



Production of Vitamin B12 by Propionic Acid Bacteria and Investigation of Effective Parameters[#]

Hayriye Gökür Ağca Küçükaydın^{1,a,*}, Göksel Tırpancı Sivri², Ömer Öksüz^{2,b}

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Kırklareli University, Kırklareli, Türkiye

²Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Tekirdag Namik Kemal University, Tekirdag, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>[#]This study was presented at the 6th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Kütahya, TARGID 2022)</p> <p>Review Article</p> <p>Received : 15.11.2022 Accepted : 21.12.2022</p> <p>Keywords: Vitamin B12 Propionibacterium Postbiotics Cobalamin Probiotics</p>	<p>Propionic acid bacteria (PAB) are extremely important because of the metabolites they produce (vitamins, propionic acid, conjugated linoleic acid, and bioactive peptides). Nowadays, the increasing interest in healthy nutrition has led to the formation of the concepts of probiotics, postbiotics and functionality with studies. Vitamin B12 is one of the postbiotics produced by PAB and is known to be beneficial for human health. Due to its coenzyme feature, it plays a key role in the body process, as well as shows anti-inflammatory properties. The recommended dietary intake of vitamin B12 for adults is 4 µg/day. Although it is highly found in meat products, it is known that the bioavailability of B12 in dairy products is higher. Fermented dairy products, especially products that contain PAB in their natural microflora, are good tools for the production and intake of vitamin B12. In this study, the factors affecting the microbial production of vitamin B12 were examined.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 10(sp1): 2815-2820, 2022

Propiyonik Asit Bakterileri ile B12 Vitamini Üretimi ve Etkili Parametrelerin İncelenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makalesi</i></p> <p>Geliş : 15.11.2022 Kabul : 21.12.2022</p> <p>Anahtar Kelimeler: B12 vitamini Propionibacterium Postbiyotikler Kobalamin Probiyotikler</p>	<p>Propiyonik asit bakterileri (PAB) ürettikleri metabolitler nedeniyle (vitaminler, propiyonik asit, konjuge linoleik asit, biyoaktif peptidler) son derece önemlidir. Günümüzde sağlıklı beslenmeye yönelik olarak günden güne artan ilgi çalışmalarla birlikte probiyotikler, postbiyotikler ve fonksiyonellik kavramlarının oluşmasına neden olmuştur. B12 vitamini PAB'ın ürettiği postbiyotiklerden olup, insan sağlığına faydalı olduğu bilinmektedir. Koenzim özelliği taşımasından dolayı vücutta önemli olaylarda rol oynamasının yanında, antiinflatuar özellik göstermektedir. Yetişkinler için önerilen diyetle B12 vitamini alımı 4 µg/gün'dür. B12 vitamininin hayvansal gıdalarda bulunduğu ve süt ürünlerinde bulunan B12 vitamininin biyoyararlılığının daha fazla olduğu bilinmektedir. Fermente süt ürünleri özellikle PAB'ı doğal mikroflorasında bulunduran ürünler B12 vitamininin üretiminde ve alınmasında iyi birer araç olmaktadır. Bu çalışmada PAB'ın B12 vitamini üretim sürecini etkileyen pH, sıcaklık, havalandırma, inokulum tipi ve oranı gibi faktörler irdelenmiştir.</p>

^a goknuragca@klu.edu.tr
^c ooksuz@nku.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0002-7717-3351>
^d <https://orcid.org/0000-0002-3223-3154>

^e gtirpanci@nku.edu.tr ^f <https://orcid.org/0000-0001-9192-2825>



Giriş

Propiyonik asit bakterileri endüstriyel olarak kullanılmaya başlamaları ile *Pseudomonas* ve *Actinomyces* gibi B12 vitamini üretiminde kullanılan mikroorganizma gruplarının yerini almıştır (Özer ve ark., 2014). Son zamanlarda probiyotiklere olan ilginin artması araştırmacıların propiyonik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri üzerine çalışmalarına neden olmuştur. *Propionibacterium*'un probiyotik etkisi; yararlı metabolitleri ve antimikrobiyal bileşenleri üretme, zararlı bakterilere karşı direnç gösterme, antikarsinojen ve antikolesterolemik etki gösterme ve bağırsak mikroflorasının stabilizasyonuna dayanmaktadır (Mantere-Alhonen, 1995).

Probiyotik taşıyıcı ürünler içinde en büyük oranı yoğurt ve peynir gibi fermente süt ürünleri oluşturmaktadır (Zahed ve ark., 2022). Probiyotik özellik gösteren mikroorganizmaların fermente süt ürünlerine ilavesi fonksiyonel özelliklerini artırırken, süt ise bu mikroorganizmalar için ideal bir besi ortamı yaratmaktadır.

Bu çalışmada propiyonik asit bakterilerinin özellikleri, teknolojik önemleri ve propiyonik asit bakterilerinin önemli bir metaboliti olan B12 vitamini ele alınmıştır. B12 vitamininin mikrobiyal üretimi sürecini etkileyen faktörler incelenmiştir. B12 vitamini üretimine etki eden faktörlerin fazla olması iş yükünü, deney sayısını ve maliyeti arttırmaktadır. B12 üretim sürecini etkileyen faktörlerin taranması ve optimizasyonu araştırma sürecini önemli ölçüde etkilemektedir. Aynı zamanda çok değişkenli biyoteknoloji araştırmalarına önemli katkı sağlayan tarama metodu Plackett-Burman dizaynı irdelenmiştir.

Propiyonik Asit Bakterileri

İlk kez Eduard von Freudenreich, Orl-Jensen ve van Niela tarafından izole edilen ve tanımlanan *Propionibacterium* cinsi bakteriler Gram pozitif ve katalaz pozitif basillerdir. Aynı zamanda spor oluşturmazlar ve 1-5 µm uzunluğa sahiptirler (Piwowarek ve ark., 2018).

Propiyonik asit bakterileri, elde edildiği kaynağa göre deri kökenli ve klasik olmak üzere iki ana gruptan oluşur. Deri kökenli grup insanlar için birincil patojenler olarak kabul edilirken, klasik PAB peynirlerin olgunlaşma süreci başta olmak üzere gıda ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Meile ve ark., 2008). PAB'ın teknolojik açıdan sağladığı faydaların en önemlileri karbon kaynağı olarak laktöz ve laktatları kullanabilmeleri, gıdalar için koruyucu özelliklere sahip bileşikler (propiyonik asit, asetik asit ve bakteriyosinler vb.) üretebilmeleri, aroma ve tat bileşenlerini sağlamalarıdır (Guan ve ark., 2015). Çizelge 1'de süt ve süt ürünleri kaynaklı *Propionibacterium* cinsi bakteriler ve izolasyon kaynakları verilmektedir.

PAB'lar B12 vitamini üretme yetenekleri ile de dikkat çekmektedirler. Bu nedenle laboratuvar çalışmaları dışında endüstriyel olarak takviye ve farmasötik tüketim için kullanılmaktadır (Calvillo ve ark., 2022). B12 vitamini üretiminde PAB'dan yararlanılmaktadır. *Propionibacterium freudenreichii* B12 vitamini üreten mikroorganizmalar arasında GRAS (generally recognized as safe) statüsüne sahip tek bakteridir. Bazı suşlarının probiyotik özellikleri bulunmaktadır (Altieri, 2016).

B12 üretiminde kullanılan *Propionibacterium* suşları şu şekildedir: *Propionibacterium acidipropionici* DSM 8250, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* DSM 20270, *P.*

freudenreichii subsp. *shermanii* OLP-5, *P. freudenreichii* NCIB 1081, *P. shermanii* FRDC Pr1, *P. shermanii* PZ-3, *P. freudenreichii* CICC 10019 (Massoud ve ark., 2018).

Emmantel veya diğer İsviçre tipi peynirlerin olgunlaştırılmasında PAB büyük rol oynamaktadır (Bücher ve ark., 2021). PAB aktivitesi sonucu ortaya çıkan propiyonik asit, asetik asit, diasetil, asetoin, asetaldehit, propiyonaldehit, prolin tat ve aroma oluşumuna; CO₂ oluşumu ise istenen gözenekli yapının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Kılıç, 1992). *P. freudenreichii* yağ hidrolizindeki rolü ile Emmental peyniri veya diğer İsviçre tipi peynirlerin olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaktadır. *P. freudenreichii* tarafından salgılanan yüzey aktif esteraz süt yağını hidrolize edebilmektedir. Serbest yağ asitlerinin oluşumu peynirde olgunlaşmayı sağlamaktadır (Erdoğan ve ark., 2012). Ülkemize özgü bir peynir olan, Balıkesir-Bursa bölgesinde yoğun olarak üretilen Mihaliç peynirinde de karakteristik tat-aroma ve gözenek oluşumunda propiyonik asit bakterileri önemli rol oynamaktadır (Tırpanci Sivri & Öksüz, 2019).

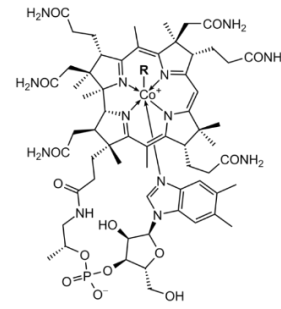
Çizelge 1. Süt ve süt ürünleri kaynaklı propiyonik asit bakterileri (Özer ve ark., 2014)

Table 1. PAB isolates from diverse dairy products

Türler	İzolasyon kaynağı
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Çiğ süt İsviçre peynirleri Diğer süt ürünleri
<i>Propionibacterium jensenii</i>	Süt ürünleri Silaj Enfeksiyonlar
<i>Propionibacterium thoenii</i>	Emmental peyniri Diğer süt ürünleri
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Süt ürünleri
<i>Propionibacterium cyclohexanicum</i>	Bozulmuş portakal suyu
<i>Propionibacterium coccoides</i>	Süt ve taze peynir

B12 Vitamini

B12 vitamini (kobalamin) suda çözünen ve merkezinde kobalt iyonu bulundurduğundan tek metalloprotein olan vitamindir (H. Wang ve ark., 2019). Şekil 1'de B12 vitamininin kiyasal yapısı yer almaktadır.



Şekil 1. B12 vitamininin kimyasal yapısı (Gröber ve ark., 2013)

Figure 1. Chemical structure of vitamin B12

B12 vitamini yapısında bulunan R grubunun hidroksil grubu (OH-) olması durumunda hidroksikobalamin, glutatyonil (GS) grubu olması durumunda glutatyonilkobalamin, siyanid (CN) grubu olması durumunda siyanokobalamin, metil grubu (CH₃) olması durumunda metilkobalamin ve 5'-deoksiadenozin grubu olması durumunda ise deoksiadenozilkobalamin olmak üzere farklı şekillerde isimlendirilir (Özkanay Yörük, 2020). Hidroksikobalamin, glutatyonilkobalamin ve siyanokobalamin inaktif formlar olmasının yanında B12 vitamininin aktif formları için prekürsör olma özelliği taşımaktadır (Uzun, 2021).

B12 vitamininin vücutta protein, yağ ve karbonhidrat metabolizması, sinir sisteminin normal fonksiyonları ve kırmızı kan hücrelerinin oluşumu gibi önemli görevleri vardır (Repossi ve ark., 2017). İnsan hücreleri tarafından sentezlenemeyen B12 vitamini esansiyeldir ve dışarıdan alınması gerekmektedir (Sezgin, 2019).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) yetişkinler için günlük diyetle birlikte alınması gereken B12 vitamini alımı 4 µg/gün olarak tavsiye etmektedir. Hamilelik ve laktasyon süresince yeterli miktarın daha fazla olması tavsiye edilmektedir (Rampazzo ve ark., 2022). Karaciğer, et, yumurta, balık ve süt ürünleri B12 vitamini kaynaklarıdır. Süt ve süt ürünlerinin B12 vitamini içeriği etten daha düşük olsa da, süt ürünlerindeki B12 vitamininin biyoyararlılığı daha yüksektir (Gille & Schmid, 2015; Xu ve ark., 2020).

Türkiye'de B12 vitamini eksikliği yaygın olarak görülen bir halk sağlığı problemidir (Yazan Şahan & Erdoğan Mergen, 2019). Kadınlardaki B12 vitamini eksikliği erkeklere göre üç kat daha fazla görülmektedir (Uzun, 2021). Beslenme yetersizliği, metabolik bozukluklar ve emilim bozukluğu B12 vitamini eksikliğine ve ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Öncel Van, 2022). B12 vitamini eksikliği aneminin yaygın bir nedenidir. Aynı zamanda nörolojik, gastrointestinal, psikiyatrik, kardiyovasküler, dermatolojik ve nöropsikiyatrik hastalıklara neden olabilmektedir (Oh & Brown, 2003).

Endüstriyel ölçekte B12 vitaminin kimyasal sentezinin teknik açıdan zorlayıcı ve ekonomik olarak maliyetinin yüksek olması nedeniyle üretim mikrobiyal fermentasyon ile yapılmaktadır (Martens ve ark., 2002). B12 vitamini üretme yeteneği olan başka mikroorganizmalar olmasına rağmen, *P. freudenreichii*, B12 vitamininin aktif formunu sentezleyebilmesi ve GRAS statüsünde kullanılan tek mikroorganizma olması nedeniyle öne çıkmaktadır (Piwowarek ve ark., 2018).

Son yıllarda fermentasyon yoluyla gıda ürünlerinde B12 vitamini düzeyinin artırılmasına yönelik çalışmalar artmıştır. Bu nedenle B12 vitamini üretim şartlarının iyileştirilmesi elzemdir.

B12 Vitamini Üretimini Etkileyen Faktörler

pH ve Sıcaklık

Propiyonik asit bakterilerinin gelişimi çeşitli ortam şartlarından etkilenmektedir. Bunların başında ise sıcaklık ve pH gelmektedir. Sıcaklık ve pH'ı kontrol etmek, fermentasyon işleminin verimliliğini arttırmada iki önemli faktördür.

Propionibacterium türlerinin büyümesi için uygun ortam pH 6 - pH 7 aralığındayken, gelişim için minimum pH 4,6'dır (Ahmadi ve ark., 2017). Süt ürünlerinde PAB herhangi mevcut ortam asitliğinde B12 vitamini üretebilmektedir.

Coral ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada *P. acidipropionici* ile propiyonik asit üretiminin optimum olduğu sıcaklık değeri 30°C, biyokütle artışının optimum olduğu değer ise 36°C olarak belirlenmiştir (Coral ve ark., 2008). Hedayati ve diğer araştırmacıların yaptığı çalışmada B12 vitamini üretimi için optimum sıcaklık değerinin 38,3°C olduğu ancak, bu sıcaklık değerinin altında PAB gelişimi ile artan biyokütle artışının B12 vitamininin üretimini desteklediği görülmüştür (Hedayati ve ark., 2020).

Besi Ortamına Eklenen Ve Gelişimi Destekleyici Bileşenler

B12 vitamini üretimini ortamdaki amino asitler ve bileşikler etkilemektedir. Azot kaynağının ortamda yer alması biyokütleyi ve B12 vitamini üretimini etkilemektedir (Santos ve ark., 2009). PAB için amino asitler, protein hidrolizatları gibi organik azot kaynakları iyi birer stimüle edici faktördür.

Kosmider ve diğer araştırmacılar tarafından *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ile B12 vitamini üretimi optimizasyonu üzerine yapılan çalışmada kalsiyum pantotenat, NaH₂PO₄·2H₂O, FeSO₄·7H₂O ve kazein hidrolizatın B12 vitamini üretimini önemli derecede artırıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür (Koşmider ve ark., 2012).

Marwaha ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada 11 farklı amino asitin *Propionibacterium shermanii* 566 ile B12 vitamini üzerine en iyi sonuçların glutamik asit başta olmak üzere L-lösin ve L-fenilalanin ile alındığı görülmektedir. Bunun yanında L-aspartik asit, glisin ve L-lisinin gelişimi biyokütle ve B12 vitamini artışını inhibe ettiği görülmektedir (Marwaha ve ark., 1983).

Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

PAB tarafından üretilen B12 vitamini miktarına fermentasyon süresince kullanılan karbon kaynağının da etkisi vardır. Wang ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada *Propionibacterium freudenreichii* ile B12 vitamini üretilirken çeşitli kütle oranlarında (1:1, 1,5, 2, 2,5, ve 3) gliserol-glikoz karşımları kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre gliserol-glikoz oranındaki artış propiyonik asit verimini artırsa da B12 üretimini düşürmüştür. En iyi sonuçlar B12 vitamini için 1:2,5 kütle oranında 0,37 mgL⁻¹ olarak kaydedilmiştir. Bu değer yalnızca gliserol ya da yalnızca glikoz olan ortamda elde edilen sonuçlardan daha yüksektir (P. Wang ve ark., 2014). Liu ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada ise glukoz (40 gL⁻¹) ve glisin (2 gL⁻¹) kullanımının B12 vitamini düzeyini artırdığı görülmektedir (Liu ve ark., 2021).

Tuz Oranı

Mikroorganizmalar ortamda bulunan tuz oranına bağlı olarak gelişebilmekte veya gelişmeleri önlenmektedir (İrkin, 2017). *P. shermanii* ile pH 6,8 ve pH 5,6'da yapılan çalışmada, tuz konsantrasyonunun pH 6,8'de 10 gL⁻¹ ile 60

gL^{-1} arasında olduğunda büyüme oranının tuzsuz kontrol ortamından daha fazla olduğu görülmüştür. pH 5,6'da da benzer sonuçlar elde edilmiştir. pH 5,6'da $10 gL^{-1}$ ile $70 gL^{-1}$ arasında tuzlu ortamda 48 saatlik inkübasyon sonunda bakteri sayıları 4,5 log artmıştır. Tuz içermeyen kontrol ortamında ise mikroorganizma sayısı başlangıçtan 3,5 log daha yüksektir. Tuz konsantrasyonunun artmasıyla ($90-100 gL^{-1}$) mikrobiyal gelişim olmadığı ancak canlılığın devam ettiği görülmüştür (Marshall ve ark., 1995).

Buna göre *P. shermanii*'nin gelişiminin ortamın tuz konsantrasyonuna bağlı olarak etkilendiği görülmektedir. Tuzlu ve tuzsuz ortamda gelişim gösterebildiği ve canlı kalabildiğinden tuz toleransının olduğunu söylemek mümkündür.

İnokulum Tipi ve Oranı

İnokulum tipi, mikroorganizmanın cins, tür ve suşuna bağlı olarak B12 vitamini üretimi üzerine etkilidir. Van Wyk ve diğer araştırmacıların yaptığı çalışmada farklı *P. freudenreichii* suşları ile B12 vitamini üretimi yapılmıştır. Çalışmada en yüksek üretim olan, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* J15'in ürettiği B12 vitamini miktarı $68,05 \mu g 100 mL^{-1}$ 'dir. Farklı suşların ürettiği B12 vitamini miktarlarının arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür (van Wyk ve ark., 2011).

İnokulum oranı B12 üretiminde verimi etkileyen bir faktördür. İnokulum oranının yeterli miktardan az ya da fazla olması mikrobiyal üretimi etkilemektedir. Örneğin inokulum oranının belirli bir seviyeden az olması adaptasyon sürecinin uzamasına neden olurken; fazla olması ise şeker tüketiminin artmasına ve hücre birikmesine neden olmaktadır. B12 vitamini fermentasyonunda ideal inokulum oranı fermentasyon hacminin yaklaşık %1 ila %5'i kadar olmalıdır (Massoud ve ark., 2018).

Fermentasyon Süresi

Fermentasyon süresi boyunca mikroorganizmaların gelişimi ortamda artan metabolitler nedeniyle etkilenmektedir. Madhu ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada *Lactobacillus plantarum* ile B12 vitamini mikrobiyal fermentasyonla üretiminde en yüksek B12 vitamini düzeyine 96. saat sonunda ulaşıldığı görülmüştür (Madhu ve ark., 2010). B12 vitamini üretimini fermentasyon süresi uzadıkça ortamda PAB'ın ürettiği metabolitlerin birikmesi nedeniyle azalmaktadır.

Havalandırma

Propionibacterium cinsi bakteriler, vitamin B12'yi etkili bir şekilde üretmek için hem anaerobik hem de aerobik koşullara ihtiyaç duyarlar. PAB'lar fakültatif anaerob olmasına rağmen oksijene karşı toleransları yüksektir (de Assis ve ark., 2022).

Ye ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada anaerobik ve aerobik koşulların avantajından yararlanmak için fermentasyon dönüştürümlü şartlar altında uygulanmıştır. Bu şekilde B12 vitamini üretimi anaerobik fermentasyon ile üretilene kıyasla 2 kat artırılabilir. Aerobik fermentasyon 6 saatten fazla uygulandığında sitokrom sentezi üzerindeki oksijenin inhibisyonu nedeniyle hücre gelişimini olumsuz etkilemektedir. Diğer yandan çözünmüş oksijen konsantrasyonunun düşük olduğu ($0,5-1 ppm$) durumda ise propiyonik asit tüketimini artırdığından

ve asetat üretimini düşürdüğünden hücre gelişimine avantaj sağlar. Dönüştürümlü olarak uygulanan havalandırma şartları B12 vitamini üretimini artırmaktadır (Ye ve ark., 1996).

En Etkili Faktörlerin Belirlenmesi

B12 vitamini üretimini ile ilgili yapılan çalışmalarda gerek deney sayılarını düşürmek gerekse maliyeti ve iş yükünü azaltmak için deney tasarımlarından yararlanılmaktadır (Hedayati ve ark., 2020). Deney tasarımı tarama adımı ve Yanıt Yüzey Metodu olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Tarama metodunda optimizasyon parametrelerinin belirlenmesi gerçekleştirilirken, Yanıt Yüzey Metodu ile proses optimizasyonun hassasiyeti sağlanmaktadır (Zahed ve ark., 2022).

Plackett-Burman, deney planı oluşturulurken önemli parametrelerin seçilmesinde kullanılan bir tarama yöntemidir (Plackett & Burman, 1946). Propiyonik asit bakterilerinin B12 vitamini üretim sürecini birçok faktör etkilemektedir. Önemli parametrelerin seçimi, deneylerin maliyetinin, sayısının ve iş yükünün indirgenmesi ile çalışmalarda önemli bir basamaktır.

Hajfarajollah ve diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada atık ayçiçek yağı ile oluşturulan ortamda, B12 vitamini üretimini önemli derecede etkileyen parametreler Plackett-Burman dizayn ile belirlenmiş ve etkili parametrelerin seviye optimizasyonları için yanıt yüzey metodundan yararlanılmıştır. Etkili 4 parametre (dimetilbenzimidazolil (DMB), kobalt klorür ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), demir sülfat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ve kalsiyum klorür ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)) ile oluşturulan modele göre optimize edilmiş ortamda, orijinal ortama göre %170 daha yüksek bir nihai vitamin konsantrasyonu sağlanmaktadır (Hajfarajollah ve ark., 2015).

Khosravi-Darani ve diğer araştırmacıların yaptığı çalışmada sütlü fermente içecek üretimi boyunca 11 proses değişkeninin B12 vitamini üretimine etkisi Plackett-Burman tasarımı ile araştırılmıştır. B12 vitamini üretimi için en uygun koşullar, *Propionibacterium freudenreichii* içeren kültür ile hacimce %5 inokulum ve $25 gL^{-1}$ melas içeren ortamda $36^\circ C$ 'de, fermentasyon boyunca ortama saatte 0,04 g laktöz beslenerek, pH 6,5'te, 96 saat fermentasyondan sonra sağlanmıştır (Khosravi-Darani ve ark., 2019). Plackett-Burman tasarımı çok değişkenli biyoteknoloji tarama araştırmalarında son derece kullanışlıdır.

B12 vitamini üretiminde etkili olabilecek faktörler incelendiğinde tarama metodunun kullanılması tavsiye edilmektedir.

Sonuç

Propionibacterium ürettiği postbiyotikler nedeniyle son derece önemlidir. Özellikle metaboliti olan B12 vitamini Türkiye'de eksikliği yaygın olarak görülen bir vitamindir (Yazan Şahan & Erdoğan Mergen, 2019). *Propionibacterium* cinsi bakterilerin ürün oluşmasında etkin olduğu fermente süt ürünleri, B12 vitamini düzeyinin artırılmasına yönelik çalışmalara iyi bir araç olma potansiyeli taşımaktadır. Bu çalışmada propiyonik asit bakterilerinin kültür koşullarını etkileyen faktörlere ve B12

vitaminine yönelik olarak yapılan uygulamalarına değinilmiştir. B12 vitamini üretimi üzerine etkili olan faktörler araştırılarak en etkili parametrelerin optimizasyonu ile B12 üretimi maksimize edilebilir ve bu koşullar fermente süt ürünlerine uygulanabilir.

Kaynaklar

- Ahmadi N, Khosravi-Darani K, Mortazavian AM. 2017. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electronic Journal of Biotechnology* (C. 28, ss. 67-75). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.04.004>
- Altieri C. 2016. Dairy propionibacteria as probiotics: recent evidences. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(172). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2118-0>
- Bücher C, Burtscher J, Domig KJ. 2021. Propionic acid bacteria in the food industry: An update on essential traits and detection methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4299-4323. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12804>
- Calvillo Á, Pellicer T, Carnicer M, Planas A. 2022. Bioprocess strategies for vitamin B12 production by microbial fermentation and its market applications. *Bioengineering*, 9(8), 365. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9080365>
- Coral J, Karp SG, Porto De Souza Vandenberghe L, Parada JL, Pandey, A, Soccol CR. 2008. Batch fermentation model of propionic acid production by propionibacterium acidipropionici in different carbon sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), 333-341. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8196-1>
- de Assis DA, Machado C, Matte C, Ayub MAZ. 2022. High cell density culture of dairy *Propionibacterium* sp. and *Acidipropionibacterium* sp.: A review for food industry applications. *Food and Bioprocess Technology* 2021 15:4, 15(4), 734-749. <https://doi.org/10.1007/S11947-021-02748-2>
- Erdoğan A, Baran, A, Atasever M. 2012. Peynirde mikrobiyel lipolizin oluşumu ve lezzet gelişimine katkısı. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 7(3), 211-219.
- Gille D, Schmid A. 2015. Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutrition Reviews*, 73(2), 106-115. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu011>
- Gröber U, Kisters K, Schmidt J. 2013. Neuroenhancement with Vitamin B12—underestimated neurological significance. *Nutrients* (C. 5, Issue 12, ss. 5031-5045). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu5125031>
- Guan N, Zhuge X, Li J, Shin H dong, Wu J, Shi Z, Liu L. 2015. Engineering propionibacteria as versatile cell factories for the production of industrially important chemicals: advances, challenges, and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* (C. 99, Issue 2, ss. 585-600). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6228-z>
- Hajfarajollah H, Mokhtarani B, Mortaheb H, Afaghi A. 2015. Vitamin B12 biosynthesis over waste frying sunflower oil as a cost effective and renewable substrate. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3273-3282. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1383-x>
- Hedayati R, Hosseini M, Najafpour GD. 2020. Optimization of semi-aerobic vitamin B12 (cyanocobalamin) production from rice bran oil using *Propionibacterium freudenreichii* PTCC1674. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101444>
- İrkin R. 2017. Farklı tuz konsantrasyonlarının beyaz peynirlerdeki starter kültür bakterilerinin canlılıklarına etkisi. *Akademik Gıda*, 308-314 <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.345276>
- Khosravi-Darani K, Zarean S, Ahmadi N, Hadian Z, Mortazavian AM. 2019. Fed batch production of a fermented beverage containing vitamin b12. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 38(2), 183-192.
- Kılıç, S. (1992). Peynir ungunlaştırmada propiyonik asit bakterilerinin kullanımı. *Gıda Dergisi*, 17(3), 207-211.
- Kośmider A, Białas, W, Kubiak, P, Drodzyńska A, Czaczyk K. 2012. Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Bioresour Technol*, 105, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.074>
- Liu J, Liu Y, Wu J, Fang H, Jin Z, Zhang D. 2021. Metabolic profiling analysis of the vitamin B12 producer *Propionibacterium freudenreichii*. *Microbiology Open*, 10(3), e1199. <https://doi.org/10.1002/MBO3.1199>
- Madhu AN, Giribhattanavar P, Narayan MS, Prapulla SG. 2010. Probiotic lactic acid bacterium from kanjika as a potential source of vitamin B12: Evidence from LC-MS, immunological and microbiological techniques. *Biotechnology Letters*, 32(4), 503-506. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0176-1>
- Mantere-Alhonen S. 1995. Propionibacteria used as probiotics: A review. *Lait* (C. 75).
- Marshall DL, Odame-Darkwah JK, Marshall DL. 1995. Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Bacillus pumilus*, and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media. *Lebensm.oWiss. u.-Technol* (C. 28).
- Martens JH, Barg H, Warren M, Jahn D. 2002. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 275-285. <https://doi.org/10.1007/S00253-001-0902-7>
- Marwaha SS, Sethi RP, Kennedyt JF. 1983. Role of amino acids, betaine and choline in vitamin B12 biosynthesis by strains of *Propionibacterium* medium). *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 454-456.
- Massoud R, Khosravi-Darani K, Golshahi M, Sohravandi S, Mortazavian AM. 2018. Assessment of process variables on vitamin B12 production in fermented dairy product including propionic acid. *Current Nutrition & Food Science*, 16(2), 155-161. <https://doi.org/10.2174/1573401315666181204105601>
- Meile L, le Blay, G, Thierry A. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.019>
- Oh RC, Brown DL. 2003. Vitamin B12 deficiency clinical manifestations of Vitamin B12 deficiency (C. 67, Issue 5). www.aafp.org/afp
- Öncel Van T. 2022. B12 vitamini ölçümünde makroproteinlerin etkisi; yüksek B12 vitamini düzeylerinin polietilen glikol (PEG) ve heterofil antikor blokan tüp ile çalışılması. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- Özer E, Yerlikaya O, Kesenkaş H. 2014. Propiyonik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri. *Electronic Journal of Food Technologies*, 9(2), 54-62.
- Özkanay Yörük H. 2020. Vitamin D, vitamin B12, folat ve ferritin parametrelerinin biyolojik varyasyonu. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- Piowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Kieliszek M, Ścibisz I. 2018. *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* (C. 102, Issue 2, ss. 515-538). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8616-7>
- Plackett RL, Burman JP. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325. <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>
- Rampazek G, Zironi E, Pagliuca G, Gazzotti T. 2022. Analysis of cobalamin (vit B12) in ripened cheese by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Foods*, 11(18), 2745. <https://doi.org/10.3390/foods11182745>
- Reposi A, Zironi E, Gazzotti T, Serraino A, Pagliuca G. 2017. Vitamin B12 determination in milk, whey and different by-products of ricotta cheese production by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Italian Journal of Food Safety*, 6(4), 152-155. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2017.6795>
- Santos F, Teusink B, Molenaar D, van Heck M, Wels M, Sieuwerts S, de Vos WM, Hugenholtz J. 2009. Effect of amino acid availability on vitamin B12 production in *Lactobacillus reuteri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 3930-3936. <https://doi.org/10.1128/AEM.02487-08>
- Sezgin Y. 2019. Approach to vitamin B12 deficiency. *Konuralp Tıp Dergisi*, 482-488. <https://doi.org/10.18521/kt.d.591971>
- Tirpanci Sivri G, Öksüz Ö. 2019. Identification of *Propionibacterium* spp. isolated from mihalıç cheeses by MALDI-TOF MS. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 16(2), 244-250. <https://doi.org/10.33462/jotaf.526431>
- Uzun, Y. 2021. Vitamin B12 Eksikliği ile Tam Kan Sayımı Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi .
- van Wyk J, Witthuhn RC, Britz TJ. 2011. Optimisation of vitamin B12 and folate production by *Propionibacterium freudenreichii* strains in kefir. *International Dairy Journal*, 21(2), 69-74. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2010.09.004>
- Wang H, Shou Y, Zhu X, Xu Y, Shi L, Xiang S, Feng X, Han J. 2019. Stability of vitamin B12 with the protection of whey proteins and their effects on the gut microbiome. *Food Chemistry*, 276, 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.033>

- Wang P, Jiao Y, Liu S. 2014. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 12(12), 1811-1815. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1513-5>
- Xu NN, Yang DT, Zhang BX, Liu JX, Ye JA, Ren DX. 2020. Short communication: Influence of intramuscular injection of vitamin B12 in early-lactation dairy cows on Mozzarella cheese quality and vitamin B12 stability. Journal of Dairy Science, 103(11), 9835-9840. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18568>
- Yazan Şahan T, Erdoğan Mergen B. 2019. A case of B12 deficiency diagnosed at a primary care outpatient clinic. Türkiye Aile Hekimliği Dergisi, 23(1), 42-45. <https://doi.org/10.15511/tahd.19.00142>
- Ye K, Shijo M, Jin S, Shimizu K. 1996. Efficient production of vitamin from propionic acid bacteria under periodic variation of dissolved oxygen concentration. Journal of Fermentation and Bioengineering, 82(5), 484-491.
- Zahed O, Khosravi-Darani K, Mortazavian AM, Mohammadi A. 2022. Effects of cultivation conditions on biofortification of yogurt with natural folate by *Propionibacterium freudenreichii*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 39, 102267. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.102267>