

# Proizvodnja vitamina B12 pomoću *Pseudomonas denitrificans* uz prihranjivanje betainom

---

Nušinović, Emina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:730517>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno – biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Emina Nušinović**

**6791/BT**

**PROIZVODNJA VITAMINA B<sub>12</sub> POMOĆU *Pseudomonas denitrificans*  
UZ PRIHRANJIVANJE BETAINOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**MODUL:** Tehnologija vitamina i hormona

**MENTOR:** Izv. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

**Zagreb, 2015.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno – biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Završni rad

### PROIZVODNJA VITAMINA B<sub>12</sub> POMOĆU *Pseudomonas denitrificans*

#### UZ PRIHRANJIVANJE BETAINOM

Emina Nušinović, 6791/BT

**Sažetak:** Vitamin B<sub>12</sub> je crven higroskopan kristaličan prah, bez okusa i mirisa, topljiv u vodi i alkoholu. Pripada skupini korinoida, a danas se najčešće za vitamin B<sub>12</sub> koristi naziv cijanokobalamin. Za razliku od drugih vitamina topljivih u vodi, vitamin B<sub>12</sub> se pohranjuje i može se dugo zadržati u našem organizmu. Važan je faktor rasta, ima ulogu u regeneraciji folata, metabolizmu aminokiselina, proteina i masti, važan je i za normalno funkcioniranje živčanog sustava, a njegov nedostatak može uzrokovati makrocitnu anemiju. Vitamin B<sub>12</sub> proizvode mikroorganizmi (*Propionibacterium freudenreichii* i *Pseudomonas denitrificans*), a glavni izvor ovog vitamina su namirnice životinjskog podrijetla. S obzirom da se betain pokazao kao važan spoj za biosintezu vitamina B<sub>12</sub>, u ovom radu su prikazani rezultati proizvodnje vitamina B<sub>12</sub> pomoću *Pseudomonas denitrificans* uz prihranjivanje betainom. Na osnovu rezultata određivanja učinaka tri ispitana raspona koncentracija betaina, razvijen je pristup prihranjivanja betainom u rasponu 5-7 g/L tijekom 50-140 sati fermentacije, što se pokazalo učinkovitim i ekonomičnim za proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> pomoću *Pseudomonas denitrificans* u fermentoru volumena 120m<sup>3</sup>.

**Ključne riječi:** vitaminB<sub>12</sub>, *Pseudomonas denitrificans*, betain, prihranjivanje

**Rad sadrži:** 28 stranica, 4 slike, 4 tablice, 25 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf formatu) pohranjen u:** Knjižnici

Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

**Rad predan:** Rujan, 2015.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food technology and Biotechnology**  
**Undergraduate study Biotechnology**  
**Department of Bioengineering**  
**Laboratory for Cell Technology and Biotransformation**

**Final work**

### **PRODUCTION OF VITAMIN B<sub>12</sub> BY *Pseudomonas denitrificans* WITH BETAINE FEEDING**

Emina Nušinović, 6791/BT

**Abstract:** Vitamin B<sub>12</sub> is red hygroscopic crystalline powder that is tasteless, odourless, and soluble in water and alcohol. It belongs to a group of compounds called corinoids and the most common name used to denote vitamin B<sub>12</sub> is cyanocobalamin. Unlike other water-soluble vitamins, vitamin B<sub>12</sub> is stored and may stay in the body for long periods of time. It is an important growth factor, plays a role in the regeneration of folate and in the metabolism of amino acids, proteins and fats, it is important for the normal functioning of the nervous system, and its deficiency can cause macrocytic anemia. Vitamin B<sub>12</sub> is produced by the microorganisms (*Propionibacterium freudenreichii* and *Pseudomonas denitrificans*), and the main source of this vitamin are foods of animal origin. Since betaine has been showed as an important compound in the biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub>, this paper presents the results of the production of vitamin B<sub>12</sub> by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding. Based on the results of the determination of the effects of the three tested betaine concentration ranges, betaine feeding approach was developed, in the range 5-7 g / L for 50-140 hours of fermentation, which proved to be efficient and cost-effective for the production of vitamin B<sub>12</sub> by *Pseudomonas denitrificans* in a 120-m<sup>3</sup> fermenter.

**Key words:** vitamin B<sub>12</sub>, *Pseudomonas denitrificans*, betaine, feeding

**Thesis contains:** 28 pages, 4 figures, 4 tables, 25 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in:** Faculty of Food Technology and Biotechnology library, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Ph.D. Višnja Gaurina Srček, Associate Professor

**Thesis delivered:** September, 2015

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Struktura i svojstva vitamina B<sub>12</sub></b> .....	2
2.1.1. Struktura vitamina B <sub>12</sub> .....	2
2.1.2. Svojstva vitamina B <sub>12</sub> .....	4
<b>2.2. Metabolizam vitamina B<sub>12</sub></b> .....	4
2.2.1. Apsorpcija .....	4
2.2.2. Prijenos.....	5
2.2.3. Stanični metabolizam .....	6
2.2.4. Pohranjivanje.....	6
2.2.5. Izlučivanje .....	6
<b>2.3. Uloga vitamina B<sub>12</sub></b> .....	7
2.3.1. Regeneracija folata (vitamin B <sub>9</sub> ) .....	7
2.3.2. Metabolizam aminokiselina, proteina i masti.....	8
2.3.3. Normalno funkcioniranje živčanog sustava .....	8
2.3.4. Stvaranje stanica.....	9
<b>2.4. Izvori vitamina B<sub>12</sub></b> .....	9
2.4.1. Hrana .....	9
2.4.2. Dodaci prehrani i obogaćivanje hrane.....	11
<b>2.5. Toksičnost vitamina B<sub>12</sub></b> .....	12
<b>2.6. Nedostatak vitamina B<sub>12</sub> u organizmu</b> .....	13
2.6.1. Povezanost vitamina B <sub>9</sub> i vitamina B <sub>12</sub> .....	13
2.6.2. Megaloblastična anemija.....	14
2.6.3. Neurološki simptomi .....	14
2.6.4. Uzroci nedostatka vitamina B <sub>12</sub> .....	15
2.6.4.1. Nedovoljan unos hranom .....	15
2.6.4.2. Malapsorpcija .....	15

<b>3. METODOLOGIJA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Proizvodnja vitamina B<sub>12</sub> pomoću <i>Pseudomonas denitrificans</i> .....</b>	<b>17</b>
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	17
3.1.2. Hranjivi mediji .....	17
3.1.3. Fermentacija u tikvicama .....	17
3.1.4. Fermentacija u fermentoru volumena 120 m <sup>3</sup> .....	18
3.1.5. Određivanje mase suhe tvari .....	18
3.1.6. Određivanje sadržaja vitamina B <sub>12</sub> u bujonu.....	18
3.1.7. Određivanje sadržaja δ-aminolevulinske kiseline (ALA) u bujonu .....	19
3.1.8. Određivanje sadržaja betaina u bujonu .....	19
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>20</b>
4.1. Učinak betaina na rast stanica <i>Pseudomonas denitrificans</i> i biosintetu vitamina B <sub>12</sub> .....	20
4.2. Učinak betaina na procese fermentacije s <i>Pseudomonas denitrificans</i> .....	21
4.3. Prihranjivanje betainom tijekom proizvodnje vitamina B <sub>12</sub> u fermentoru volumena 120 m <sup>3</sup> .....	21
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>26</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>27</b>

## **1. UVOD**

Vitamin B<sub>12</sub> pripada skupini korinoida, spojeva čiju osnovu čini korin, no postoje i drugi korinoidi koji nemaju vitaminsku aktivnost. Sam naziv vitamin B<sub>12</sub> se odnosi na skupinu kemijski sličnih spojeva sa sličnom biološkom aktivnosti, a uključuje cijanokobalamin, hidroskobalamin, 5-deoksiadenozilkobalamin (kraće, adenzilkobalamin) i metilkobalamin. Cijanokobalamin je oblik vitamina B<sub>12</sub> koji se nalazi u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani, a adenzilkobalamin, metilkobalamin i hidroskobalamin se nalaze u hrani, dok se potonji također dodaje u farmaceutske pripravke i dodatke prehrani.

U ljudi, vitamin B<sub>12</sub> je potreban za tri enzimske reakcije, od kojih je jednoj potreban vitamin B<sub>12</sub> u obliku metilkobalamina, a druge dvije u obliku adenzilkobalamina. Enzimi kojima je potreban adenzilkobalamin su metilmalonil-CoA mutaza i leucin aminomutaza, a enzimu metionin sintetazi je potreban metilkobalamin. Leucin aminomutaza je enzim koji katalizira pretvorbu, odnosno izomerizaciju leucina i  $\beta$ -leucina. Vitamin B<sub>12</sub> proizvode mikroorganizmi, a glavni izvor ovog vitamina su namirnice životinjskog podrijetla. Izvori vitamina B<sub>12</sub> u hrani su: meso i mesni proizvodi, jetra, perad, riba (posebno losos), škampi, školjkaši (posebno kamenice i Jakobove kapice) i jaja (posebno u žumanjku) te u nešto manjim količinama mlijeko i mliječni proizvodi (sir, jogurt).

S obzirom da su postupak i cijena proizvodnje vitamina B<sub>12</sub> kemijskim sintezama kompleksni i skupi, veliki broj mikroorganizama kao što su *Propionibacterium freudenreichii* i *Pseudomonas denitrificans* uspješno se koriste za komercijalnu proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> (Martins i sur., 2002.; Roman, 2001.). *Pseudomonas denitrificans* se koristi u industrijskoj proizvodnji vitamina B<sub>12</sub> zbog brzog rasta i visoke produktivnosti. Iako je dosta napora uloženo u razumijevanje biosinteze vitamina B<sub>12</sub>, postoji relativno malo informacija o učincima betaina na proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> pomoću *Pseudomonas denitrificans*, a što je prikazano u ovom završnom radu.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. STRUKTURA I SVOJSTVA VITAMINA B<sub>12</sub>

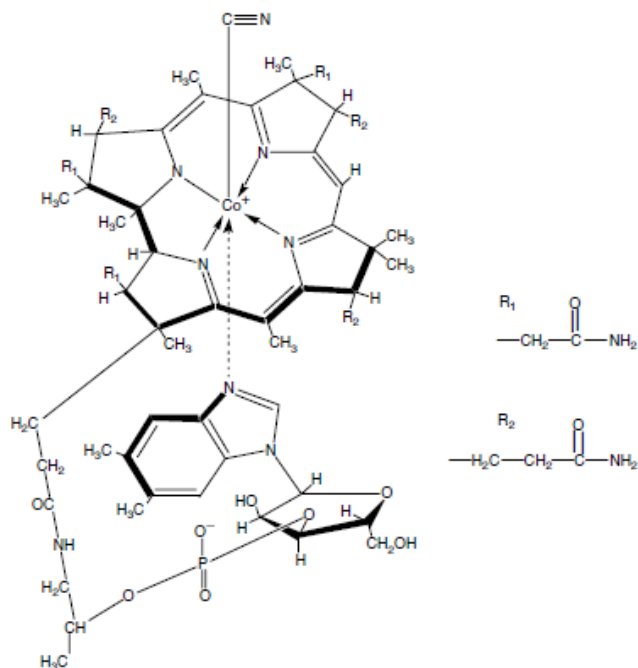
Vitamin B<sub>12</sub> pripada skupini korinoida, spojeva čiju osnovu čini korin, no postoje brojni drugi korinoidi koji nemaju vitaminsku aktivnost. Struktura vitamina B<sub>12</sub> zapravo slični strukturi porfirina, koju sadrže i hem, klorofil te citokrom, a naziv kobalamin se odnosi na spojeve koji imaju kobaltov atom u središtu korinske jezgre. Sam naziv vitamin B<sub>12</sub> se odnosi na skupinu kemijski sličnih spojeva sa sličnom biološkom aktivnosti, a uključuje cijanokobalamin, hidroskobalamin, 5-deoksiadenozilkobalamin (kraće, adenzilkobalamin) i metilkobalamin. Cijanokobalamin je oblik vitamina B<sub>12</sub> koji se nalazi u farmaceutskim pripravcima i dodacima prehrani, a adenzilkobalamin, metilkobalamin i hidroskobalamin se nalaze u hrani, dok se potonji također dodaje u farmaceutske pripravke i dodatke prehrani. Identificirano je još nekoliko kobalamina, uključujući glutationilkobalamin, sulfitokobalamin i nitritokobalamin, no njihova fiziološka uloga još nije točno poznata.

### 2.1.1. Struktura vitamina B<sub>12</sub>

Osnovu molekule cijanokobalamina čini makrociklička jezgra korina, zbog čega se često ova skupina spojeva nazivaju korinoidi (Slika 1). Korin je gotovo planaran makrociklički prsten koji se sastoji od 4 međusobno povezana reducirana pirolna prstena (A, B, C i D), a kobaltov se atom u njegovu središtu može pojaviti u tri različita oksidacijska stanja (I, II, III).

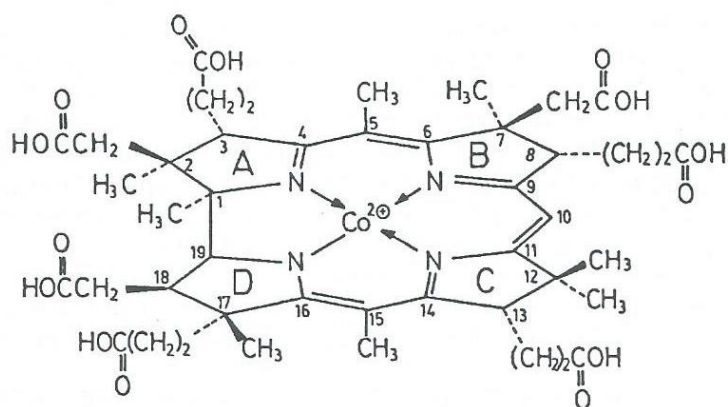
Atom kobalta nastojao se ukloniti iz jezgre ili zamijeniti nekim drugim metalnim ionom uz zadržavanje vitaminske aktivnosti, ali bez uspjeha. Zamjena atoma kobalta sa bakrom, niklom, željezom, manganom i rodijem provedena je u bakterijama, ali korinoidi nisu imali biološku aktivnost bez prisutnosti kobalta. Sposobnost atoma kobalta da na β - položaju može vezati različite skupine, dajemolekuli vitamina B<sub>12</sub> niz različitih kemijskih i bioloških karakteristika.

Metilenski mostovi povezuju pirolne prstene, točnije, A i B, B i C te C i D, dok su A i D povezani direktno. Četiri od šest koordinacijskih mjesta zauzimaju dušici korinskog prstena te jedan dušik dimetilbenzimidazolnog pokrajnjeg lanca. Šesto mjesto mogu zauzeti razni ligandi: cijano skupina (CN<sup>-</sup>), hidroksilna skupina (OH<sup>-</sup>) ili H<sub>2</sub>O (ovisno o pH), metilna skupina (-CH<sub>3</sub>), deoksiadenozilna skupina (5-deoksiadenozin), tvoreći redom cijanokobalamin, hidroskobalamin, akvakobalamin, metilkobalamin i adenzilkobalamin. Drugi dušik 5,6-dimetilbenzimidazola je vezan za ribozu, koja veže i fosfat, čime je ovaj nukleotid povezan s jednim od sedam amidnih skupina korinskog prstena.



**Slika 1.** Struktura cijanokobalamina

Heptakarboksilna kiselina koja nastaje iz cijanokobalamina pregradnjom amino skupina u karboksilne naziva se **kobirinska kiselina**, heksakarboksilna kiselina bez nukleotidnog dijela u kojoj su svi amidni dijelovi osim propanolamida pregrađeni u karboksilne skupine **kobinska kiselina**, a oblik u kojem su sve amidne skupine u nepromijenjenom obliku naziva se **kobinamid** (Slika 2). Heksakarboksilna kiselina koja sadrži ribozu-3-fosfat i gdje su primarne amidne skupine pregrađene u karboksilne naziva se **kobamna kiselina**, a struktura u kojoj su umjesto karboksilne skupine karbamido skupine **kobamid**.



**Slika 2.** Struktura kobinamida

### **2.1.2. Svojstva vitamina B<sub>12</sub>**

Vitamin B<sub>12</sub> je crven higroskopan kristaličan prah, bez okusa i mirisa, topljiv u vodi i alkoholu, a netopljiv u acetonu, kloroformu i eteru. Pri sobnoj temperaturi stabilan je u području pH 4-7, nepostojan je na svjetlosti te optički aktivan (ima 9 kiralnih centara). U kiselom ili bazičnom mediju brzo se razgrađuje, a također ga razgrađuju i jaki oksidansi, reducenski te  $\gamma$ -zračenje. Svi oblici kobalamina se pod utjecajem svjetla i uz prisustvo cijanida pretvaraju u cijanokobalamin. Cijanokobalamin (cijanokob(III)alamin) kristaličan je higroskopan crveni prah, bez mirisa, topljiv u vodi i nižim alkoholima, fenolu i ostalim hidrosiliranim otapalima, a netopljiv je u acetonu, kloroformu, eteru i većini ostalih organskih otapala. Vodene otopine cijanokobalamina su neutralne te stabilne na zraku pri sobnoj temperaturi, ako su zaštićene od svjetla. Naime, pod utjecajem svjetlosti, cijano skupina disocira s cijanokobalaminom te nastaje hidroksokobalamin, koji se u neutralnim i kiselim otopinama javlja u obliku akvakobalamina. Hidroksokobalamin ima jak afinitet prema cijanidnom ionu te koristi kao antidot pri trovanju cijanidom. Također, ovaj oblik vitamina B<sub>12</sub> se lakše pretvara u aktivne oblike nego cijanokobalamin. Adenozilkobalamin i metilkobalamin se lako oksidiraju u hidroksokobalamin u prisutnosti svjetla.

## **2.2. METABOLIZAM VITAMINA B<sub>12</sub>**

### **2.2.1. Apsorpcija**

Kobalamini iz hrane se prvo trebaju osloboditi iz proteina za koje su vezani. Oslobađaju se pod utjecajem želučanog proteolitičkog enzima pepsina i klorovodične kiseline koja se nalazi u želucu. Slijedi vezanje vitamina B<sub>12</sub> za R protein, koji se nalazi u slini i želučanim sokovima. Vezanje vitamina B<sub>12</sub> za R protein se može dogoditi i prije otpuštanja ovog vitamina s proteina. Uz navedeno, R proteini, koji se još nazivaju i kobalofilini ili haptokorini, štite vitamin B<sub>12</sub> od djelovanja bakterija. U duodenumu, R proteini se hidroliziraju uz pomoć proteaza gušterače (tripsin) te se oslobađa slobodan kobalamin. Tada, nakon otpuštanja s R proteina, svi oblici vitamina B<sub>12</sub> se vežu na unutarnji (intrinzični) faktor, glikoprotein kojeg sintetiziraju želučane parijetalne stanice i koji ne podliježe kataboličkom djelovanju proteaza. Naime, vezanjem vitamina B<sub>12</sub> mijenja se konformacija unutarnjeg faktora čime se znatno povećava otpornost na proteolizu. R proteini vežu širok spektar analoga kobalamina, dok unutarnji faktor veže samo razne vitamere vitamina B<sub>12</sub>, ali ne i ostale korinoide, npr.

kobamide i kobinamide. Zatim kompleks unutarnjeg faktora i kobalamina putuje iz duodenuma u ileum, gdje receptori za vitamin B<sub>12</sub>, kubilini, omogućavaju apsorpciju vitamina B<sub>12</sub> u ileumu. Pretpostavlja se da se apsorpcija kompleksa kubilina, unutarnjeg faktora i vitamina B<sub>12</sub> u enterocite odvija endocitozom uz pomoć receptora. Također se pretpostavlja da se poseban protein, megalin, veže na kompleks i ima ulogu u njegovom prijenosu u stanice. Unutar enterocita, vitamin B<sub>12</sub> se otpušta s kompleksa lizosomalnom proteolizom te se veže na transkobalamin II koji ga prenosi u portalnu krv. Većina vitamina B<sub>12</sub> se apsorbira na opisani način, no između 1 % do 3 % apsorbira se pasivnom difuzijom i to pri farmakološkim dozama, 30 g i više. Općenito se apsorbira između 11 % i 65 % ukupno unešenog vitamina B<sub>12</sub>, s tim da se smanjuje količina apsorbiranog vitamina s povećanjem količine unešenog vitamina. Također, količina apsorbiranog vitamina B<sub>12</sub> je ograničena brojem receptora za unutarnje faktore, a manji dio inaktivnih analoga vitamina B<sub>12</sub> apsorbira se pasivnom difuzijom.

### **2.2.2. Prijenos**

Poznata su tri proteina na koje se vitamin B<sub>12</sub> veže nakon apsorpcije, a nazivaju se transkobalamin I, II i III. Transkobalamini se sintetiziraju u nekoliko tkiva, uključujući crijeva i jetru, a prenose vitamin B<sub>12</sub> do jetre, bubrega, slezene, srce, pluća i tankog crijeva. Transkobalaminu II je primarna funkcija prijenos vitamina B<sub>12</sub>, a transkobalamin I je uključen u skladištenje ovog vitamina i onemogućuje bakterije da koriste vitamin B<sub>12</sub>. Transkobalamin III omogućuje uspješno funkcioniranje mehanizma povratka vitamina B<sub>12</sub> iz perifernih tkiva u jetru, ali i sudjeluje u procesima rješavanja drugih korinoida bez vitaminske aktivnosti. Takvi korinoidi se izlučuju u žuč, vezani za kobalofiline, ali se ne reapsorbiraju. Metilkobalamin čini 60 % do 80 %, a adenzilkobalamin do 20 % ukupne količine kobalamina u krvi. Ostali oblici vitamina B<sub>12</sub> koji se mogu naći u krvi su cijanokobalamin i hidroksokobalamin, a skoro svi oblici su vezani za transkobalamine. Točnije, oko 20 % kobalamina je vezano za transkobalamin II, a ostatak za transkobalamin I. Sva tkiva imaju posebne receptore za transkobalamin II, za koje se veže kompleks transkobalamin II i vitamin B<sub>12</sub>, koji onda ulazi u stanice endocitozom. Lizosomi razgrađuju transkobalamin II čime se vitamin B<sub>12</sub> oslobađa, u obliku hidroksokobalamina, i podliježe metaboličkim pretvorbama u aktivne oblike.

### **2.2.3. Stanični metabolizam**

Da bi bio metabolički aktivan, vitamin B<sub>12</sub> se mora pretvoriti u svoje aktivne oblike, a pretvorba se većinom događa u jetri, ali i u bubrezima. Većina kobalamina u ljudi se javlja u dva osnovna aktivna oblika, adenzilkobalamin i metilkobalamin. Hidroksokobalamin, koji je ušao u stanice, se pretvara direktno u metilkobalamin, reakcijom metilacije, u citoplazmi ili u adenzilkobalamin u mitohondriju, dvostupanjskom reakcijom, uz pomoć flavoprotein reduktaze i adenziltransferaze. U stanici, vitamin B<sub>12</sub> djeluje kao kofaktor dvaju važnih metaboličkih reakcija, jedne u citosolu, a jedne u mitohondriju. U citosolnoj reakciji, vitamin B<sub>12</sub>, u obliku metilkobalamina, je potreban za folat-ovisnu metilaciju homocisteina, pri čemu nastaje metionin, uz pomoć metionin sintaze. U mitohondriju, vitamin B<sub>12</sub> je, u obliku 5-deoksiadenzilkobalamina (kraće, adenzilkobalamina) potreban enzimu metilmalonil CoA mutazi. Ovaj enzim katalizira pretvorbu metilmalonil CoA u sukcinil CoA.

### **2.2.4. Pohranjivanje**

Za razliku od drugih vitamina topljivih u vodi, vitamin B<sub>12</sub> se pohranjuje i može se dugo zadržati u našem organizmu. Između 2 i 5 mg ovog vitamina se skladišti u organizmu od čega oko 75% u jetri. Manje količine vitamina su nađene u mišićima, kostima, bubrezima, srcu, mozgu i slezeni. Oblik vitamina B<sub>12</sub> koji je najčešći je adenzilkobalamin (70%), a predstavlja glavni oblik skladištenja ovog vitamina. Metilkobalamin je glavni oblik vitamina B<sub>12</sub> koji se nalazi u krvi, koji se također, uz hidroksokobalamin, skladišti, ali u manjim količinama. Prosječna količina skladištenog vitamina B<sub>12</sub> u jetri je 1,5 mg, dok bubrezi, srce, slezena i mozak sadrže između 20 i 30 µg vitamina B<sub>12</sub> svaki.

### **2.2.5. Izlučivanje**

Enterohepatička cirkulacija je bitan dio apsorpcije vitamina B<sub>12</sub> i njegovog zadržavanja u organizmu. Između 0,5 i 5,0 µg vitamina B<sub>12</sub> ulazi svakodnevno u tanko crijevo preko žuči, veže se za unutarnji faktor i veći dio se reapsorbira (oko 70%). Naime, žučni kobalofilini se hidroliziraju u duodenumu i oslobođeni se vitamin B<sub>12</sub> veže za unutarnji faktor i (re)apsorbira u ileumu. S obzirom da unutarnji faktor specifično veže samo kobalamine, ali ne i druge vrste korinoida, reapsorbiraju se samo biološki aktivni oblici vitamina B<sub>12</sub>. Prilikom prolaska kroz bubrege, vezanje vitamina B<sub>12</sub> za transkobalamine I i II sprječava izlučivanje ovog vitamina urinom. Općenito, vitamin B<sub>12</sub> se izlučuje primarno fecesom, a manje urinom.

## 2.3. ULOGA VITAMINA B<sub>12</sub>

U ljudskom organizmu, reaktivna C-Co veza vitamina B<sub>12</sub> sudjeluje u dva tipa reakcija, točnije, u reakcijama izomerizacije i prijenosa metilnih skupina. Reakcije izomerizacije provode izomeraze, kojima je potreban vitamin B<sub>12</sub> u obliku adenzilkobalamina, dok reakcije prijenosa metilnih skupina provode metiltransferaze kojima je potreban vitamin B<sub>12</sub> u obliku metilkobalamina. U ljudi, vitamin B<sub>12</sub> je potreban za tri enzimske reakcije, od kojih je jednoj potreban vitamin B<sub>12</sub> u obliku metilkobalamina, a druge dvije u obliku adenzilkobalamina. Enzimi kojima je potreban adenzilkobalamin su metilmalonil-CoA mutaza i leucin aminomutaza, a enzimu metionin sintetazi je potreban metilkobalamin. Leucin aminomutaza je enzim koji katalizira pretvorbu, odnosno izomerizaciju leucina i  $\beta$ -leucina.

### 2.3.1. Regeneracija folata (vitamin B<sub>9</sub>)

Vitamin B<sub>12</sub> u obliku metilkobalamina je potreban za uspješno djelovanje folat-ovisnog enzima, metionin sintaze. Metionin sintaza ima ulogu u sintezi aminokiseline, metionina, iz homocisteina, a ovaj biokemijski proces se odvija u citosolu stanice. Prvo kobalamin, vezan za metionin sintazu, koja se još naziva i homocistein metiltransferazom, prolazi kroz proces metilacije. Metilna skupina se prenosi na kobalamin s 5-metiltetrahidrofolata, pri čemu nastaje metilkobalamin potreban za sljedeću reakciju i tetrahidrofolat. Zatim se metilna skupina prenosi s metilkobalamina na homocistein, pri čemu nastaje metionin i kobalamin.

Osim što je potreban za sintezu proteina, metionin je potreban i za sintezu S-adenozilmetionina, spoja koji djeluje kao donor metilnih skupina i koji sudjeluje u brojnim reakcijama metilacije. Posebno važne reakcije metilacije su metilacije DNA i RNA, koje imaju ulogu u sprječavanju raka. Pogoršana funkcija metionin sintaze može uzrokovati nakupljanje homocisteina, čije su povišene količine u organizmu bitan čimbenik razvoja kardiovaskularnih bolesti. Također, nedostatak vitamina B<sub>12</sub> ometa funkciju metionin sintaze što uzrokuje smanjenje količina tetrahidrofolata, a nakupljanje 5-metiltetrahidrofolata. Zbog smanjene količine tetrahidrofolata manje se stvara i 5,10-metilentetrahidrofolata koji je potreban za pretvorbu deoksiuridin monofosfata u deoksitimidin monofosfat, reakcije bitne u sintezi DNA. Smanjenje količina aktivnog oblika vitamina B<sub>9</sub> ometa sintezu DNA te posljedično uzrokuje neuspješnu proizvodnju stanica koje se ubrzano dijele, posebno crvenih krvnih stanica. Reakcijama metionin sintaze, odnosno pretvorbom metionina u homocistein,

se ujedno odvija i regeneracija folata te se upravo iz navedenih razloga hematološki simptomi nedostatka vitamina B<sub>9</sub> i B<sub>12</sub> ne mogu razlikovati.

### ***2.3.2. Metabolizam aminokiselina, proteina i masti***

Vitamin B<sub>12</sub> u obliku 5-deoksiadenozilkobalamina je potreban za pretvorbu L-metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA, intermedijera ciklusa limunske kiseline. L-Metilmalonil-CoA nastaje iz D-metilmalonil-CoA, koji pak nastaje iz propionil-CoA. Propionil-CoA se stvara tijekom oksidacije metionina, izoleucina i treonina te od masnih kiselina neparnog broja ugljikovih atoma. Reakcija pretvorbe L-metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA se odvija u mitohondriju uz pomoć enzima, L-metilmalonil-CoA mutaze. Ova reakcija je važna za proizvodnju energije iz masti i proteina, a enzim, L-Metilmalonil-CoA mutaza, je dimer i potrebne su joj dvije molekule adenzilkobalamina. Pri nedostatku vitamina B<sub>12</sub> ovom enzimu se smanjuje aktivnost što uzrokuje nakupljanje metilmalonil-CoA, a dio se hidrolizira u metilmalonsku kiselinu, koja se izlučuje urinom. Smanjenje aktivnosti ovog enzima može ometati urea ciklus i ciklus limunske kiseline, a također može i ometati sintezu masnih kiselina. Naime, tada se u masne kiseline uključuje metilmalonil, a ne malonil, te se pretpostavlja da su neki neurološki simptomi nedostatka vitamina B<sub>12</sub> upravo uzrokovani sintezom ovih neprirodnih masnih kiselina.

### ***2.3.3. Normalno funkcioniranje živčanog sustava***

Nedostatak vitamina B<sub>12</sub> uzrokuje smanjenje funkcije metilmalonil-CoA mutaze, što za posljedicu ima povećanje razina metilmalonske kiseline, koja destabilizira mijelinsku ovojnica. Povišene količine metilmalonske kiseline ometaju normalnu sintezu masnih kiselina ili se sama uključuje u njih. Ako se takve abnormalne masne kiseline ugrade u mijelin, on će biti nestabilan i doći će do demijelinizacije. Također, metionin je potreban za sintezu S-adenozilmetionina koji djeluje kao donor metilnih skupina i metilira fosfolipide mijelinske ovojnice. Iako sama sinteza S-adenozilmetionina nije ovisna o vitaminu B<sub>12</sub>, vitamin B<sub>12</sub> sudjeluje preko pružanja potrebnih količina metionina. S-Adenzilmetionin je potreban i za proizvodnju neuroprijenosnika važnih za raspoloženje, što može objasniti povezanost niskih razina vitamina B<sub>12</sub> i povećanog rizika od depresije.



#### **2.3.4. Stvaranje stanica**

Stanice s kraćim životnim vijekom (stanice kože, stanice crijeva, stanice sluznica) ovise o vitaminu B<sub>9</sub>, s obzirom da nukelinske kiseline upravljaju staničnim rastom. Jedna od ključnih uloga vitamina B<sub>9</sub> jest i omogućavanje potpunog razvoja crvenih krvnih zrnaca. Naime, vitamin B<sub>9</sub> je važan u reakcijama pretvorbe uracila u timidin, građevnu jedinicu DNA, koja je potrebna za proizvodnju i diobu stanica, posebno crvenih krvnih zrnaca. Uloga vitamina B<sub>12</sub> u ovim procesima leži u regeneraciji folata, tijekom reakcija koje provodi metionin sintaza. Također, sukcinil-CoA, koji nastaje i djelovanjem L-metilmalonil-CoA mutaze, je potreban za uspješnu sintezu hema, a time i hemoglobina. No, samo je RNA potrebna za sintezu hemoglobina te joj nije potreban timidin, već uracil. Stoga, ako nema dovoljnih količina vitamina B<sub>9</sub>, nove stanice nastaju polako, jer im je potrebna DNA za rast. Pritom se hemoglobin, kojem treba samo RNA, stvara normalnim brzinom. Ovo stanje uzrokuje nastanak crvenih krvnih stanica koje se nazivaju makrociti, a veće količine takvih stanica rezultiraju makrocitnom anemijom.

#### **2.4. IZVORI VITAMINA B<sub>12</sub>**

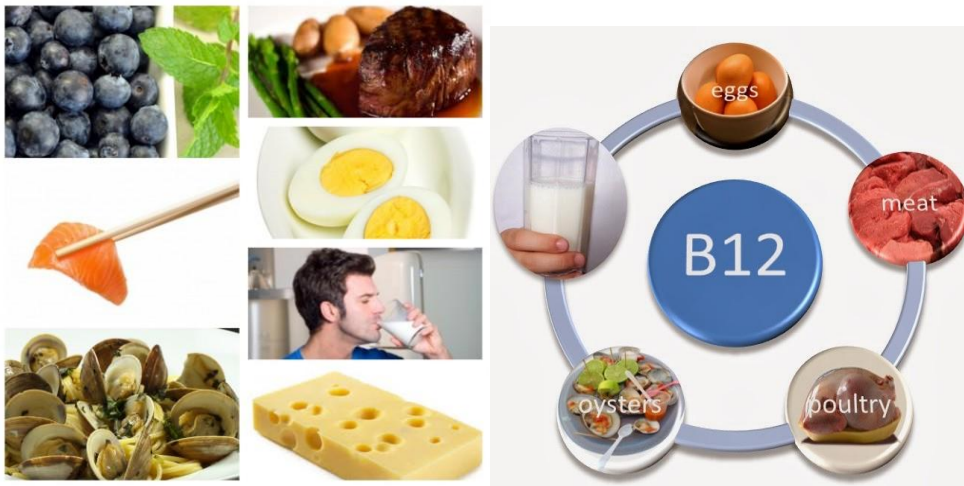
Najbogatiji izvori cijanokobalamina su bakterije i plijesni. Nalazi se u malim količinama u gotovo svim životinjskim tkivima, mlijeku, jajima, ribi, mekušcima te mikroflori probavnog trakta preživača. Vitamin B<sub>12</sub> nije prisutan u voću i žitaricama osim ako su kontaminirane mikroorganizmima. Sintetizira se jedino u bakterijama, neaktivan je, a u organizmu prelazi u aktivne derivate: metilkobalamin (prevladava u krvi) te 5'-adenozilkobalamin (prevladava u jetri). Kao biokatalizator djeluje u živčanom sustavu, reakcijama transmetiliranja, izomerizacije, pregradnje  $\alpha$ -leucina u  $\beta$ -leucin te reakcijama vezanim za stvaranje krvi.

##### **2.4.1. Hrana**

Vitamin B<sub>12</sub> proizvode mikroorganizmi, a glavni izvor ovog vitamina su namirnice životinjskog podrijetla. Vitamin B<sub>12</sub> koji se nalazi u namirnicama životinjskog podrijetla potječe iz mikroorganizama koji ga sintetiziraju, a nalaze se u zemlji, vodi ili probavnom sustavu životinja. Točnije, u životinjskim namirnicama vitamin B<sub>12</sub> se nalazi zbog prehrane životinja životinjskim tkivima, koja sadrže kobalamin, i biljnim materijalom kontaminiranog mikroorganizmima uz apsorpciju vitamina u životinjskom probavnom traktu. Sadržaj

vitamina B<sub>12</sub> u životinjskim namirnicama ovisi o sposobnosti skladištenja istog te upravo iz tog razloga namirnice životinjskog podrijetla sadrže značajno veće količine vitamina B<sub>12</sub> nego one biljnog podrijetla. Povrće i voće ne sadrži vitamin B<sub>12</sub>, no manje količine koje se mogu naći u namirnicama biljnog podrijetla potječu od kontaminacije mikroorganizmima iz gnojiva ili, u slučaju mahunarki, od nitrofikacijskih bakterija u kvržicama korijena. Biljna hrana, kao što su morske biljke (morska trava), alge (plavo-zelene alge), kvasac i fermentirana biljna hrana (tempeh, miso ili tofu) ne sadrže značajne količine vitamina B<sub>12</sub>.

Izvori vitamina B<sub>12</sub> su: meso i mesni proizvodi, jetra, perad, riba (posebno losos), škampi, školjkaši (posebno kamenice i Jakobove kapice) i jaja (posebno u žumanjku) te u nešto manjim količinama mlijeko i mliječni proizvodi (sir, jogurt) (Slika 3).



**Slika 3.** Izvori vitamin B<sub>12</sub>

U namirnicama životinjskog podrijetla vitamin B<sub>12</sub> se nalazi pretežno u obliku adenzil- i hidroskobalamina, dok se u mlijeku i mliječnim proizvodima nalazi uz navedene i u obliku metilkobalamina. Cijanokobalamin se može naći u malim količinama u duhanu, bjelanjku, sirevima i kuhanom bakalaru, dok sulfitokobalamin u konzerviranom mesu i ribi. Biološka raspoloživost, odnosno količina apsorbiranog vitamina B<sub>12</sub> opada s povećanjem unosa ovog vitamina. Točnije, pri unosu od 0,5 µg ili manje apsorbira se oko 70% raspoloživog vitamina B<sub>12</sub>, dok pri unosu od 5,0 µg apsorbira se oko 26% (2 – 50%), a pri unosima od 10 µg oko 17% (0 – 34%). Pri visokim unosima, 100 µg ili više, apsorpcija opada na 1% i višak se izlučuje urinom. Vitamin B<sub>12</sub> koji se nalazi u ovčetini, piletini i ribi se bolje apsorbira u usporedbi s oralno uzimanom vodenom otopinom cijanokobalamina. S druge strane, vitamin

B<sub>12</sub> koji se nalazi u jajima se lošije apsorbira zbog prisutnosti posebnih proteina koji vežu vitamin B<sub>12</sub>, a koji se nalaze i u bjelanjku i žumanjku. Potrebno je napomenuti da između 5 i 30 % vitamina B<sub>12</sub> u hrani su zapravo nekobalaminski korinoidi, a ne „pravi“ vitamin B<sub>12</sub>.

#### ***2.4.2. Dodaci prehrani i obogaćivanje hrane***

Dodaci prehrani pretežno sadrže vitamin B<sub>12</sub> u obliku cijanokobalamina, obliku koji naš organizam pretvara u aktivne oblike, metilkobalamin i 5-deoksiadenozilkobalamin. Međutim, mogu sadržavati i metilkobalamin te razne druge oblike vitamina B<sub>12</sub>. Vitamin B<sub>12</sub> se nalazi u multivitaminским pripravcima i pripravcima pojedinačnog vitamina raznih oblikovanja (transdermalni flasteri, sprejevi za nos, injekcije, sublingvalne tablete i pastile, gel,...). Vitamin B<sub>12</sub>, u obliku cijanokobalamina i rjeđe hidroskobalamina, se može dati parenteralno, obično kao intramuskularna injekcija. Ovakav način uzimanja vitamina B<sub>12</sub> se propisuje u slučaju nedostatka ovog vitamina. Vitamin B<sub>12</sub> je također dostupan u obliku gela koji se primjenjuje intranazalno. Dosadašnja istraživanja ne nalaze značajnu razliku u apsorpciji vitamina B<sub>12</sub> s obzirom na oblikovanje pripravka. Međutim, sposobnost organizma da apsorbira vitamin B<sub>12</sub> je ograničena intrinzičnim faktorima, pa se tako apsorbira samo 10 µg od 500 µg oralno uzimanog vitamina B<sub>12</sub> iz dodataka prehrani. Također, istraživanja ne nalaze značajne razlike u apsorpciji između sublingvalnih i oralnih pripravaka ovog vitamina, a injekcije i flasteri se obično primjenjuju kada postoji određeni poremećaj probavnog sustava. Vitaminom B<sub>12</sub> se najčešće obogaćuju žitarice za doručak, kvasac, energetske pločice i energetska pića. Postoje zabune oko podrijetla vitamina B<sub>12</sub> u prehranbenom kvascu, kojeg vegani i vegetarijanci često koriste kao izvor ovog vitamina. Naime, kvasac ne može proizvoditi vitamin B<sub>12</sub>, ali se njime može obogatiti pa se ne može smatrati kao izvor ovog vitamina.

## 2.5. TOKSIČNOST VITAMINA B<sub>12</sub>

Istraživanja pokazuju da je vitamin B<sub>12</sub> općenito netoksičan u većim količinama, odnosno nisu zabilježene nikakve značajne nuspojave ili bilo kakav štetan učinak velikih doza ovog vitamina. Vitamin B<sub>12</sub> je topljiv u vodi, a apsorpcija, pri fiziološkim dozama koje se javljaju u hrani, je ograničena te se svaki višak vitamina B<sub>12</sub> izlučuje. Također, smatra se da je otpuštanje cijanida toksikološki neznajno. Doze od 1 mg dnevno intravenozno primijenjenog vitamina B<sub>12</sub> kroz period od 1 godine nisu imale nikakve nuspojave, a doze od 1 mg dva puta tjedno oralno primijenjenog vitamina B<sub>12</sub> kroz period od 3 godine također nemaju nikakve nuspojave. Intramuskularne doze od 1 do 5 mg se također nisu pokazale toksičnima. Točnije, nisu dokumentirane nikakve nuspojave prilikom uzimanja cijanokobalamina u dozama od 4,5 mg dnevno kroz period od 2 tjedna, 2,0 mg dnevno kroz period od 1 godine niti 1,0 mg dnevno kroz period od nekoliko godina. Također, nisu dokumentirane nikakve nuspojave prilikom uzimanja hidroksokobalamina u dozi od 0,3 mg dnevno kroz period od 1 godine niti metilkobalamina u dozi od 6,0 mg dnevno tijekom 12 tjedana.

Međutim, dokumentirani su pojedinačni slučajevi alergijskih reakcija na vitamin B<sub>12</sub> te jedan slučaj pojave kontaktnog dermatitisa. Također, dokumentirana je pojava poremećaja na koži (akne) nakon intravenozne primjene ovog vitamina. Točnije, nakon 12 injekcija 5 mg hidroksokobalamina, ali ne i cijanokobalamina, moguća je pojava akni. Pretpostavlja se da produkti razgradnje nestabilnijeg hidroksokobalamina mogu biti uzrok stvaranja akni. Također, dokumentiran je jedan slučaj pojave akni nakon primjene 100 mg vitamina B<sub>6</sub>, 100 µg vitamina B<sub>12</sub> i 10 000 IU vitamina A te nepoznate količine cinka. Nakon prestanka uzimanja ove kombinacije vitamina zabilježeno je značajno poboljšanje.

U oboljelih od megaloblastične anemije liječenje folnom kiselinom (vitamin B<sub>9</sub>) i vitaminom B<sub>12</sub> može rezultirati hipokalemijom. Ovi vitamini potiču staničnu proliferaciju, a s obzirom da je kalij potreban za sintezu novih stanica, može doći do opasno niskih razina kalija u organizmu te je potreban oprez. Također, veće količine folne kiseline mogu zamaskirati nedostatak vitamina B<sub>12</sub> u liječenju megaloblastične anemije, bez da utječu na neurološke poremećaje uzrokovane nedostatkom vitamina B<sub>12</sub>.

Cijanid je normalno prisutan u našem tijelu, ali je toksičan te ga organizam pretvara u tiocijanat da bi ga izlučilo iz organizma. Međutim, ako ga je previše (pušenje!) organizam ga

se rješava tako što ga veže na kobalamin i izlučuje ga u obliku cijanokobalamina. Iz tog razloga je vitamin B<sub>12</sub>, u obliku cijanokobalamina, kontraindiciran u slučaju Leberove bolesti, nasljedne bolesti atrofije očnog živca. Međutim, postoje i drugi oblici vitamina B<sub>12</sub> koji nisu štetni u ovom slučaju, a pojedina istraživanja pokazuju da je moguće da je nedostatak vitamina B<sub>12</sub> zapravo okidač razvoja ove bolesti.

## **2.6. NEDOSTATAK VITAMINA B<sub>12</sub> U ORGANIZMU**

Simptomi nedostatka vitamina B<sub>12</sub> su: zbunjenost, depresija, umor, periferna neuropatija, psihoza, megaloblastična anemija, demencija, slabo pamćenje, slabost, glositis, konstipacija i gubitak teka. Simptomi nedostatka ovog vitamina u djece su pogoršan rast i razvoj, poremećaji pokreta i megaloblastična anemija.

Nedostatak vitamina B<sub>12</sub> uzrokuje određene biokemijske promjene u našem organizmu zbog smanjene aktivnosti enzima kojima je on potreban za djelovanje. Točnije, smanjena aktivnost metionin sintaze uzrokuje nakupljanje homocisteina, a smanjena aktivnost L-metilmalonil-CoA mutaze uzrokuje nakupljanje metilmalonske kiseline. Osobe s blagim nedostatkom vitamina B<sub>12</sub> mogu imati povišene koncentracije ovih spojeva, ali ne moraju imati izražene simptome specifične za nedostatak ovog vitamina. Međutim, rezerve vitamina B<sub>12</sub> u organizmu su relativno velike (2 do 5 mg) u odnosu na potrebe, pa da bi se nedostatak klinički manifestirao mogu proći godine. Obično se nedostatak vitamina B<sub>12</sub> liječi injekcijama ovog vitamina ili visokim oralnim dozama. Najčešće se primijenjuje intramuskularna injekcija, a oralne su se doze od 2 mg dnevno, sa smanjenjem doza na 1 mg dnevno, te konačno 1 mg tjedno i mjesečno, pokazale jednako učinkovite.

### **2.6.1. Povezanost vitamina B<sub>9</sub> i B<sub>12</sub>**

Vitamin B<sub>12</sub> zajedno s vitaminom B<sub>9</sub> sudjeluje u biosintezi labilnih metilnih skupina, koje su potrebne za biosintezu purinskih i pirimidinskih baza, esencijalnih komponenti nukleinskih kiselina. Stoga nedostatak ovih vitamina uzrokuje pogoršanja u diobi stanica i promjene u sintezi proteina. Metionin sintaza provodi reakciju pretvorbe homocisteina u metionin, uz pretvorbu metiltetrahydrofolata u tetrahydrofolat, aktivan oblik vitamina B<sub>9</sub>. Nedostatak vitamina B<sub>12</sub> uzrokuje nakupljanje metiltetrahydrofolata, upravo zbog smanjenog djelovanja metionin sintaze. Posljedica smanjenog djelovanja ovog enzima je nedostatak

tetrahidrofolata, odnosno metilen-tetrahidrofolata, koji je bitan za sintezu DNA, odnosno metilaciju deoksiuridilata u timidilat. Važna funkcija vitamina B<sub>12</sub> je stoga i regeneracija folata.

### ***2.6.2. Megaloblastična anemija***

Nedostatak vitamina B<sub>12</sub> uzrokuje smanjenje aktivnosti metionin sintaze čime se inhibira regeneracija tetrahidrofolata te folat ostaje u obliku koji naš organizam ne može iskoristiti. Stoga nedostatak i folata i vitamina B<sub>12</sub> može ometati sintezu DNA, upravo zbog smanjenih količina aktivnog oblika vitamina B<sub>9</sub>. Smetnje u sintezi DNA imaju negativan utjecaj na stanice koje se brzo dijele, posebno crvene krvne stanice, što rezultira proizvodnjom velikih i nezrelih crvenih krvnih stanica. Takvo stanje može rezultirati bolešću koja se naziva megaloblastična anemija, a može se javiti i snižen broj bijelih krvnih stanica i trombocita uz povećan broj hipersegmentiranih neutrofila. Ova povezanost folata i vitamina B<sub>12</sub> objašnjava zašto nedostatak istih rezultira morfološki identičnim anemijama. Dodatno uzimanje folne kiseline obnavlja količine ovog vitamina dostatne za normalnu proizvodnju crvenih krvnih stanica. Međutim, ako je uzrok anemije nedostatak vitamina B<sub>12</sub>, dodatno uzimanje folata može maskirati ovo stanje, uz uspješno liječenje anemije. Također, veće količine folata ne pomažu pri smanjenju neuroloških simptoma uzrokovanih nedostatkom vitamina B<sub>12</sub> te je potreban oprez.

### ***2.6.3. Neurološki simptomi***

Neurološki simptomi nedostatka vitamina B<sub>12</sub> se mogu javiti bez anemije, a javljaju se u 75 % do 90 % ljudi kojima nedostaje ovaj vitamin. Uključuju osjećaj trnjenja u rukama i nogama, otežan hod, pogoršano pamćenje, dezorijentiranost, demeciju, mijelopatiju, promjene raspoloženja, razdražljivost, mononeuropatiju (optičku ili olfaktornu), autonomnu neuropatiju (impotencija, urinarna ili fekalna inkontinencija), probleme s koncentracijom te pogoršanu koordinaciju ruku i nogu. U djece se javlja razdražljivost, poremećen rast i razvoj, apatija i anoreksija. Pretpostavlja se da je uzrok neuroloških simptoma pogoršana sinteza metionina koja rezultira smanjenim količinama S-adenozilmetionina, glavnog donora metilnih skupina u reakcijama (trans)metilacije. S-Adenozilmetionin je potreban za metilaciju fosfolipidne mijelinske ovojnice čime se ona stabilizira, a manjak S-adenozilmetionina uzrokuje demijelinizaciju. Također, nedostatak vitamina B<sub>12</sub> smanjuje aktivnost L-metilmalonil-CoA mutaze što rezultira povećanim količinama metilmalonske kiseline u organizmu. Povećanje

količina ove kiseline uzrokuje njeno umetanje u masne kiseline, pri čemu nastaju abnormalne masne kiseline. Ugradnjom takvih masnih kiselina u mijelin dolazi do destabilizacije mijelina i posljedično demijelinizacije. Općenito, ovi simptomi se mogu izliječiti primjenom vitamina B<sub>12</sub>, no ako se prekasno počne s liječenjem, dio nastalog oštećenja je nepovratno.

#### ***2.6.4. Uzroci nedostatka vitamina B<sub>12</sub>***

##### ***2.6.4.1. Nedovoljan unos hranom***

S obzirom da biljke ne sintetiziraju vitamin B<sub>12</sub>, za osobe čija prehrana isključuje hranu životinjskog podrijetla postoji rizik od razvoja nedostatka vitamina B<sub>12</sub>. Istraživanja pokazuju da vegetarijanci imaju snižene količine vitamina B<sub>12</sub>, a smanjene količine ovog vitamina se javljaju i u ovo- i lakto-vegetarijanaca, dakle, onih koji konzumiraju jaja i mlijeko. Vitamin B<sub>12</sub> se reapsorbira u našem organizmu te se time ipak smanjuje rizik od nedostatka ovog vitamina. Međutim, istraživanja pokazuju da se nedostatak vitamina B<sub>12</sub> može razviti u prosjeku 6 godina nakon prelaska na vegetarijansku prehranu. Posebna opasnost leži u razvoju nedostatka vitamina B<sub>12</sub> u djece čije su majke vegetarijanke. Vitamin B<sub>12</sub> prolazi kroz placentu i može ga se naći u mlijeku, a djeca, čije ih majke vegetarijanke prehranjuju isključivo dojenjem, mogu razviti nedostatak ovog vitamina. Nedostatak se može razviti unutar par mjeseci od rođenja, zbog smanjenih zaliha ovog vitamina i zbog smanjenog unosa istog. Neprimijećen i neliječen nedostatak vitamina B<sub>12</sub> u djece može rezultirati ozbiljnim i trajnim neurološkim oštećenjima, uz melagloblastičnu anemiju. Također, može se razviti blaga mentalna retardacija, a nedostatak vitamina B<sub>12</sub> je primijećen i u djece koja su na makrobiotičkoj prehrani.

##### ***2.6.4.2. Malapsorpcija***

Malapsorpcija uzrokuje brži razvoj nedostatka vitamina B<sub>12</sub> nego nedovoljan unos hranom. S obzirom da se vitamin B<sub>12</sub> apsorbira u crijevu i za apsorpciju mu je potreban unutarnji faktor, intestinalni poremećaji i manjak unutarnjeg faktora mogu uzrokovati nedostatak ovog vitamina. Simptomi nedostatka vitamina B<sub>12</sub> se tada javljaju unutar dvije do šest godina, koji se razvijaju i pri većim unosima ovog vitamina hranom. Jedni od uzroka malapsorpcije vitamina B<sub>12</sub> su Crohnova bolest, celijakija, infekcija HIV-om, smanjena proizvodnja želučane kiseline, kirurški uklonjeni dijelovi probavnog sustava i pogoršana funkcija gušterače. Specifična bolest malapsorpcije vitamina B<sub>12</sub> je perniciozna anemija, autoimuna

bolest koju karakterizira proizvodnja antitijela koja napadaju parijetalne stanice želuca. Atrofija parijetalnih stanica rezultira gubitkom sposobnosti proizvodnje unutarnjeg faktora i lučenja želučane kiseline. Stoga se vitamin B<sub>12</sub> ne može apsorbirati, ali ni reapsorbirati što uzrokuje brz razvoj simptoma nedostatka ovog vitamina. Anemija je simptom ove bolesti te je zapravo krajnji stadij ove autoimune upale, koju prate i svi neurološki simptomi nedostatka vitamina B<sub>12</sub>. Ako se ne liječi, perniciozna anemija može rezultirati smrću. U starijih je najčešći uzrok nedostatka vitamina B<sub>12</sub> hipokloridija s atrofičnim gastritisom. Atrofični gastritis nastaje kad sluznicu želuca, odnosno parijetalne stanice, napadnu antitijela što rezultira gubitkom tih stanica, koje izlučuju želučanu kiselinu i enzime. S obzirom da je za apsorpciju vitamina B<sub>12</sub> vezanog za proteine iz hrane potrebna želučana kiselina, oboljeli od ove bolesti mogu razviti simptome nedostatka ovog vitamina. Međutim, oboljeli od ove bolesti mogu apsorbirati slobodan vitamin B<sub>12</sub> iz dodataka prehrani, a nije inhibirana ni reapsorpcija ovog vitamina. S vremenom će se ipak smanjiti količine ovog vitamina u organizmu, a smanjene količine želučane kiseline mogu rezultirati povećanim rastom crijevnih bakterija koje koriste vitamin B<sub>12</sub> te time smanjiti količine ovog vitamina koje su na raspolaganju našem organizmu. Također, atrofični gastritis se često povezuje s infekcijom *Helicobacter pylori*, koja uzrokuje kroničnu upalu želuca i time, dakle, smanjenu apsorpciju vitamina B<sub>12</sub>. Kronična intestinalna infekcija ribljim parazitom *Diphyllobothrium* može uzrokovati nedostatak vitamina B<sub>12</sub> s obzirom da se ovaj parazit natječe s domaćinom za ovaj vitamin. Ostali uzroci nedostatka vitamina B<sub>12</sub> su i uzimanje određenih lijekova te hipokalemija.



### **3. METODOLOGIJA**

### 3.1. PROIZVODNJA VITAMINA B<sub>12</sub> U VELIKOM MJERILU POMOĆU

#### *Pseudomonas denitrificans* UZ PRIHRANJIVANJE BETAINOM

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom istraživanju za proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> korišten je industrijski soj *Pseudomonas denitrificans*. *Pseudomonas denitrificans* je nacijepljen na kosi agar koji je sadržavao: melasu (120 g/L); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – (0,25 g/L); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,5 g/L); MnSO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O (0.1 g/L) i agar (20 g/L), a pH je iznosio 7,0-7,2.

##### 3.1.2. Hranjivi mediji

Početni hranjivi medij sadrži: saharoza – 30 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 5 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,3 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,7 g/L; MnSO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O – 0,2 g/L; MgSO<sub>4</sub> – 1,5 g/L; ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O – 0,02 g/L; CoCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O – 0,02 g/L; 5,6-dimetilbenzimidazol (DMBI) 0,0045 g/L.

Fermentacijski medij sadrži: saharoza - 80 g/L; betain - 15 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,75 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,0 g/L; MgSO<sub>4</sub> – 1,5 g/L; ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O - 0,08 g/L; CoCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O - 0,14 g/L; 5,6-dimetilbenzimidazol ( DMBI ) – 0,075 g/L.

pH vrijednost oba medija podešena je u rasponu od 7,2-7,4 uz dodatak NaOH prije sterilizacije.

Hranjivi mediji za fermentaciju s pritokom u fermentoru volumena 120m<sup>3</sup> sastoji se od:

medij A: glukoza - 500 g/L

medij B: betain - 39 g/L; CoCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O – 0,3 g/L; DMBI – 0,3 g/L

##### 3.1 3. Fermentacija u tikvicama

Kultura je prenesena Erlenmeyerovu tikvicu volumena 300 mL u kojoj se nalazilo 60 mL početnog hranjivog medija nacijepljenog sa stanicama iz svježeg kosog agara i uzgojenog pri 28°C u rotirajućoj tresilici pri 260 o/min kroz 18 sati. Zatim je hranjiva kultura (medij) prenesena u Erlenmeyerovu tikvicu (volumena 300 mL) koja je sadržavala 30 mL medija za fermentaciju s 10% inokuluma, te inkubirana na 32°C u rotacionoj tresilici pri 260 o/min kroz 96 sati. Da bi istražili utjecaj betaina na rast *Pseudomonas denitrificans* i biosintezu vitamina B<sub>12</sub>, ispitano je šest različitih koncentracija betaina (0, 5, 10, 15, 20 i 30 g/L) u mediju za fermentaciju.

Za daljnja istraživanja utjecaja betaina na fermentacijske procese s *Pseudomonas denitrificans*, u medije za fermentaciju dodavale su se koncentracije betaina od 0, 15 i 30 g/L.

#### **3.1.4. Fermentacija u fermentoru volumena 120m<sup>3</sup>**

Fermentacija je provedena u tri faze, uključujući dvije faze rasta inokuluma i fazu proizvodnje vitamina B<sub>12</sub>. Prva faza se odvijala u fermentoru volumena 0,15 m<sup>3</sup> koji je sadržavao 0,1 m<sup>3</sup> sterilne kulture s inokulumom iz osam kosih agara. Uzgoj se provodio pri 28°C kroz 40 sati uz stupanj aeracije 0,5 v/v/min i brzinom miješanja 180 o/min. Zatim je primarna kultura prenesena u sekundarni fermentor volumena 9 m<sup>3</sup> s 5 m<sup>3</sup> kulture i uzgajana je pri 28°C i brzini miješanja od 130 o/min te stupnju aeracije 0,4 v/v/min kroz 30 sati. Fermentacija se provodila pri 32°C kroz 162 sata u fermentoru volumena 120 m<sup>3</sup> koji se sastoji od tri rotora, sonde za mjerenje temperature, pH te količine otopljenog kisika. pH vrijednost fermentacije prije inokulacije regulirana je na 7,0 – 7,2. Sekundarna kultura premještena je u fermentor koji je sadržavao 75% fermentacijskog medija.

Koncentracija otopljenog kisika je održavana na 10% zasićenosti zraka tijekom fermentacije. Kada je koncentracija šećera u bujonu pala na 45 g/L, prihranjivanje glukozom započeto je i održano na 30 - 40 g glukoze/L tijekom čitavog procesa fermentacije. Otopina betaina kontinuirano se prihranjivala u periodu od 50 do 140 sati tijekom fermentacije. Da bi se postigla optimalna strategija prihranjivanja betaina za fermentaciju vitamina B<sub>12</sub> u fermentoru volumena 120 m<sup>3</sup>, koncentracija betaina u bujonima kontrolirana je u rasponima 3–5 g/L, 5-7 g/L te 8-10 g/L.

#### **3.1.5. Određivanje mase suhe tvari**

Hranjiva podloga je centrifugirana pri 5000 o/min kroz 10 minuta. Nakon što je talog dva puta ispran destiliranom vodom, osušen je na konstantnu težinu pri 105°C.

#### **3.1.6. Određivanje sadržaja vitamina B<sub>12</sub> u hranjivoj podlozi**

Koncentracija vitamina B<sub>12</sub> u fermentacijskoj komini određena je HPLC –om. 25 mL uzorka podloge u koju su dodani 2,5 mL 8% - tnog NaNO<sub>2</sub> i 2,5 mL ledene octene kiseline zagrijano je do vrenja 30 minuta. Nakon toga smjesa se filtrira te se doda 20 µL 10% NaCl u 1 mL vodene otopine. Dobivena vodena otopina analizirana je pomoću HP1100 HPLC sustava.

Za HPLC analizu korištena je  $\text{NH}_2$  kolona uz protok od 1,7 mL/min i pri valnoj duljini od 360 nm. Mobilna faza je sastavljena od 250 mmol smjese fosforna kiselina/acetanitril (30/70, v/v).

### **3.1.7. Određivanje sadržaja $\delta$ -aminolevulinske kiseline (ALA) u hranjivoj podlozi**

Pripremljena je standardna krivulja ALA sa različitim poznatim koncentracijama prema kojoj se određivala količina ALA u hranjivoj podlozi.

### **3.1.8. Određivanje sadržaja betaina u hranjivoj podlozi**

Koncentracija betaina u hranjivoj podlozi određena je HPLC kromatografijom. Uzorak hranjivog medija centrifugiran je 15 minuta pri 5000 o/min, a tekuća faza filtrirana je preko 0,22  $\mu\text{m}$  filtra. Mobilnu fazu činila je 10 mM otopina amonij-acetat/metanol (90/10, v/v) s protokom od 1,0 mL/min, a temperatura kolone bila je 45°C. Koncentracija betaina određena je iz baždarne krivulje.

#### **4. RESULTATI**

#### 4.1. Učinak betaina na rast stanica *Pseudomonas denitrificans* i biosintezu vitamina B<sub>12</sub>

Za uvodna istraživanja učinka betaina na rast i biosintezu vitamina B<sub>12</sub> ispitano je šest različitih koncentracija betaina na rast stanica *Pseudomonas denitrificans* i biosintezu vitamina B<sub>12</sub> u tikvicama na tresilici, a masa suhe tvari i koncentracija proizvedenog B<sub>12</sub> prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Mase suhe tvari i koncentracija proizvedenog vitamina B<sub>12</sub> pri različitim koncentracijama betaina

C <sub>betain</sub> (g/L)	suha tvar (g/L)	Vitamin B <sub>12</sub>			
		n1 (µg/mL)	n2 (µg/mL)	n3 (µg/mL)	$\bar{n}$ (µg/mL)
0	30,51 ± 0,61	0	0	0	0
5	26,28 ± 0,58	38,12	37,77	39,36	38,42 ± 0,84
10	23,81 ± 0,30	48,70	50,21	48,19	49,03 ± 1,05
15	23,36 ± 0,25	51,35	52,22	52,97	52,18 ± 0,81
20	22,47 ± 0,66	46,54	48,72	46,45	47,24 ± 1,29
30	20,04 ± 0,48	42,89	44,66	43,14	43,56 ± 0,96

Na temelju dobivenih rezultata iz Tablice 1 napravljena je analiza varijance (ANOVA) prikazana u tablici 2.

**Tablica 2.** Analiza varijance (ANOVA) rezultata pri šest različitih koncentracija betaina

Izvor	Suma kvadrata	Stupanj slobode	Srednja vrijednost kvadrata	F – vrijednost	P - vrijednost
model	5646,7890	5	1129,3578	1347,5120	0,0000
greška	10,0573	12	0,8381		
ukupna varijacija	5656,8463	17			

#### 4.2. Učinak betaina na procese fermentacije s *Pseudomonas denitrificans*

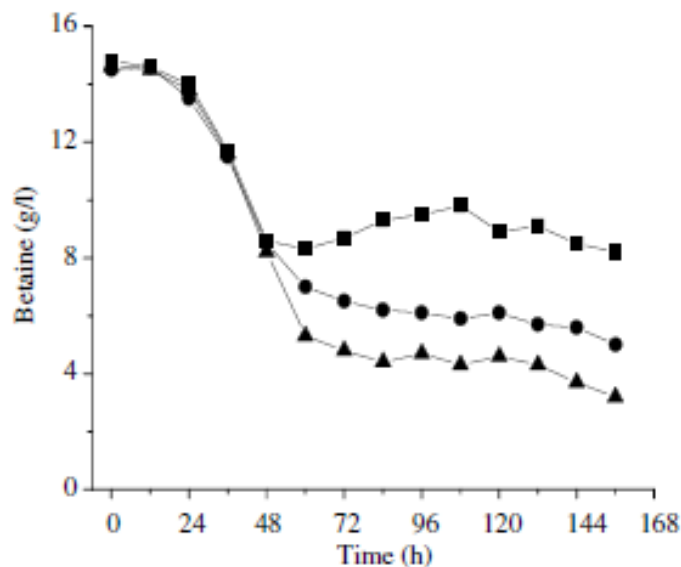
Na temelju dobivenih rezultata o utjecaju šest različitih koncentracija betaina na sintezu vitamina B<sub>12</sub>, postavljen je pokus u tikvicama gdje su ispitane koncentracije 0, 15 i 30 g/L betaina na procese fermentacije, a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 3.

**Tablica 3.** Usporedba pH, suhe tvari, ALA i koncentracije vitamina B<sub>12</sub> tijekom uzgoja u tikvicama pri 0, 15 i 30 g/L betaina u podlozi za fermentaciju

parametar	c <sub>betain</sub> (g/L)	rezultati pri različitim vremenima fermentacije				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
pH	0	6,97 ± 0,01	7,23 ± 0,02	6,88 ± 0,05	6,66 ± 0,04	6,28 ± 0,08
	15	6,95 ± 0,01	7,02 ± 0,04	6,98 ± 0,01	7,03 ± 0,07	7,22 ± 0,06
	30	6,93 ± 0,00	7,09 ± 0,06	7,11 ± 0,07	7,23 ± 0,05	7,43 ± 0,05
Suha tvar (g/L)	0	2,78 ± 0,13	15,12 ± 0,46	20,06 ± 0,68	25,88 ± 0,36	27,85 ± 0,75
	15	2,65 ± 0,21	13,29 ± 0,53	18,54 ± 0,57	21,77 ± 0,64	23,67 ± 0,45
	30	2,65 ± 0,18	12,65 ± 0,49	16,45 ± 0,35	18,79 ± 0,52	20,25 ± 0,50
ALA (μmol/L)	0	0	2,34 ± 0,13	5,54 ± 0,25	4,62 ± 0,18	5,94 ± 0,32
	15	0	21,98 ± 1,16	29,71 ± 2,71	52,15 ± 2,34	44,19 ± 1,65
	30	0	18,36 ± 1,56	27,86 ± 1,79	47,48 ± 2,41	49,53 ± 2,59
Vitamin B <sub>12</sub> (μg/mL)	0			0	0	0
	15			17,55 ± 0,96	38,02 ± 0,97	52,94 ± 0,63
	30			14,18 ± 0,84	30,52 ± 1,02	44,71 ± 1,14

#### 4.3. Prihranjivanje betainom tijekom proizvodnje vitamina B<sub>12</sub> u fermentoru volumena 120m<sup>3</sup>

Na temelju prethodno dobivenih rezultata proizvodnje vitamin B<sub>12</sub> u tikvicama, primijenjena je strategija prihranjivanja betainom u fermentoru volumena 120 m<sup>3</sup> tijekom proizvodnje. Kako bi se dobio optimalan pristup u prihranjivanju betainom, ispitani su različiti rasponi koncentracija betaina koji su kontrolirani prihranjivanjem betainom u fermentoru volumena 120 m<sup>3</sup>, a profile su prikazani na slici 4. Nadalje, sadržaj suhe tvari i koncentracija proizvedenog vitamina B<sub>12</sub> tijekom prihranjivanja betainom prikazani su u Tablici 4.



**Slika 4.** Profili tri različite koncentracije betaina kontrolirane prihranjivanjem tijekom šaržne fermentacije pomoću *Pseudomonas denitrificans* u fermentoru volumena 120m<sup>3</sup>. Koncentracije betaina kontrolirane prihranjivanjem: ▲ 3-5 g/L; ● 5-7 g/L; ■ 8 - 10 g/L

**Tablica 4.** Usporedba koncentracija suhe tvari i vitamina B<sub>12</sub> tijekom uzgoja *Pseudomonas denitrificans* u fermentoru volumena 120 m<sup>3</sup>

vrijeme (h)	suha tvar (g/L)			vitamin B <sub>12</sub> (µg/mL)		
	a	b	c	a	b	c
0	5,06 ± 0,05	5,12 ± 0,10	4,80 ± 0,07			
6	5,44 ± 0,21	5,63 ± 0,13	5,88 ± 0,09			
18	10,37 ± 0,21	10,06 ± 0,30	10,50 ± 0,29			
30	14,49 ± 0,34	14,37 ± 0,29	14,55 ± 0,32			
42	21,45 ± 0,28	21,69 ± 0,54	21,71 ± 0,15	18,78 ± 0,72	18,91 ± 1,16	19,08 ± 1,03
54	27,09 ± 0,37	26,90 ± 0,41	26,71 ± 0,36			
66	28,42 ± 0,50	27,72 ± 0,63	27,66 ± 0,57	51,82 ± 0,97	51,43 ± 1,23	48,96 ± 1,45
78	30,00 ± 0,41	29,42 ± 0,52	28,73 ± 0,37			
90	31,48 ± 0,47	30,84 ± 0,38	29,24 ± 0,71	87,19 ± 2,46	89,66 ± 2,07	72,39 ± 2,34
102	32,47 ± 0,53	31,60 ± 0,49	29,75 ± 0,25			
114	33,12 ± 0,67	32,27 ± 0,58	30,06 ± 0,52	109,22 ± 1,98	115,33 ± 2,80	99,32 ± 2,01
126	33,23 ± 0,49	32,65 ± 0,64	30,19 ± 0,48			
138	33,61 ± 0,62	33,17 ± 0,50	30,55 ± 0,72	148,58 ± 2,79	151,42 ± 3,32	133,68 ± 1,78
150	33,62 ± 0,34	33,19 ± 0,75	30,70 ± 0,58			
162	33,80 ± 1,13	33,17 ± 0,91	30,89 ± 1,05	174,62 ± 3,03	177,49 ± 2,98	160,80 ± 3,56

a – koncentracija betaina kontrolirana prihranjivanjem 3-5 g/L betaina; b – koncentracija betaina kontrolirana prihranjivanjem 5-7 g/L betaina; c – koncentracija betaina kontrolirana prihranjivanjem 8-10 g/L betaina





Vitamin B<sub>12</sub> se uobičajeno opisuje kao skupina kobaltnih korinoida s važnom ulogom faktora rasta te brojnim primjenama u medicini i prehrani (Hunik, 2002.). S obzirom da su postupak i cijena proizvodnje vitamina B<sub>12</sub> kemijskim sintezama kompleksni i skupi, veliki broj mikroorganizama kao što su *Propionibacterium freudenreichii* i *Pseudomonas denitrificans* uspješno se upotrebljavaju za komercijalnu proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> (Martins i sur., 2002.; Roman, 2001.). *Pseudomonas denitrificans* se koristi u industrijskoj proizvodnji zbog brzog rasta i visoke produktivnosti. Iako je dosta napora uloženo u razumijevanje biosinteze vitamina B<sub>12</sub>, postoji malo informacija o učincima betaina na proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> pomoću *Pseudomonas denitrificans*, a što je prikazano u ovom radu.

Za potrebe preliminarnih istraživanja učinaka betaina na rast stanica i proizvodnju vitamina B<sub>12</sub>, ispitano je šest različitih koncentracija betaina (0-30 g/L) u tikvicama na tresilici (tablica 1). Dobiveni rezultati ukazuju da je betain neophodan spoj za biosintezu vitamina B<sub>12</sub> u *Pseudomonas denitrificans* iako je maksimalna masa suhe tvari (30,51 ± 0,61 g/L) postignuta kada nije bilo dodatka betaina u fermentacijskom mediju pri čemu nije bilo proizvodnje vitamina B<sub>12</sub>. Nakon što je u podlogu dodano 15 g/L betaina, postignuta je maksimalna koncentracija vitamina B<sub>12</sub> (52,18 ± 0,81 μg/mL). Povećanjem koncentracije betaina u fermentacijskom mediju, količina suhe tvari se postupno smanjivala, što ukazuje da betain ima negativan utjecaj na rast stanica *Pseudomonas denitrificans*. Na temelju dobivenih rezultata, napravljena je analiza varijance (ANOVA) prikazana u Tablici 2, pri čemu je učinak betaina na proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> bio značajan na razini od 1%. Višestruke usporedbe provedene su najmanje značajnim razlikovnim testovima (LSD) pri čemu nije pronađena značajna razlika između koncentracija betaina od 10 i 20 g/L, dok je proizvodnja vitamina B<sub>12</sub> pri različitim koncentracijama betaina bila statistički značajna pri razini od 1%. Temeljem rezultata ANOVA i LSD testova za šest ispitanih koncentracija betaina u fermentacijskom mediju, može se zaključiti da je koncentracija od 15 g/L betaina optimalna za biosintezu vitamina B<sub>12</sub> u *Pseudomonas denitrificans*, iako je betain pokazao negativan učinak na rast stanica *Pseudomonas denitrificans*.

Na osnovi dobivenih rezultata, provedeni su daljnji pokusi u tikvicama na tresilicama kako bi se ispitali učinci betaina na fermentacijske procese *Pseudomonas denitrificans*, u kojima su u podlogu za fermentaciju dodane koncentracije betaina 0 g/L, 15 g/L i 30 g/L. Dobivene vrijednosti pH, masene koncentracije suhe tvari, ALA i vitamina B<sub>12</sub> tijekom fermentacijskih procesa prikazane su u Tablici 3. Iz rezultata je vidljivo da u podlozi bez dodatka betaina pH vrijednost opada nakon 24 sata. Suprotno tome, dodatkom betaina u koncentracijama od 15 g/L odnosno 30 g/L, pH vrijednost se održava u rasponu 7,0 – 7,5.

Rezultati također pokazuju da je brzina rasta stanica ovisna o koncentraciji betaina. Najviša vrijednost koncentracije suhe tvari postignuta je pri koncentraciji betaina od 0 g/L dok je ispod koncentracije betaina od 15 g/L bila značajno viša nego pri koncentraciji betaina od 30 g/L. Brz rast stanica bez dodatka betaina rezultirao je bržim utroškom šećera, a što je uzrokovalo drastičan pad pH vrijednosti. Suprotno tome, pH se mogao održati u rasponu 7,0-7,5 pri koncentraciji betaina od 15 g/L, odnosno 30 g/L, zbog inhibicije rasta stanica betainom. Vrijednosti ALA u mediju bez dodatka betaina bile su niže nego one kada je betain bio dodan u koncentracijama od 15 g/L i 30 g/L (tablica 3). Prije 72.sata uzgoja, vrijednosti ALA pri koncentraciji betaina ispod 15 g/L bile su više nego pri koncentraciji od 30 g/L, a u podlozi bez betaina nije došlo ni do biosinteze vitamina B<sub>12</sub> tijekom cijelog procesa fermentacije. Zbog boljeg rasta stanica, proizvodnja vitamina B<sub>12</sub> pri koncentraciji betaina ispod 15 g/L je bila značajno viša nego pri 30 g/L. ALA je jedan od ključnih prekursora biosinteze vitamina B<sub>12</sub> čija je biosinteza regulirana enzimom ALA sintazom (Battersby i Leeper, 1998). Istraživanje koje su proveli Fa i sur. (1984.) pokazalo je da betain značajno može povećati aktivnost ALA sintaze. Zbog toga je niska razina ALA postignuta pri koncentraciji betaina 0 g/L. Iako je betain važan sastojak za poticanje aktivnosti ALA sintaze, rezultati su pokazali da prisutnost visoke koncentracije betaina smanjuje biosintezu ALA i time rezultira smanjenom proizvodnjom vitamina B<sub>12</sub>, što je povezano sa inhibicijom rasta stanica betainom. Da bi se zadovoljile potrebe za betainom u biosintezi vitamina B<sub>12</sub> i izbjegli negativni učinci na rast stanica, trebala bi se primjenjivati tehnika prihranjivanja betainom kako bi mu se kontrolirala koncentracija u podlozi za fermentaciju.

Na temelju rezultata dobivenih u pokusima na tresilici, proveden je postupak prihranjivanja betainom u fermentoru volumena 120 m<sup>3</sup>. Da bi se postigao optimalan pristup, kontrolirano je prihranjivanje različitim koncentracijama betaina (Slika 3). Potrošnja betaina je bila vrlo niska tijekom prva 24 sata fermentacije. Povećanjem biomase stanica, koncentracija betaina je drastično pala do približno 8,5 g/L nakon 48 sati, što ukazuje da se treba provesti dodatak betaina kako bi se zadovoljili zahtjevi za biosintezu vitamina B<sub>12</sub>. Zbog toga se betain kontinuirano dodavao u podlogu za fermentaciju tijekom 50 sati. Prilagodbom brzine prihranjivanja betainom, koncentracije u podlozi su se kontrolirale u rasponima 3-5 g/L; 5-7 g/L i 8-10 g/L, a dobiveni rezultati kinetike rasta te biosinteza vitamina B<sub>12</sub> su prikazani u tablici 4. Iz rezultata se primjećuje mala razlika u masi suhe tvari pri sva tri raspona koncentracija betaina kroz 54 sata nakon čega je postignut značajno drugačiji trend u sadržaju suhe tvari. Kada je koncentracija betaina kontrolirana u rasponu 8-10 g/L, masa suhe tvari je bila mnogo niža nego pri ostala dva raspona koncentracija.

U usporedbi s koncentracijom betaina u podlozi s 5-7 g/L, masa suhe tvari pri koncentraciji betaina ispod 3-5 g/L bila je malo viša. Maksimalna masa suhe tvari u tri ispitana raspona koncentracija betaina (3-5 g/L, 5-7 g/L i 8-10 g/L) iznosila je  $33,80 \pm 0,13$  g/L,  $33,19 \pm 0,75$  g/L i  $30,89 \pm 1,05$  g/L. Može se zaključiti da visoka koncentracija betaina u podlozi smanjuje brzinu rasta stanica, a što je u korelaciji s rezultatima postignutih uzgojem u tresilicama (tablice 1 i 3).

U skladu s rastom stanica prije prihranjivanja betainom, prinosi vitamina B<sub>12</sub> bili su gotovo isti nakon 42 sata (tablica 4). Međutim, nakon prihranjivanja betainom, značajno više povećanje vitamina B<sub>12</sub> postignuto je pri koncentracijama betaina u rasponima 3-5 g/L i 5-7 g/L, te je konačna proizvodnja vitamina B<sub>12</sub> nakon 162 sata uzgoja pri istim rasponima koncentracije betaina, iznosila  $174,62 \pm 3,03$  µg/mL odnosno  $177,49 \pm 2,98$  µg/mL. Iako je masa suhe tvari pri koncentraciji betaina 3-5 g/L bila nešto niža, proizvodnja vitamina B<sub>12</sub> bila je niža nego u usporedbi s koncentracijom betaina u rasponu 5-7 g/L, što ukazuje da je koncentracija 3-5 g/L u podlozi nedovoljna za biosintezu vitamina B<sub>12</sub>. Kada je koncentracija betaina održavana na 8-10 g/L, dobiveno je samo  $160,80 \pm 3,56$  µg/mL vitamina B<sub>12</sub> što je puno niže nego pri koncentracijama od 3-5 g/L i 5-7 g/L. Može se pretpostaviti da je smanjena proizvodnja vitamina B<sub>12</sub> pri koncentraciji 8-10 g/L povezana s većom inhibicijom rasta stanica ovom koncentracijom betaina.

Dobiveni rezultati pokazuju da je prihranjivanje betainom učinkovit pristup u proizvodnji vitamina B<sub>12</sub>, koji ne samo da smanjuje inhibiciju rasta stanica betainom nego i sprječava nedostatak betaina u podlozi potrebnog za biosintezu vitamina B<sub>12</sub>. Obzirom na rezultate određivanja učinaka tri ispitana raspona koncentracija betaina, razvijen je pristup prihranjivanja betainom u rasponu 5-7 g/L tijekom 50-140 sati fermentacije, a što se pokazalo učinkovitim i ekonomičnim za proizvodnju vitamina B<sub>12</sub> pomoću *Pseudomonas denitrificans* u fermentoru volumena 120m<sup>3</sup>.

## **6. ZAKLJUČAK**

Ovo istraživanje pokazuje da betain ima negativan učinak na rast stanica i pozitivan učinak na biosintezu vitamina B<sub>12</sub> u *Pseudomonas denitrificans*. Obzirom na učinak betaina na fermentaciju *Pseudomonas denitrificans*, prihranjivanje betainom predstavlja učinkovit pristup u cilju povećanja proizvodnje vitamina B<sub>12</sub>, a ujedno izbjegava negativne učinke betaina na rast stanica te njegovu nedostatnost u podlozi za fermentaciju tijekom biosinteze vitamina B<sub>12</sub>.

Na osnovu svega navedenog, uspostavljeno je učinkovito i ekonomično prihranjivanje betainom tijekom fermentacije *Pseudomonas denitrificans* u industrijskom fermentoru volumena 120 m<sup>3</sup>.

## **7. LITERATURA**

- Allen, L.H. (2008) Causes of vitamin B<sub>12</sub> and folate deficiency. *Food Nutr. Bull.* **29**, S20-S34.
- Andres, E., Federici, L., Affenberger, S., Vidal-Alaball J., Loukili, NH., Zimmer, J., Kaltenbach, G. (2007) B<sub>12</sub> deficiency: a look beyond pernicious anemia. *J. Fam. Pract.* **56**, 537-542.
- Ball, G.F.M. (2004) *Vitamins: Their Role in the Human Body*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Ball, G.F.M. (2006) *Vitamins in foods: Analysis, Bioavailability and Stability*, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Banerjee, R.V., Matthews, R.G. (1990) Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB* **4** 1450–1459.
- Battersby, A.R., Leeper, F.J., (1998) Biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub>. *Top.Curr. Chem.* **195**, 143-193.
- Bender, D.A. (2003) *Nutritional biochemistry of the vitamins*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Carmel, R. (1995) Malabsorption of food cobalamin. *Baillieres Clin. Haematol.* **8**, 639-655.
- Combs, G.F. (2008) *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*, Elsevier Academic Press, Burlington.
- Demain, A.L., Daniels, H.J., Schnabel, L., White, R.F., (1968) Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B<sub>12</sub> fermentation. *Nature (London)* **220**, 1324-1325.
- Friedrich, W. (1988) *Vitamins*, Walter de Gruyter, Berlin.
- Grooper, S.S., Smith, J.L., Groff, J.L. (2009) *Advanced nutrition and human metabolism*, Wadsworth Cengage Learning, Belmont.
- Herbert, V. (1988) Vitamin B<sub>12</sub>: plant sources, requirements, and assay. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**, 852-858.
- Hunik, J.H., (2002) Process for the production of vitamin B<sub>12</sub>. US Patent 6,492,141.



- Kniewald, Z. (1993) Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb, 93-97.
- Kuzminski, A.M., Del Giacco, E.J., Allen, R.H., Stabler, S.P., Lindenbaum, J. (1998) Effective treatment of cobalamin deficiency with oral cobalamin. *Blood*. **92**, 1191-1198.
- Martins, J.H., Barg, H., Warren, M.J., Jahn, D. (2002) Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 275–285.
- McDowell, L.R. (2000) *Vitamins in animal and human nutrition*, Iowa State University Press, Iowa.
- Nemet, D. (2000) Anemija i druge manifestacije nedostatka željeza, vitamina B<sub>12</sub> i folata. *Medicus*. **9**, 59-71.
- Stumpf, D.A. (1997) The Neurology of Folate and Vitamin B<sub>12</sub>. Online: <http://stumpf.org/pdf/folate-IOM.pdf>.
- Watanabe; F. (2007) Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Exp. Biol. Med.* **232**, 1266-1274.
- Warren, M.J., Raux, E., Schubert, H.L., Escalante-Semerena, J.C. (2002) The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B<sub>12</sub>). *Nat. Prod. Rep.* **19**, 390-412.
- White, R.F., Demain, A.L. (1971) Catabolism of betaine and its relationship to cobalamin overproduction. *Biochim. Biophys. Acta* **237**, 112-119.
- White, R.F., Kaplan, L., Birnbaum, J. (1973) Betaine-homocysteine transmethylase in *Pseudomonas denitificans*, a vitamin B<sub>12</sub> overproducer. *J. Bacteriol.* **113**, 218-223.
- Zempleni, J., Rucker, R.B., McCormick, D.B., Suttie, J.W. (2007) *Handbook of vitamins*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.