalis* y *A. malorum* son raros y ninguno está asociado con la síntesis de vitamina B12 . La búsqueda en PubMed de “*Acetobacter orientalis*” arroja 20 resultados, mientras que la búsqueda de “*Acetobacter malorum*” arroja 23 resultados.

2.8. Pruebas de crecimiento de pH bajo en jugo de manzana

La determinación de la capacidad de crecimiento a pH bajo se realizó en jugo de manzana ajustado a diferentes valores de pH (pH 2,85, 3,05, 3,30 (pH original del jugo de manzana), 3,55 y 3,80). Se eligió el jugo de manzana porque es un producto regional que también se consume en todo el mundo y está disponible todo el año a un precio relativamente bajo. Además, el bajo pH inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias y, por lo tanto, es un medio desafiante. Estos valores de pH se seleccionaron para investigar los límites inferiores de la capacidad de crecimiento y el potencial de formación de productos, ya que se esperaba que esto diferenciara las bacterias del ácido acético de las LAB y PAB. El jugo de manzana se compró en un supermercado local (“rio d’oro”, Aldi Süd, Fulda, Alemania) y se ajustó el pH con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania). Antes de esterilizar en autoclave (121 °C, 15 min), se dividieron en alícuotas 30 ml de los jugos de manzana preparados en 100 ml de botellas de vidrio de laboratorio. Las muestras inoculadas se realizaron por triplicado y los blancos por duplicado.

Antes de la inoculación, los cultivos se reactivaron desde el almacenamiento (-80 °C, glicerol) en jugo de manzana suplementado con 5 g/L de extracto de levadura y el pH se ajustó a 5,6 (72 h, 30 °C). Los cultivos reactivados se subcultivaron dos veces con 0,1 L en 9,9 mL de jugo de manzana puro (pH 3,30, 72 h, 30 °C) antes de transferir 300 µL (1%-v/v) a 30 mL del medio de fermentación. Se llevaron a cabo subcultivos del zumo de manzana para permitir la adaptación al bajo valor de pH del zumo de manzana. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 30 °C en un baño de agua con agitación lineal (1083, GFL, Burgwedel, Alemania). La densidad óptica OD600 (DR6000, Hach Lange, Düsseldorf, Alemania), el pH (InLab Flex-Micro y SevenExcellence, Mettler Toledo, Gießen, Alemania) y la concentración de vitamina B12 (MBA) se determinaron después de la incubación.

2.9. Procedimiento de cuantificación mediante ensayo microbiano de vitamina B12 (MBA)

Para la cuantificación se utilizó el medio de ensayo microbiológico B12 de Millipore (B3801, Darmstadt, Alemania) . Se siguió el manual del fabricante, con algunas modificaciones.

En total, se mezclaron 20 mL de las muestras y 50 µL de KCN (1%) con 50 mL de la solución tampón de descomposición (1,29 g de hidrogenofosfato disódico, 1,1 g de ácido cítrico y 1,0 g de metabisulfito de sodio en 100 mL). de agua destilada) antes de esterilizar en autoclave (121 °C, 15 min). Después de enfriar, se ajustó el pH a 6,0 y el volumen se llenó hasta 100 ml con agua. En total, se transfirió 1 ml de la muestra centrifugada (4000 rpm, 10 min) a 5 ml del medio de ensayo y se llenaron hasta 10 ml con agua. Las concentraciones de calibración del estándar de vitamina B12 (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) se establecieron en 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 175 pg/ml.

Antes del lavado, dilución e inoculación, se incubó 1 ml del cultivo indicador. en 9 mL del medio de prueba durante 48 h para agotar el cultivo de cobalamina.

La determinación se realizó por triplicado para las muestras y los estándares. La densidad óptica (OD600) de las muestras se midió frente al agua. La concentración de la muestra se determinó utilizando el gráfico semilogarítmico de la densidad óptica sobre la concentración estándar.

3. Resultados

3.1. Aislamiento de productores de cobalamina

Siete de las dieciséis muestras de productos tuvieron respuestas positivas en el MBA realizado por primera vez (Tabla 1), incluidas todas las muestras de leche (n = 4), la bebida de pan, un probiótico, una muestra de masa madre fermentada en casa , más el control positivo. Al verificar la comunidad microbiana de esas muestras, solo la muestra de masa madre dio positivo en cobalamina.

La eliminación de algunas muestras en la etapa de comunidad microbiana no fue una sorpresa para la mayoría de las categorías de productos.

Tabla 1. Resumen de las muestras seleccionadas positivas y negativas por MBA en las diferentes fases de aislamiento.

Indicador Crecimiento	Número de Productos	Comunidad microbiana	Aisla
Negativo	9	6	15
Positivo	7 L. reuteri DSM 20016	1 (masa madre) L. reuteri DSM 20016	6 L. reuteri DSM 20016

La vitamina B12 de la leche es sintetizada por la microbiota ruminal de la vaca y acumulada en los tejidos [1]. Todavía se discute si la glándula mamaria es un órgano estéril, si los microorganismos en la leche cruda son causados por la contaminación durante el muestreo o si existe un microbioma en la leche [33]. Sin embargo, se ha demostrado que la composición del microbioma del rumen es más diversa y difiere significativamente de los microorganismos de la leche [34]. Se esperaba determinar la cobalamina en la leche, pero no se suponía detectar a los productores responsables. El único probiótico (“Darmflora plus select”) que dio positivo en cobalamina se complementa con 2,5 µg de vitamina B12 por cápsula. El resultado positivo de la comunidad microbiana de la bebida de pan fermentado era de esperar, ya que en la etiqueta del frasco se indica un contenido de vitamina B12 de 1,36 µg/L. La vitamina se produce a partir de masas madre, que no se desactivan en el producto final. Sin embargo, los microorganismos responsables de la formación de vitamina B12 en la bebida de pan no pudieron imponerse en la segunda fase hasta el punto de poder medir la vitamina B12 .

Como sólo la comunidad microbiana de una masa madre fue positiva para la vitamina, sólo se aislaron colonias de estas muestras en placas de agar. Seis de las veintiuna colonias recolectadas al azar fueron positivas durante el análisis MBA y, por lo tanto, fueron identificadas por el DSMZ después de determinar la forma de vitamina B12 presente.

3.2. Identificación de las cepas aisladas EI

análisis de los seis aislados enviados a la DSMZ reveló que cinco aislados son muy similares y pueden asignarse a la especie *Acetobacter malorum*. Por el contrario, el sexto aislado se identifica como *Acetobacter orientalis* HFD 3031. En consecuencia, se supone que los aislados de *Acetobacter malorum* son una única cepa que ha sido aislada varias veces. Por lo tanto, en las siguientes consideraciones se considerará sólo una cepa, *A. malorum* HFD 3141.

3.3. Verificación por LC-MS/MS de la formación de

vitamina B12 Se utilizó LC-MS/MS para determinar la forma de vitamina B12 presente. Los patrones de fragmentación de la vitamina B12 se pueden distinguir claramente de los de la pseudovitamina en espectrometría de masas (Figura 2).

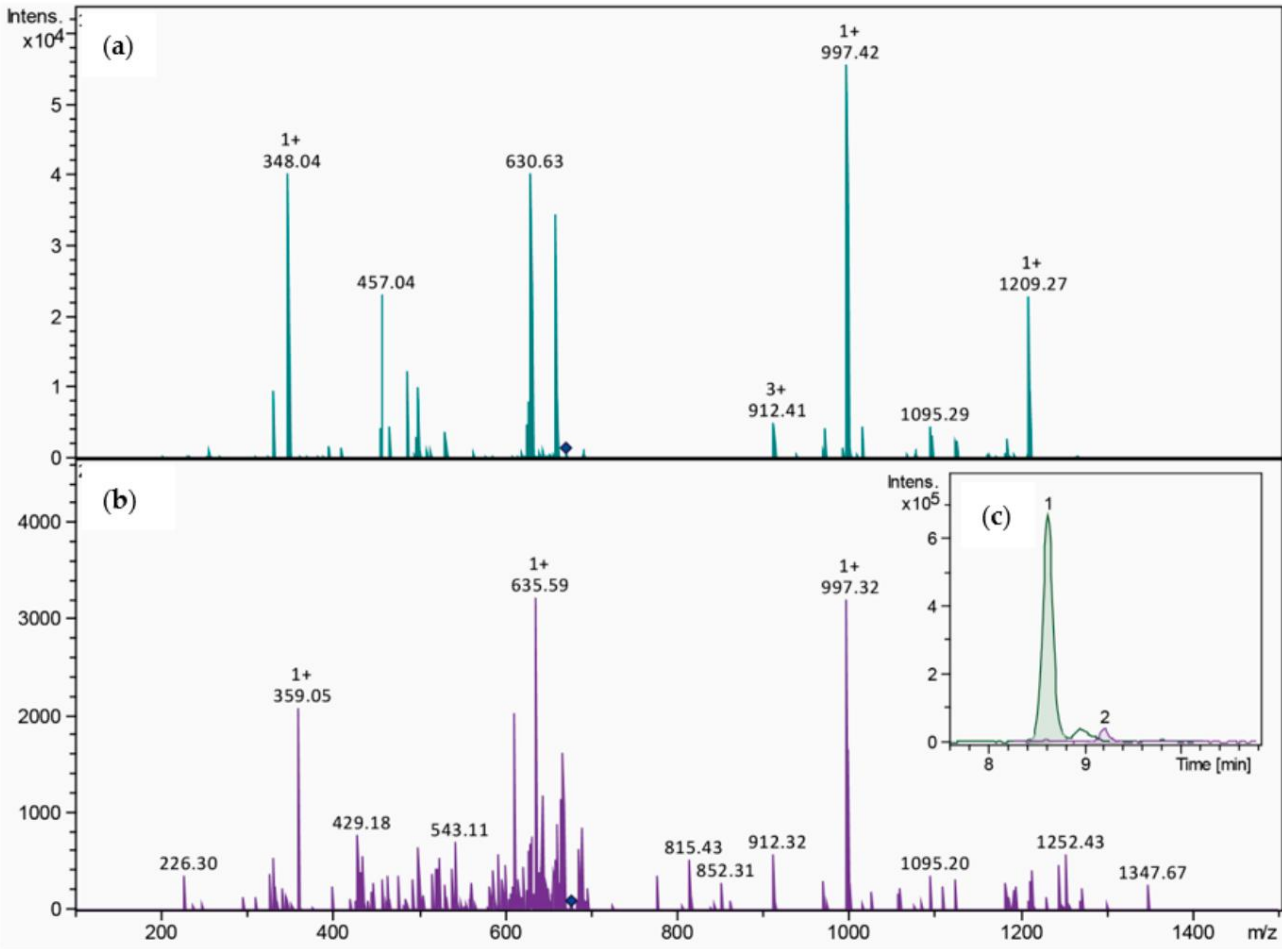


Figura 2. Resultados de LC-MS/MS de *A. acidipropionici* DSM 20273. (a) Patrón de fragmentación de pseudocobalamina que contiene el característico m/z 348,04 (1+) y m/z 359,05 (1+). (b) MS/MS de pseudocobalamina que contiene el característico m/z 359,05. Los rombos marcan el ion padre respectivo de las dos formas de cobalamina de m/z 678,00 (vitamina B12) y m/z 672,20 (pseudocobalamina). (c) EIC de vitamina B12 (m/z 678,00, violeta) y pseudocobalamina (m/z 672,20, verde) con sus diferencias en el tiempo de retención.

Mientras que m/z 997 se puede encontrar en la forma pseudo y activa (Figura 2a,b), la presencia de los iones de fragmentación m/z 348,04 [Ado + azo + PO₃] (pseudocobalamina) y m/z 359,05 [5MB + 42U + azo + PO₃] (vitamina B12) o pseudocobalamina o vitamina B12, como se vio en sus respectivos fragmentos de los iones inferiores [29]. La Figura 2c muestra la característica para pseudocobalamina (pico 1) y vitamina B12 (pico 2) a 9,2 veces más. El pico 1 puede detectarse en un pico de retención de 8,5 min (Figura 3a,b) pero ambos aislados los aislados exhibieron 9,2 min en los EIC. Ni en el EIC. Tampoco se muestra la A. malorum HFD 3141 o A. orientalis HFD 3031 contienen pseudocobalamina. El patrón de fragmentación (Figura A. orientalis HFD 3031) de m/z 678,00 para el DMB tiene m/z 359,05 para el DMB de rango inferior. Tiene, de m/z 678,00, por lo tanto, se ha demostrado que ambos aislados pueden producir vitamina B12, pero no la forma activa de cobalamina determinada por la fermentación.

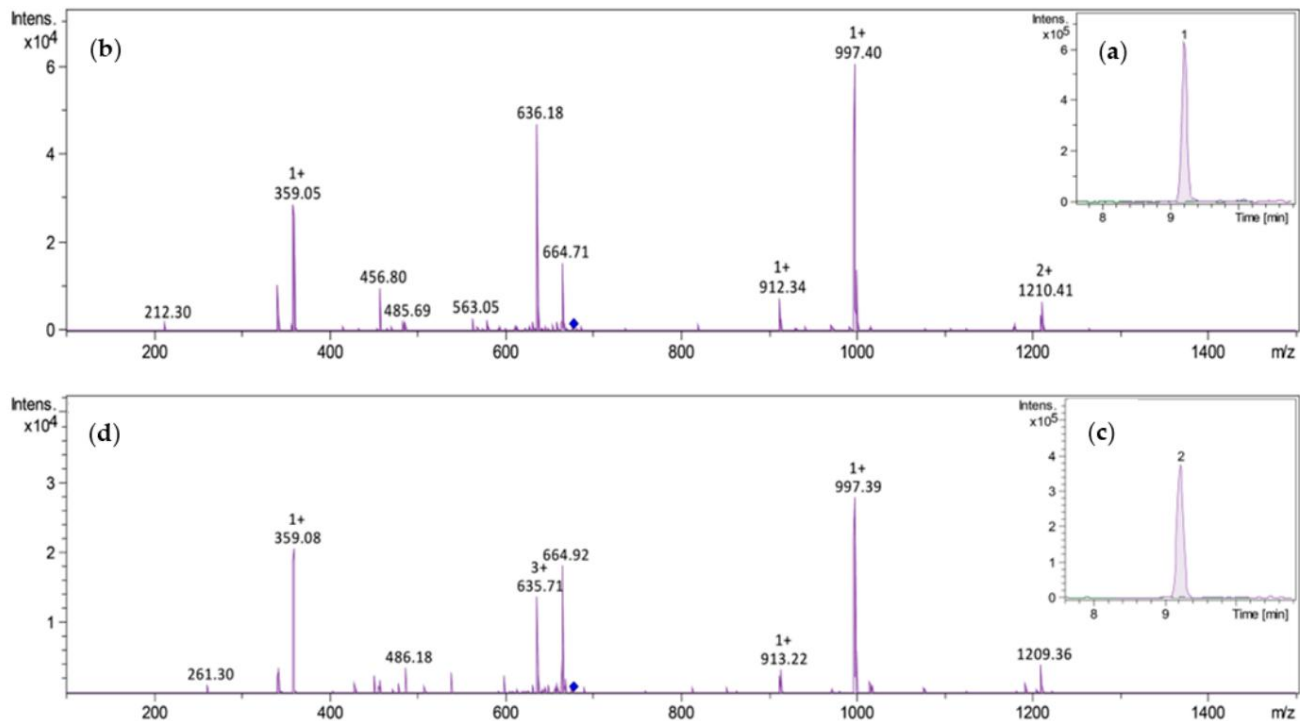


Figura 4. Resultados de LC-MS/MS de los productos de oxidación de la vitamina B12 (m/z 678,00) y pseudo-Figura 3. pseudocobalamina (m/z 672,20) y (b) patrón de fragmentación de la vitamina B12 (púrpura) que contiene caracteres característicos m/z 359,05. Resultados de LC-MS/MS de A. malorum HFD 3141-3141 FIC de vitamina B12 (m/z 678,00) y pseudocobalamina (m/z 672,20), y (d) patrón de fragmentación de vitamina B12 (púrpura) que contiene 678,00) y pseudocobalamina (m/z 672,20), y (d) patrón de fragmentación de vitamina B12 (púrpura) que contiene 678,00) y pseudocobalamina (m/z 672,20). Los rombos marcan el ion original de la vitamina B12 (m/z 678,00), que contiene la característica m/z 359,05. Los rombos marcan el ion original de la vitamina B12 (m/z 678,00).

3.4. Prueba de tolerancia al pH bajo

Los resultados de las pruebas de tolerancia al pH se muestran en la Tabla 2. Los valores de DO600 son correctos. Los resultados de las pruebas de tolerancia al pH se muestran en la Tabla 2. Los valores de DO600 son corregidos por la entrada de turbidez del medio es decir, menos el valor en blanco, y el pH corregido por la absorción de agua por el medio es decir, más el valor en blanco.

A. orientalis HFD 3031 y A. malorum HFD 3141 pueden crecer en un rango de pH de 4 a 9 con una disminución complementaria de aminoácidos o vitamina. La tolerancia a los bajos pH parece ser similar para las dos cepas.

Tabla 2. Efecto del pH inicial sobre el cambio en la DO600, el valor del pH y la concentración de vitamina B12 después siete días:

A. orientalis HFD 3031 A.					A. malorum HFD 3141				
orientalis HFD 3031					A. malorum HFD 3141				
pH inicial		Vitamina B12			Vitamina B12		Vitamina B12		
pH inicial	$\Delta OD600$	ΔpH	$\Delta OD600$	ΔpH	Vitamina B12	$\Delta OD600$	ΔpH	Vitamina B12	
					[$\mu g/L$]	[$\mu g/L$]		[$\mu g/L$]	
2,85	$0,068 \pm 0,24$	$-0,05$	$2,85$	$0,068 \pm$	0,90	$0,35 \pm$		<LOD	
					$0,000 \pm 0,008$	$0,35 \pm 0,008$	$-0,05$	<LOD	
$3,05 \pm 0,193$	$0,42 \pm 0,05$	$3,30$	$0,248 \pm 0,063$		$2,68 \pm 0,92$	$0,059 \pm 0,018$	$2,68 \pm 0,92$	$-0,05$	
3,05			$-0,07 \pm 0,30$	$0,248 \pm$	$0,059 \pm 0,018$	$3,19 \pm 0,13$	$0,069 \pm 0,005$	$-0,08$	$0,89 \pm 0,92$
$0,063 \pm 0,07$	$3,55 \pm 0,349$	$0,064$	$-0,26 \pm 0,355$	$0,349 \pm 0,064$	$3,19 \pm 0,13$	$0,069 \pm 0,005$	$10,29 \pm 0,50$	$-0,08$	$0,89 \pm 0,92$
					$0,088 \pm 0,006$	$10,29 \pm 0,50$	$0,088 \pm$	$-0,18$	$0,21 \pm 0,96$
por debajo del límite de detección (LOD).			$0,33 \pm 0,438$	$0,026 \pm 0,33$	$0,008 \pm 0,18$	$0,23 \pm 0,161$	$0,024 \pm 0,18$	$-0,18$	$0,21 \pm 0,96$
					$\pm 2,33$	$0,181 \pm 0,024$		$-0,22$	$3,81 \pm 1,42$
3,80							$-0,38$	$7,97 \pm 1,56$	$1,56$

* valor por debajo del límite de detección (LOD).

Se observó un ligero aumento en la OD600 a pH 2,85 para *A. orientalis* HFD 3031 y a pH 3,05 para *A. niger* HFD 3141. Como este aumento se produce junto con grandes cantidades de estas variables, las concentraciones de OD600 y vitamina B12, este es el umbral de tolerancia mínima de las respectivas cepas. Por lo tanto, el rango de tolerancia para los dos aislados es 2,85-3,30 respectivamente. Con un valor de pH inicial creciente, aumenta el cambio en la densidad óptica, la caída del pH y la concentración de vitamina B12. El más alto aumenta la densidad óptica, la caída del pH y la concentración de vitamina B12. El mayor crecimiento y síntesis de producto se observó con el valor inicial de pH más alto para ambos y la síntesis del producto se observó al valor inicial de pH más alto para ambos aislados. En

aislados. A un pH de 3,80, *A. orientalis* produce 18,89 µg/L de vitamina B12 y *A. malorum* produce 7,97 µg/L. Se puede suponer un aumento adicional en el crecimiento y la síntesis de vitamina B12 a valores de pH iniciales más altos, ya que el pH óptimo de *Acetobacter* sp. es 5,0–6,5 [35]. La disminución del pH durante la fermentación se produce debido a la probable formación de ácido glucónico a partir de glucosa [30,31]. A pesar de las condiciones de crecimiento desfavorables del jugo de manzana (pH bajo y composición pobre de aminoácidos), ambas cepas pudieron crecer incluso al pH original y producir cantidades considerables de vitamina.

4. Discusión

Se demostró que es viable utilizar un medio libre de vitamina B12 para aislar formadores de cobalamina a partir de productos de fermentación complejos. Aunque los experimentos de enriquecimiento y aislamiento estaban dirigidos a PAB y LAB, se aislaron dos nuevas cepas potentes de vitamina B12 pertenecientes a AAB. Esas cepas fueron identificadas mediante MALDI-TOF MS como *A. malorum* y *A. orientalis*. Sin embargo, la identificación de AAB es particularmente desafiante debido al alto grado de similitud entre las secuencias del gen 16S rRNA de especies estrechamente relacionadas. Wieme et al. (2014) no pudieron distinguir *A. malorum* LMG 1746 de las cepas de *Acetobacter cerevisiae* mediante análisis MALDI-TOF MS [36]. Incluso comparar el ARNr 16S de *A. malorum* y *A. cerevisiae* no es suficiente para identificar claramente estas especies. En consecuencia, en la literatura se recomiendan otros métodos, como la región espaciadora transcrita interna (ITS) entre los genes de ARNr 16S y 23S, para la identificación de AAB. Esta técnica permite diferenciar entre especies estrechamente relacionadas [37]. En consecuencia, es posible que los aislamientos actuales, cuando se identifiquen mediante métodos más adaptados a la BAA, deban reclasificarse. Si se realizaran ensayos similares, el programa de ensayos debería incluir fuentes de alimentos fermentados con ácido acético y medios de fermentación diseñados específicamente para AAB, como el medio designado con pH 3,5 [38]. Aunque el aislamiento y la identificación a través del medio libre de vitamina B12 son viables, es necesario un análisis posterior para determinar la forma de cobalamina presente para excluir la síntesis de pseudocobalamina.

La razón por la que sólo se habían identificado otros dos BAA [7,8] antes de nuestra publicación es que los aislamientos seleccionados se preseleccionan por su género o incluso especie antes de la selección. Los pasos de preselección implican el uso de cepas fácilmente identificadas genotípicamente (PAB y LAB) [6,20], tinción de Gram [9,20,22], apariencia morfológica bajo el microscopio [9,22], actividad catalasa [20,22], y la detección de la formación de ácido láctico y etanol [9]. Los PAB son grampositivos, no móviles, anaeróbicos a aerotolerantes [39] y catalasa positivos. Las BAL son grampositivas, anaerobias facultativas y catalasa negativas [40]. Como los AAB son gramnegativos, catalasa positivos, aerobios obligados y producen ácido acético a partir de la utilización de etanol [41], se filtran previamente. La próxima detección de cepas de AAB fácilmente aisladas o el aislamiento dirigido de matrices alimentarias mediante las estrategias mencionadas anteriormente (por ejemplo, medios libres de vitamina B12 y genes *cbiK* o *bluB/cobT2* como marcadores) probablemente conducirán a la identificación de más productores de cobalamina dentro del grupo de AAB. Lo ideal es que la selección de genes específicos implicados en la síntesis de vitaminas tenga en cuenta las variaciones de secuencia de los homólogos. Se ha demostrado que las variaciones de secuencia en los homólogos tipo *cobU/T* son responsables de la selectividad de diferentes ligandos inferiores incorporados en la cobamida [42–44]. Aunque existe una preferencia generalizada por DMBI, se pueden incorporar otros ligandos inferiores a la cobamida dependiendo del homólogo presente y de las condiciones ambientales [43]. Por lo tanto, si el medio de fermentación o las cepas de producción no aportan DMBI, se pueden formar cobamidas que no cumplen una función de vitamina B12 en humanos. Por lo tanto, el cribado y la identificación basados en la presencia de enzimas específicas de la síntesis de vitamina B12 deben incluir el conocimiento de la síntesis de DMBI y la selectividad de los homólogos.

La biofortificación de alimentos por *Acetobacter* sp. presenta un alto potencial para las fermentaciones alimentarias tradicionales. Dado que las capacidades metabólicas son menos restringidas que las de las BAL, pueden crecer en medios menos ricos en nutrientes, tienen una alta tolerancia al pH bajo y no se detectó pseudocobalamina en nuestras muestras. Estas características califican a *A. orientalis* HFD 3031 y *A. malorum* HFD 3141 para fortificar la vitamina B12 en medios de fermentación.

inadecuado para otros productores. En este trabajo se demostró con éxito su capacidad para crecer y producir vitamina B12 en el jugo de manzana. La concentración de 1,9 µg/L, suficiente para las declaraciones de propiedades saludables, fue superada por *A. orientalis* HFD 3031 (3,19 µg/L) al valor de pH original del jugo de manzana y por *A. malorum* HFD 3141 a pH 3,55 con 3,81 µg/L. Sin embargo, el crecimiento y las concentraciones finales fueron relativamente pequeños y deberían investigarse medidas para aumentar las concentraciones. En experimentos sobre el enriquecimiento de vitamina B12 por *L. reuteri* en furu (tofu fermentado) [25,45] y leche de soja [25], se lograron concentraciones de 141,7 µg/kg de peso húmedo y 132,2 µg/L, respectivamente. Durante la fermentación de agua de coco madura con *L. plantarum* DW12, se pudo alcanzar una concentración de vitamina B12 de 14 µg/ml [46]. Mediante el cocultivo de *P. freudenreichii* y *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, el contenido de vitamina B12 alcanzó hasta 8,93 µg/L en el suero de soja, mientras que en la fermentación de un solo cultivo de *P. freudenreichii* se detectaron 5,72 µg/L [47]. La fermentación de salvado de trigo solubilizado con *P. freudenreichii* dio como resultado la producción de 55 µg/L de vitamina B12 mediante cofermentación con bacterias del ácido láctico y levaduras [48]. En la mayoría de los casos, las concentraciones de vitaminas que alcanzamos son similares a las que se encuentran en la literatura cuando se enriquecen los alimentos, aunque en algunos casos se encuentran niveles significativamente más altos. Pero los experimentos realizados para evaluar la tolerancia al pH de los aislados en el rango bajo indican que aún no se ha alcanzado el potencial máximo para la síntesis de vitamina B12. Se requiere más investigación para determinar el impacto de diferentes parámetros de fermentación, como valores de pH más altos, diferentes tipos de jugo de fruta, temperaturas de fermentación y tasas de aireación, en la síntesis. Los estudios sobre si la adición de precursores (DMBI, riboflavina, nicotinamida, etc.) tienen un efecto promotor similar al del PAB [49] también proporcionarían una visión más profunda de las características de síntesis de las cepas.

La fortificación de alimentos vegetales mediante fermentación puede proporcionar concentraciones relevantes en dietas veganas y vegetarianas. El uso de cepas sin capacidad para producir análogos proporciona una fuente confiable de la forma fisiológicamente activa. Es prometedora la incorporación de *A. malorum* HFD 3141 y *A. orientalis* HFD 3031 en cultivos iniciadores de fermentación, que contienen naturalmente AAB. *Scoby* (kombucha), granos de kéfir (kéfir y kéfir de agua), vinagre madre (vinagre) [50] y masa madre [51] podrían ser ejemplos de la aplicación de las cepas aisladas. Como los BAA ya forman parte de estos procesos de fermentación, las características del producto no deben alterarse drásticamente. Además, se debe comprobar el contenido de vitamina B12 de estos alimentos enumerados fermentados con AA, ya que los datos disponibles en este ámbito se consideran insuficientes.

Este estudio demuestra la necesidad de ampliar la búsqueda de cepas potenciales en la biofortificación de alimentos con vitamina B12. Los autores anteriores se centraron en detectar LAB y PAB por sus capacidades de formación de cobalamina. Nuestros hallazgos, así como los de Bernhardt et al. [7] y Keto et al. [7,8], permiten la conjetura de que es probable descubrir más productores de vitamina B12 dentro del grupo AAB. El aislamiento de más AAB brindará una variedad más amplia de características de producción, como diferentes tipos de alimentos, rendimientos, tolerancia al pH, utilización del azúcar y requisitos nutricionales.

Contribuciones de los autores: Conceptualización, LS; metodología, LS; validación, LS; análisis formal, LS; investigación, LS; recursos, LS; curación de datos, LS; redacción: preparación del borrador original, LS; redacción: revisión y edición, LS, SS y AC; visualización, LS; supervisión, SS y AC; administración de proyectos, SS, AC y LS; adquisición de financiación, N/A. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación no recibió financiamiento externo.

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: No aplicable.

Declaración de disponibilidad de datos: Las contribuciones originales presentadas en el estudio se incluyen en el artículo; más consultas pueden dirigirse a los autores correspondientes.

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. Watanabe, F.; Bito, T. Fuentes de vitamina B12 e interacción microbiana. *Exp. Biol. Medicina*. 2018, 243, 148–158. [\[Referencia cruzada\]](#)
2. Waldmann, A.; Koschitzke, JW; Leitzmann, C.; Hahn, A. Ingestas dietéticas y factores del estilo de vida de una población vegana en Alemania: Resultados del estudio vegano alemán. *EUR. J.Clin. Nutrición*. 2003, 57, 947–955. [\[Referencia cruzada\]](#)
3. Panel de NDA de la EFSA. Opinión científica sobre los valores dietéticos de referencia de cobalamina (vitamina B12). *EFSA J.* 2015, 13, 4150. [\[CrossRef\]](#)
4. Gomes Soares, M.; Bevilacqua, GC; Marcondes Tassi, EM; Reolon Schmidt, VC Alimentos y bebidas fermentados: una posible biofortificación in situ de vitamina B12 : una revisión de la literatura. En t. J. Ciencia de los alimentos. *Nutrición*. 2023, 74, 655–667. [\[Referencia cruzada\]](#)
5. Colmillo, H.; Kang, J.; Zhang, D. Producción microbiana de vitamina B12: una revisión y perspectivas futuras. *Microbio. Hecho celular*. 2017, 16, 15. [\[Referencia cruzada\]](#)
6. Hugenschmidt, S.; Schwenninger, SM; Gnehm, N.; Lacroix, C. Detección de una biodiversidad natural de bacterias de ácido láctico y propiónico para la producción de folato y vitamina B12 en permeado de suero suplementado. En t. Lácteos J. 2010, 20, 852–857. [\[Referencia cruzada\]](#)
7. Bernhardt, C.; Zhu, X.; Schütz, D.; Fischer, M.; Bisping, B. La cobalamina es producida por *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509. *Appl. Microbiol. Biotecnología*. 2019, 103, 3875–3885. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Kato, K.; Hayashi, M.; Kamikubo, T. Aislamiento de coenzima 5,6-dimetilbencimidazolil cobamida como cofactor para el glutamato Formación a partir de *Acetobacter suboxydans*. *Biochim. Biofísica. Acta* 1968, 165, 233–237. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Masuda, M.; Ide, M.; Utsumi, H.; Niino, T.; Shimamura, Y.; Murata, M. Potencia de producción de folato, vitamina B12 y tiamina por bacterias del ácido láctico aisladas de encurtidos japoneses. *Biosci. Biotecnología. Bioquímica*. 2012, 76, 2061–2067. [\[Referencia cruzada\]](#)
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 productor de vitamina B12 , representa una especie metabólicamente versátil dentro del género *Lactobacillus*. *MÁS UNO* 2014, 9, e107232. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Ranaei, V.; Pilevar, Z.; Khaneghah, AM; Hosseini, H. Ácido propiónico: método de producción, estado actual y perspectivas. *Tecnología alimentaria. Biotecnología*. 2020, 58, 115–127. [\[Referencia cruzada\]](#)
12. Falentin, H.; Deutsch, SM; enero, G.; Loux, V.; Thierry, A.; Parayre, S.; Maillard, M.-B.; Dherbécourt, J.; Primo, FJ; Jardín, J.; et al. El genoma completo de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, una actinobacteria resistente con aplicaciones alimentarias y probióticas. *PLoS ONE* 2010, 5, e11748. [\[Referencia cruzada\]](#)
13. Piwowarek, K.; Lipinska, E.; Ha'c-Szyma'nczuk, E.; Kot, AM; Kieliszek, M.; Bonin, S. Uso de la cepa *Propionibacterium freudenreichii* T82 para una biosíntesis eficaz de ácido propiónico y trehalosa en un medio con extracto de orujo de manzana y aguas residuales de patata. *Moléculas* 2021, 26, 3965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Rehberger, JL; Glatz, BA Respuesta de cultivos de *Propionibacterium* al pH ácido y bajo: tolerancia e inhibición. *J. Prot. de Alimentos*. 1998, 61, 211–216. [\[Referencia cruzada\]](#)
15. Thierry, A.; Deutsch, SM; Falentin, H.; Dalmaso, M.; Primo, FJ; Jan, G. Nuevos conocimientos sobre la fisiología y el metabolismo de *Propionibacterium freudenreichii*. En t. J. Microbiol alimentario. 2011, 149, 19–27. [\[Referencia cruzada\]](#)
16. Teusink, B.; Molenaar, D. Biología de sistemas de bacterias del ácido láctico: para la alimentación y el pensamiento. actual. Opinión. *Sistema. Biol.* 2017, 6, 7–13. [\[Referencia cruzada\]](#)
17. König, H.; Berkelmann-Löhnertz, B. Mantenimiento de microorganismos asociados al vino. En *Biología de Microorganismos en Uva, Mosto y Vino*; König, H., Uden, G., Fröhlich, J., Eds.; Springer: Berlín/Heidelberg, Alemania, 2009; págs. 451–468, ISBN 9783540854623.
18. Banerjee, R.; Ragsdale, SW Las muchas caras de la vitamina B12: catálisis mediante enzimas dependientes de cobalamina. Año. *Rev. Bioquímica*. 2003, 72, 209–247. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Shelton, AN; Seth, CE; Mok, KC; Han, AW; Jackson, SN; Haft, DR; Taga, ME Distribución desigual de la biosíntesis de cobamida y su dependencia en bacterias predichas por la genómica comparada. *ISME J.* 2019, 13, 789–804. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Bhushan, B.; Tomar, SK; Mandal, S. Detección fenotípica y genotípica de lactobacilos de origen humano para determinar el potencial de producción de vitamina B12 : validación del proceso mediante microensayo y UFLC. *Aplica. Microbiol. Biotecnología*. 2016, 100, 6791–6803. [\[Referencia cruzada\]](#)
21. Okada, N.; Chettanachitara, C.; Daengsubha, W. Detección de bacterias productoras de vitamina B12 de Tua-Nao en Tailandia. Japón. En t. *Res. Centavo. Agrícola. Ciencia*. 1995, 2, 49–57.
22. Ribeiro, M.; Maciel, C.; Cruz, P.; Darmancier, H.; Nogueira, T.; Costa, M.; Laranjeira, J.; Morais, RMSC; Teixeira, P. Explotación de posibles bacterias probióticas de ácido láctico aisladas de fotobiorreactores de *Chlorella vulgaris* como productoras prometedoras de vitamina B12. *Alimentos* 2023, 12, 3277. [\[CrossRef\]](#)
23. Dudko, D.; Ordeñador, S.; Holtmann, D.; Buchhaupt, M. Identificación de bacterias productoras de vitamina B12 basada en la presencia de Homólogos de bluB/cobT2. *Biotecnología. Letón*. 2023, 45, 563–572. [\[Referencia cruzada\]](#)
24. Deptula, P.; Kylli, P.; Chamlagain, B.; Holm, L.; Kostianinen, R.; Piironen, V.; Savijoki, K.; Varmanen, P. La actividad de la enzima de fusión BluB/CobT2 revela los mecanismos responsables de la producción de la forma activa de vitamina B12 por *Propionibacterium freudenreichii*. *Microbio. Hecho celular*. 2015, 14, 186. [\[Referencia cruzada\]](#)
25. Kumari, M.; Bhushan, B.; Kokkilgadda, A.; Kumar, V.; Beharé, P.; Tomar, SK Biofortificación con vitamina B12 de la leche de soja mediante fermentación optimizada con B12 extracelular que produce aislados de *Lactobacillus* de origen fecal humano. actual. *Res. Ciencia de los alimentos*. 2021, 4, 646–654. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Raux, E.; Termas, C.; Heathcote, P.; Rambach, A.; Warren, MJ Un papel de Salmonella typhimurium cbiK en la cobalamina (vitamina B12) y Biosíntesis de Siroheme. J. Bacteriol. 1997, 179, 3202–3212. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, CMAP; Harris, HMB; Mattarelli, P.; O'Toole, PW; Olla, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. Una nota taxonómica sobre el género Lactobacillus: descripción de 23 géneros novedosos, descripción modificada del género Lactobacillus Beijerinck 1901 y unión de Lactobacillaceae y Leuconostocaceae. En t. J. Sistema. Evolución. Microbiol. 2020, 70, 2782–2858. [\[Referencia cruzada\]](#)
28. Lenz, T.; Maxones, A.; Pichner, R.; Birringer, M. Determinación de vitamina B12 en preparaciones comerciales de pepsina mediante cromatografía de inmunoafinidad y LC-MS/MS. Aplica. Res. 2023, 2, e202200112. [\[Referencia cruzada\]](#)
29. Wang, M.; Asam, S.; Chen, J.; Ehrmann, M.; Rychlik, M. Producción de cuatro cobalaminas marcadas con 15N mediante biosíntesis utilizando Propionibacterium freudenreichii. Frente. Microbiol. 2021, 12, 713321. [\[Referencia cruzada\]](#)
30. Lisdiyanti, P.; Kawasaki, H.; Seki, T.; Yamada, Y.; Uchimura, T.; Komagata, K. Identificación de cepas de Acetobacter aisladas de fuentes indonesias y propuestas de Acetobacter syzygii sp. nov., Acetobacter cibinongensis sp. nov., y Acetobacter orientalis sp. nov. J. Gen. Aplica. Microbiol. 2001, 47, 119–131. [\[Referencia cruzada\]](#)
31. Cleenwerck, I.; Vandemeulebroecke, K.; Janssens, D.; Swings, J. Reexamen del género Acetobacter, con descripciones de Acetobacter cerevisiae sp. nov. y Acetobacter malorum sp. nov. En t. J. Sistema. Evolución. Microbiol. 2002, 52, 1551–1558. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Es-Sbata, I.; Lakhli, T.; Yatim, M.; El-Abid, H.; Belhaj, A.; Hafidi, M.; Zouhair, R. Detección y caracterización molecular de nuevas cepas de Acetobacter malorum termotolerantes y tolerantes al etanol aisladas de dos biomas de frutos de cactus marroquíes. Biotecnología. Aplica. Bioquímica. 2021, 68, 476–485. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Rainard, P. Microbiota mamaria de rumiantes lácteos: ¿realidad o ficción? Veterinario. Res. 2017, 48, 25. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Williamson, JR; Callaway, TR; Lourenço, JM; Ryman, VE Caracterización de la microbiota ruminal, fecal y láctea en lactantes Vacas lecheras. Frente. Microbiol. 2022, 13, 984119. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Gomes, RJ; Borges, MdF; Rosa, MDF; Castro-Gómez, RJH; Spinosa, WA Bacterias del ácido acético en la industria alimentaria: sistemática, características y aplicaciones. Tecnología alimentaria. Biotecnología. 2018, 56, 139–151. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Wieme, AD; Spitaëls, F.; Aerts, M.; de Bruyne, K.; van Landschoot, A.; Vandamme, P. Efectos del medio de crecimiento en los espectros de masas de tiempo de vuelo de desorción-ionización láser asistida por matriz: un estudio de caso de bacterias del ácido acético. Aplica. Reinar. Microbiol. 2014, 80, 1528–1538. [\[Referencia cruzada\]](#)
37. Valera, MJ; Laich, F.; González, SS; Torija, MJ; Mateo, E.; Mas, A. Diversidad de bacterias del ácido acético presentes en uvas sanas de las Islas Canarias. En t. J. Microbiol alimentario. 2011, 151, 105–112. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Yamada, Y.; Hosono, R.; Lisdiyanti, P.; Widyastuti, Y.; Saono, S.; Uchimura, T.; Komagata, K. Identificación de bacterias del ácido acético aisladas de fuentes indonesias, especialmente de aislados clasificados en el género Gluconobacter. J. Gen. Aplica. Microbiol. 1999, 45, 23–28. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. González-García, R.; McCubbin, T.; Navone, L.; Torres, C.; Nielsen, L.; Marcellin, E. Producción microbiana de ácido propiónico. Fermentación 2017, 3, 21. [\[CrossRef\]](#)
40. Amelia, R.; Felipe, K.; Pratama, YE; Purwati, E. Caracterización y potencial probiótico de bacterias de ácido láctico aisladas de Dadiah muestreadas en Sumatra occidental. Ciencia de los alimentos. Tecnología. 2021, 41, 746–752. [\[Referencia cruzada\]](#)
41. Malimas, T.; Thi Lan Vu, H.; Muramatsu, Y.; Yukphan, P.; Tanasupawat, S.; Yamada, Y. Sistemática de las bacterias del ácido acético. En bacterias del ácido acético; Sengun, IY, Ed.; Serie: Serie de biología de los alimentos[Un libro de editoriales científicas; Prensa CRC: Boca Ratón, FL, EE. UU., 2017; págs. 3 a 43, ISBN 9781315153490.
42. Crofts, TS; Seth, CE; Hazra, AB; La estructura de Taga, ME Cobamide depende tanto de la disponibilidad del ligando inferior como de CobT Especificidad del sustrato. Química. Biol. 2013, 20, 1265–1274. [\[Referencia cruzada\]](#)
43. Hazra, AB; Tran, JLA; Crofts, TS; Taga, ME El análisis de la especificidad del sustrato en homólogos de CobT revela una preferencia generalizada por DMB, el ligando axial inferior de la vitamina B12. Química. Biol. 2013, 20, 1275–1285. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Sokolovskaya, OM; Mok, KC; Parque, JD; Tran, JLA; Quanstrom, KA; Taga, ME Selectividad del cofactor en metilmalonil coenzima A mutasa, una enzima modelo dependiente de cobamida. mBio 2019, 10, e01303-19. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Bao, X.; Xiang, S.; Chen, J.; Shi, Y.; Chen, Y.; Wang, H.; Zhu, X. Efecto de Lactobacillus reuteri sobre el contenido de vitamina B12 y la microbiota. Composición de la Fermentación Furu. LWT 2019, 100, 138–143. [\[Referencia cruzada\]](#)
46. Kantachote, D.; Ratanaburee, A.; Hayisama-ae, W.; Sukhoom, A.; Nunkaew, T. El uso del posible probiótico Lactobacillus plantarum DW12 para producir una nueva bebida funcional a partir de agua de coco madura. J. Función. Alimentos 2017, 32, 401–408. [\[Referencia cruzada\]](#)
47. Tindjau, R.; Chua, J.-Y.; Liu, S.-Q. Cocultivo de Propionibacterium freudenreichii y Bifidobacterium animalis subsp. lactis mejora el contenido de ácidos grasos de cadena corta y vitamina B12 en el suero de soja. Microbiol alimentario. 2024, 121, 104525. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Chamlagain, B.; Edelmann, M.; Katina, K.; Varmanen, P.; Piironen, V. Producción de vitamina B12 en extracto de proteína solubilizada de Salvado de Trigo Bioprocesado con Propionibacterium freudenreichii. LWT 2024, 192, 115731. [\[Referencia cruzada\]](#)
49. Chamlagain, B.; Deptula, P.; Edelmann, M.; Karihuoto, S.; Grattepanche, F.; Lacroix, C.; Varmanen, P.; Piironen, V. Efecto de los precursores del ligando inferior sobre la producción de vitamina B12 por propionibacterias de calidad alimentaria. LWT 2016, 72, 117–124. [\[Referencia cruzada\]](#)

50. Yassunaka Hata, NN; Surek, M.; Sartori, D.; Vassoler Serrato, R.; Aparecida Spinosa, W. Papel de las bacterias del ácido acético en los alimentos y Bebidas. *Tecnología alimentaria. Biotecnología*. 2023, 61, 85-103. [\[Referencia cruzada\]](#)
51. Landis, EA; Oliverio, AM; McKenney, EA; Nicolas, LM; Kfoury, N.; Biango-Daniels, M.; Shell, LK; Madden, AA; shapiro, L.; Sakunala, S.; et al. La diversidad y función de los microbiomas iniciadores de masa madre. *Elife* 2021, 10, e61644. [\[Referencia cruzada\]](#)

Descargo de responsabilidad/Nota del editor: Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones son únicamente de los autores y contribuyentes individuales y no de MDPI ni de los editores. MDPI y/o los editores renuncian a toda responsabilidad por cualquier daño a personas o propiedad que resulte de cualquier idea, método, instrucción o producto mencionado en el contenido.