

ALICJA KOŚMIDER, KATARZYNA CZACZYK

WITAMINA B₁₂ – BUDOWA, BIOSYNTETA, FUNKCJE I METODY OZNACZANIA

Streszczenie

W niniejszej pracy przedstawiono aktualną wiedzę dotyczącą witaminy B₁₂ (kobalaminy), struktury i szlaków metabolicznych jej powstawania, znaczenia dla zdrowia człowieka oraz metod jej wykrywania. Przedstawiono także wyniki badań nad biotechnologiczną produkcją witaminy B₁₂. Witamina B₁₂ jest istotnym kofaktorem w metabolizmie węglowodanów, tłuszczów, aminokwasów oraz kwasów nukleinowych w organizmie człowieka. Zapobiega także występowaniu anemii złośliwej. Biosynteza kobalaminy jest domeną wyłącznie organizmów prokariotycznych. Wiele gatunków bakterii jest zdolnych do produkcji witaminy B₁₂, ale tylko dwa mają istotne znaczenie: *Propionibacterium freudenreichii* i *Pseudomonas denitrificans*.

Słowa kluczowe: witamina B₁₂, kobalamina, *Propionibacterium* sp., anemia złośliwa

Wprowadzenie

Historia odkrycia witaminy B₁₂ wiąże się z opisanym po raz pierwszy w 1835 r. zaburzeniem produkcji czerwonych krwinek, które nazwano anemią złośliwą. W 1920 r. Whipple i wsp. [94] opublikowali badania, w których dowodzili, że podawanie wątroby wykrwawionym psom przyspiesza ich powrót do zdrowia. Minot i Murphy [53] podjęli dalsze doświadczenia, próbując wyjaśnić, który ze składników wątroby jest za to odpowiedzialny. Ich eksperymenty wykazały, że oprócz żelaza, w wątrobie występuje jeszcze inna substancja warunkująca skuteczność leczenia anemii. Za badania nad niedokrwistością złośliwą Whipple, Minot i Murphy otrzymali w 1934 r. Nagrodę Nobla z dziedziny medycyny. W 1948 r. Rickes i wsp. [71] wyizolowali z wątroby czysty, krystaliczny związek o zabarwieniu czerwonym, który w dawkach kilku mikrogramów

Mgr inż. A. Kośmider, prof. dr hab. inż. K. Czaczyk, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

zapobiegał występowaniu niedokrwistości. Związek ten zawierał fosfor i kobalt – nazwano go początkowo witaminą B₁₂, a potem kobaminą [71, 85]. Budowa witaminy B₁₂ została opisana dopiero w 1956 roku przez Hodgkin (która w 1964 r. otrzymała Nagrodę Nobla w zakresie chemii za rentgenostrukturalne badania struktury substancji ważnych biochemicznie) [31].

Witamina B₁₂ należy do grupy związków zawierających w swoim składzie układ korynowy, zbudowany z czterech zredukowanych pierścieni pirolowych i umieszczonego centralnie atomu kobaltu. Jest jedyną witaminą, której synteza możliwa jest jednak tylko w komórkach bakteryjnych [49, 72]. Stanowi ona także czynnik niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka i zwierząt, zapobiegającym anemii złośliwej [38, 39].

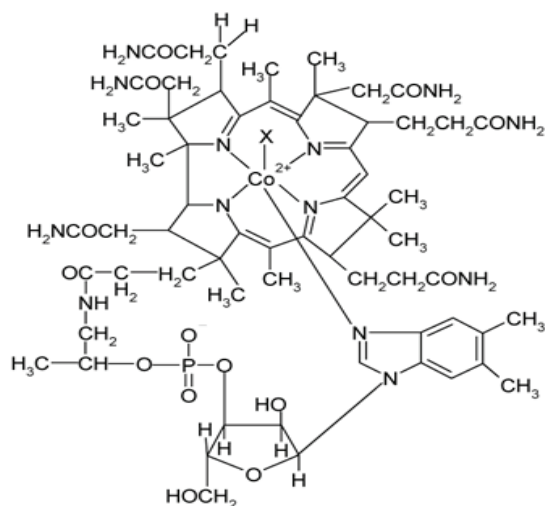
Celem niniejszej pracy jest przedstawienie najnowszych informacji o budowie witaminy B₁₂, szlakach metabolicznych jej powstawania, funkcjach w organizmie człowieka oraz metodach jej otrzymywania i oznaczania.

Budowa witaminy B₁₂

Witamina B₁₂ jest ogólną nazwą związków z grupy kobalamin, tzw. korynoidów o zbliżonej budowie chemicznej i podobnych funkcjach fizjologicznych. Obejmuje ona 4 podstawowe formy chemiczne: cyjanokobalaminę (zawierającą jako podstawnik kobaltu jon CN⁻), hydroksyl-, metylo- i dezoksyadenozylkobalaminę (zawierające odpowiednio -CH₃, -OH⁻, lub jednostkę 5'-deoksyadenozylową).

Ze względu na to, że korynoidom w ubiegłym stuleciu często nadawano nazwy, zanim poznano ich strukturę chemiczną, w 1959 r. wprowadzono nazewnictwo systematyczne tej grupy związków [86]. W 1975 r. Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) oraz Międzynarodowa Unia Biochemiczna (IUB) przyjęły obowiązującą do dzisiaj nomenklaturę korynoidów (wraz z uzupełnieniami z lat 1966 i 1973) [34-36].

Cząsteczka cyjanokobalaminy (C₈₈H₈₈O₁₄N₁₄PCo) składa się z czterech sprzężonych pierścieni pirolowych (A-D), połączonych wiązaniami w pozycji α, tworzących pierścień makrocykliczny. Trzy spośród tych wiązań łączą trzy pierścienie pirolowe poprzez mostek metionowy. Pierwszy pierścień z czwartym (A i D) jest sprzężony bezpośrednio przez wiązanie Cα-Cα. Układ ten łączy się z centralnie umiejscowionym atomem kobaltu znajdującym się na trzecim stopniu utlenienia. Nad układem makrocyklicznym znajduje się prostopadle ułożona grupa cyjanowa, a pod nim, 5,6-dimetylobenzimidazolyl (5,6-dimetylobenzimidazolo-rybozolo-3'fosforan). Oba ligandy skoordynowane są z atomem kobaltu (rys. 1.) [49, 70].

Ryc. 1. Budowa witaminy B₁₂.Fig. 1. Structure of vitamin B₁₂.

W przypadku pochodnych cyjanokobalaminy mogą występować różne ligandy kowalennie związane z atomem kobaltu nad lub pod strukturą pierścienia makrocyklicznego. Hydroksykobalamina powstaje poprzez związanie grupy -OH, a akwakobalamina dzięki połączeniu atomu wodoru z atomem kobaltu, nad strukturą pierścieni pirolowych. Pseudowitamina B₁₂ zawiera adeninę w miejscu 5,6-dimetylobenzimidazolyli, czyli pod strukturą makrocykliczną. Forma ta jest analogiem prawdziwej witaminy B₁₂, co oznacza, że zachowuje ona aktywność w komórkach bakteryjnych, lecz nie ma właściwości terapeutycznych dla ludzi [3].

W środowisku naturalnym witamina B₁₂ występuje w postaci deoksyadenozylkobalaminy (koenzymu B₁₂) i metylokobalaminy (MeCbl). Obie te formy są bardzo niestabilne w obecności światła, co objawia się zmianą widma absorpcji oraz utratą aktywności koenzymatycznej [3]. Trwałą formą witaminy B₁₂, produkowaną na skalę przemysłową i niewystępującą w przyrodzie, jest cyjanokobalamina (CNCbl) [69]. Jest ona stabilna w obecności tlenu, a w formie suchej jest także odporna na działanie wysokiej temperatury (100 °C). Wodny roztwór CNCbl o pH w zakresie 4,0 - 7,0 może być autoklawowany. Krystaliczna forma CNCbl może być bezpiecznie mieszana z różnymi środkami terapeutycznymi oraz odżywczymi. W obecności tiaminy, amidu nikotynowego lub kwasu nikotynowego powoli ulega dekompozycji. Aktywność cyjanokobalaminy zapewnia jednak dodatek niewielkich ilości żelaza lub rodanku [3].

Funkcje witaminy B₁₂ w organizmie człowieka

Organizm zdrowego człowieka pobiera witaminę B₁₂ z pożywienia. Biosynteza tej witaminy jest domeną organizmów prokariotycznych, komórki eukariotyczne jej nie wytwarzają. Cyjanokobalamina nie jest zatem naturalnym składnikiem żadnej rośliny, ale może być syntetyzowana przez mikroorganizmy zasiedlające przewód pokarmowy ssaków (głównie przeżuwaczy). Głównymi źródłami witaminy B₁₂ w diecie są produkty pochodzenia zwierzęcego, warzywa poddane procesowi fermentacji (np. „miso” – wytwarzane poprzez fermentację ziarna soi) oraz niektóre algi. Do produktów spożywczych bogatych w witaminę B₁₂ należy zaliczyć mięso przeżuwaczy, drób, ryby, skorupiaki, mleko, podroby, sery oraz jaja [58, 84].

Dobowe zapotrzebowanie człowieka dorosłego na tę witaminę wynosi ok. 2 µg, ale wytyczne co do zalecanych dawek różnią się pomiędzy krajami (np. w USA jest to 2,4 - 2,8 µg/dobę, w Niemczech 3 µg/dobę). Zalecane ilości obliczane są przy założeniu, że absorpcja witaminy wynosi 50 %. Zatem dawka 1,5 µg powinna wystarczyć, aby uniknąć u większości ludzi choćby najmniejszych oznak niedoboru tej witaminy [25]. Cyjanokobalamina jest akumulowana w tkankach zwierzęcych, zwłaszcza w wątrobie, a jej niedobory mogą wystąpić co najwyżej po 5 - 6 latach od przyjęcia ostatniej dawki. Przy normalnym spożyciu mięsa dzienne zapotrzebowanie jest z nadmiarem dostarczane, jednak problemy mogą się pojawić u wegan, wegetarian i ludzi z zaburzeniami wchłaniania w przewodzie pokarmowym [11, 47].

Wchłanianie witaminy B₁₂ odbywa się w końcowym odcinku jelita krętego w obecności glikoproteiny (tzw. czynnika wewnętrznego, czynnika Castle'a) wytwarzanej przez komórki okładzinowe żołądka [28, 46]. Kobalamina, wiążąc się z tą glikoproteina tworzy czynnik hematopoezy biorący udział w powstawaniu komórek krwi w układzie krwiotwórczym. Jest też niezbędna do prawidłowego przebiegu procesu powstawania krwinek czerwonych w szpiku kostnym (erytropoezy) oraz bierze udział w syntezie DNA i RNA w erytroblastach. Uczestniczy także w przemianach metabolicznych tłuszczów i węglowodanów oraz w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego (budowa otoczki mielinowej, tworzenie przekaźników nerwowych). Udział witaminy B₁₂ w procesach metabolicznych w organizmie człowieka dotyczy także metabolizmu DNA (przemiany puryn i pirymidyn) [38, 59]. Kobalamina jest kofaktorem dwóch enzymów: syntazy metioninowej (tworzenie metioniny z homocysteiny) i mutazy metylmalonylo-CoA (konwersja metylomalonylo-CoA do sukcyntylo-CoA) [23, 84, 92]. Bierze udział w przemianie kwasu foliowego do biologicznie aktywnego tetrahydrofolianu i razem z nim odgrywa istotną rolę w stabilności genomu człowieka. Niedobór witaminy B₁₂ zwiększa możliwość uszkodzenia DNA i zmienia jego metylację [23, 24]. Podnosi także poziom homocysteiny, co jest istotnym czynnikiem ryzyka w chorobach układu krążenia [1, 23, 78].

Głównym objawem niedoboru witaminy B₁₂ u człowieka są zaburzenia w procesie krwiotworzenia, głównie związane z niedostateczną produkcją krwinek czerwonych. Niedobór witaminy B₁₂ jest związany głównie z nieprawidłowym jej wchłanianiem jelitowym, co prowadzi do rozwoju schorzenia nazywanego anemią lub niedokrwistością (inne nazwy: anemia Addisona-Biermera, anemia złośliwa, niedokrwistość megaloblastyczna) [28, 46]. Do rozwoju niedokrwistości prowadzą także schorzenia jelita krętego lub stany po jego resekcji, brak transportowego białka osocza (transkobalaminy I lub II) oraz nadmierny wzrost mikroflory jelitowej, która zużywa witaminę B₁₂ [20].

Oprócz zahamowania krwiotworzenia, brak witaminy B₁₂ może również powodować ciężką chorobę neurologiczną, przebiegającą z porażeniem kończyn. Jej brak prowadzi także do zwiększenia ryzyka innych schorzeń układu nerwowego, takich jak zapalenia wielonerwowe, ataksja czy letarg [20, 82]. Może także powodować przedwczesną śmierć komórek [46]. Wykazano także istotną rolę kobalaminy w etiologii chorób, takich jak stwardnienie rozsiane, miażdżyca tętnic czy choroby serca [1, 39, 51, 78, 90].

Według rozporządzenia Ministra Zdrowia, z dnia 16 września 2010 r., w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności [32] witamina B₁₂ może być stosowana do wzbogacania środków spożywczych w postaci cyjanokobalaminy i hydroksykobalaminy w ilości nieprzekraczającej 50 % dziennego zapotrzebowania na ten związek.

Szlaki metaboliczne biosyntezy witaminy B₁₂

Ludzie, zwierzęta i protisty potrzebują cyjanokobalaminy do prawidłowego rozwoju, jednak nie mają zdolności do jej wytwarzania. Rośliny i grzyby również nie potrafią syntetyzować witaminy B₁₂, ale też nie pobierają jej z zewnątrz [21]. Witamina B₁₂ jest jedyną witaminą, której synteza możliwa jest jedynie w komórkach bakteryjnych i archebakteriach [49, 72].

Do biosyntezy witaminy B₁₂ *de novo* zaangażowanych jest ponad 30 genów, które stanowią ok. 1 % typowego genomu bakteryjnego [77] i obecne są u 1/3 zsekwencjonowanych genomów bakterii [69]. Obecnie znane są dwa odmienne szlaki biosyntezy kobalaminy w naturze. Jednym z nich jest tlenowa synteza, charakterystyczna dla drobnoustrojów *Pseudomonas denitrificans*, w którym aktywacji ulegają geny z prefixem *cob* [49]. Syntezę kobalaminy bez obecności tlenu wykryto u bakterii, takich jak *Bacillus megaterium* [68], *Propionibacterium shermanii* [81] i *Salmonella typhimurium* [67]. U tych bakterii w procesie biosyntezy witaminy B₁₂ zaangażowane są geny z prefixem *cbi* [49].

Adenozylokobalamina jest biosyntetyzowana z uroporfirynogenu III. Ten niesymetryczny makrocykliczny izomer powstaje z ośmiu cząsteczek kwasu 5-amino-

lewulionowego (ALA), przy udziale trzech enzymów: dehydratazy kwasu 5-aminolewulinowego (HemB), deaminazy porfobilinogenu (HemC) oraz syntetazy uroporfirynogenu III (HemD) [37]. Proces rozpoczyna się dimeryzacją cząsteczek kwasu 5-aminolewulinowego, czego efektem jest powstanie monopirolu, porfobilinogenu (PBG). W wyniku polimeryzacji czterech cząsteczek PBG powstaje liniowa postać tetrapirołu, preuroporfirynogen (hydroksymetylobilan), który następnie ulega inwersji i cyklizacji, w wyniku czego powstaje aktywny fizjologicznie uroporfirynogen III – prekursor układu korynowego [2, 45, 91]. Dekarboksylacja uroporfirynogenu III prowadzi do syntezy hemu i chlorofilu, jednak w wyniku działania metylotransferazy uroporfirynogenu III, związek ten ulega metyzacji w pozycji C-2 i C-7, tworząc „prototyp” pierścienia korynowego (ang. precorrin-2) [7, 93]. Od tego momentu biosynteza witaminy B₁₂ w warunkach tlenowych oraz beztlenowych jest odmienna. Na drodze tlenowej pierścień ten ulega metyzacji w pozycji C-20. Szlak beztlenowy rozpoczyna się od włączenia do pierścienia kobaltu. W obecności tlenu, wytworzenie tego chelatu następuje dopiero po kolejnych dziewięciu reakcjach. Ciekawym zjawiskiem jest występowanie dwóch różnych chelataz, w zależności od warunków przemian biochemicznych. W szlaku tlenowo-zależnym, chelataza kobaltu ulega aktywacji tylko przy udziale energii pochodzącej z adenosynotryfosforanu (ATP), w przeciwieństwie do chelatazy wykorzystywanej w warunkach beztlenowych, której działanie nie jest uzależnione od ATP. Kolejnym etapem biosyntezy witaminy B₁₂ jest proces kontrakcji pierścienia korynowego, związany z usunięciem węgla C-20. W warunkach tlenowych atom węgla C-20, zostaje utleniony przez tlen cząsteczkowy i wydalony w postaci octanu. W warunkach beztlenowych zawężanie pierścienia możliwe jest dzięki obecności w centrum struktury jonu kobaltu, zdolnego do przyjęcia różnych stopni utlenienia. Uczestniczy on w procesie oksydacji, czego wynikiem jest usunięcie atomu węgla C-20, w postaci aldehydu octowego. Efektem kontrakcji pierścienia korynowego, zarówno w szlaku tlenowym, jak i beztlenowym jest konwersja do kobinamidu poprzez związanie aminopropanolu z resztą kwasu propionowego, znajdującą się przy łańcuchu bocznym pierścienia D. Powstanie nukleotydu znajdującego się pod pierścieniem makrocyclicznym następuje poprzez przeniesienie reszty fosforybozylowej mononukleotydu kwasu nikotynowego na cząsteczkę 5,6-dimetylobenzimidazolu. Powstały w wyniku tych przemian α -rybazol zostaje kowalentnie związany z aktywowanym przez guanozynodifosforan (GDP) adenozylokobinamidem, w następstwie czego uwalnia się guanozynomonofosforan (GMP). Efektem wszystkich tych przemian jest powstanie kompletnej formy adenozylokobalaminy (koenzymu B₁₂) [12, 49, 69, 80].

Produkcja witaminy B₁₂ na skalę przemysłową

W 1973 r. Woodward i Eschenmoser dokonali chemicznej syntezy witaminy B₁₂. Ta skomplikowana synteza, obejmująca ponad 70 przemian chemicznych, jest jednak

zbyt droga i trudna technicznie, aby mogła być wykorzystana na skalę przemysłową [22, 49, 95]. Obecnie kobalamina produkowana jest jedynie na drodze mikrobiologicznej przy użyciu wyselekcjonowanych i/lub genetycznie zmodyfikowanych drobnoustrojów [5, 6, 62].

Naturalnymi producentami kobalaminy są mikroorganizmy przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt oraz drobnoustroje występujące w glebie, nawozach naturalnych i ściekach [4]. Do efektywnej biosyntezy witaminy B₁₂ zdolne są bakterie z rodzajów: *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Protaminobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces* oraz *Xanthomonas* [6, 49, 61, 57, 63, 73, 76, 79].

W celu selekcji wysoko wydajnych szczepów stosuje się czynniki mutagenne np. promieniowanie UV, etylenoiminę, nitrozometylouretan lub N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidynę. Pod uwagę bierze się takie wyróżniki, jak: produktywność, stabilność genetyczna szczepów, tempo wzrostu oraz oporność na wysokie stężenia toksycznych metabolitów pośrednich obecnych w medium hodowlanym [10, 49]. Badania molekularne dotyczące zwiększenia efektywności biosyntezy witaminy B₁₂ przez drobnoustroje doprowadziły do wyizolowania szeregu enzymów odpowiedzialnych za tworzenie się tego związku [62]. Szlaki metaboliczne na których syntetyzowana jest witamina B₁₂ zostały scharakteryzowane w przypadku bakterii *Pseudomonas denitrificans* [6], *Salmonella typhimurium* [76] oraz *Propionibacterium freudenreichii* [73, 79]. Geny odpowiedzialne za biosyntezę witaminy B₁₂ lub jej prekursorów zostały wyizolowane także dla rodzaju *Rhodobacter* [57, 63, 64].

Ze względu na naturalnie wysoką zdolność wytwarzania witaminy B₁₂ oraz szybki wzrost, w przemysłowej produkcji kobalaminy stosuje się głównie bakterie należące do gatunków: *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii* oraz *Pseudomonas denitrificans* [49, 74].

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* zdolne są do biosyntezy witaminy B₁₂ w przestrzeni międzykomórkowej oraz kwasu propionowego i kwasu octowego zewnątrzkomórkowo [54]. Są one mikroaerofilami i produkują witaminę B₁₂ tylko w obecności niewielkich ilości tlenu, aby możliwa była synteza 5,6-dimetylobenzimidazolu (DMBI) - prekursora witaminy B₁₂. Dlatego proces powstawania kobalaminy podzielony jest na dwa etapy. Pierwsza faza odbywa się w warunkach beztlenowych w celu wytworzenia kobinamidu. W drugiej fazie niewielki dostęp tlenu pozwala bakteriom zsyntetyzować DMBI i wytworzyć witaminę B₁₂. Optymalne warunki procesu to 30 °C i pH środowiska w zakresie 6,0 - 7,0 [4, 49, 54]. Głównym problemem w produkcji kobalaminy przez bakterie propionowe jest powstawanie kwasów organicznych i innych metabolitów, powodujących zahamowanie wzrostu komórki. Konieczne jest ich usunięcie, aby zwiększyć przyrost biomasy i tym samym produktywność witaminy [54].

W celu usunięcia kwasu propionowego i kwasu octowego z płynu hodowlanego stosowano m.in. filtrację krzyżowo-przepływową [29], fermentację połączoną z oczyszczaniem w kolumnie absorpcyjnej z węglem aktywnym [56], fermentację ekstrakcyjną [40], elektrodializę [97] oraz komórki immobilizowane [14 -18, 96].

W celu zwiększenia produktywności witaminy B₁₂ przez bakterie *Propionibacterium freudenreichii*, Piao i wsp. [62] dokonali ekspresji genów należących do rodzin *hem*, *cob* i *cbi* biorących udział w procesie biosyntezy kobalaminy. Stwierdzono, że rekombinowany klon *Propionibacterium freudenreichii*, zawierający wektor ekspresyjny pPK705 z insertem *cobA*, *cbiLF* lub *cbiEGH* produkował odpowiednio o 1,7-, 1,9-, i 1,5-krotnie więcej witaminy B₁₂ niż mikroorganizmy niezawierające żadnego z klonowanych genów w wektorze pPK705. Badacze wklonowali także w wektor ekspresyjny gen *hemA* wyizolowany z komórek *Rhodobacter sphaeroides* i endogenne geny *hemB* i *cobA*. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano 2,2-krotnie więcej witaminy B₁₂ niż w przypadku wykorzystania *Propionibacterium freudenreichii* zawierającego wektor pPK705.

Niektóre gatunki rodzaju *Propionibacterium* (np. *Propionibacterium freudenreichii*) mają status GRAS (ogólnie uznawany za bezpieczny, ang. *Generally Recognized As Safe*). Pomimo tego firma Aventis – lider w produkcji witaminy B₁₂, preferuje wykorzystanie *Pseudomonas denitrificans*, który tego statusu nie ma [50]. W przeciwieństwie do bakterii propionowych, proces biosyntezy B₁₂ przez *Pseudomonas denitrificans* odbywa się całkowicie w warunkach tlenowych. W wyniku połączenia zabiegów mutagenizacji z jednoczesnym zastosowaniem narzędzi inżynierii genetycznej, grupa naukowców z Rhône-Poulenc-Rorer (RPR) stworzyła wysoce efektywny szczep *Pseudomonas denitrificans*, za pomocą którego możliwa jest produkcja witaminy B₁₂ na poziomie 300 mg/l [6]. W europejskim patencie 0516647 B1 Blanche i wsp. [7] opisują amplifikację 8 genów operonu *cobF-cobM*, w wyniku której zanotowano 30 % wzrost produkcji kobalaminy. Dodatkowo wzrost liczby kopii genu *cobA* i *cobE* powoduje zwiększenie produktywności witaminy B₁₂ o kolejne 20 %. Wykorzystanie genetycznie modyfikowanych mutantów *Pseudomonas denitrificans* pozwoliło naukowcom z RPR opracować proces efektywnej produkcji witaminy B₁₂ pokrywający 80 % światowego zapotrzebowania [49].

Użycie drobnoustrojów modyfikowanych genetycznie do produkcji metabolitów wykorzystywanych w profilaktyce zdrowia ludzi budzi jednak szereg kontrowersji. W związku z tym od wielu lat prowadzone są badania nad optymalizacją biosyntezy witaminy B₁₂ z wykorzystaniem mikroorganizmów niepoddanych modyfikacjom genetycznym. Badania te dotyczą głównie poszukiwania szczepów charakteryzujących się wysoką wydajnością tego metabolitu, doboru źródła węgla w pożywce hodowlanej, suplementacji pożywek, sposobu prowadzenia hodowli itp. Jednak uzyskane dotychczas wydajności nie są duże (tab. 1).

Tabela 1

Wydajność biosyntezy witaminy B₁₂ w różnych typach hodowli.
Biosynthesis yield of vitamin B₁₂ in different types of its culture.

Mikroorganizmy Micro-organisms	Rodzaj hodowli Type of culture	Rodzaj substratu Type of substrate	Maksymalna w wydajność procesu Maximum process yield	Literatura Literature
<i>Propionibacterium shermanii</i>	okresowa / batch	namok kukurydziany corn soak	1,99 mg/l	[60]
<i>Propionibacterium shermanii</i>	okresowo-dolewowa fed-batch	Glukoza / glucose	52 mg/l (0,23 mg/g s.m.) (0,23mg/g d.m.)	[29]
<i>Butylibacterium methylotrophicum</i>	okresowo-dolewowa fed-batch	Pepton / peptone	92,5 mg/l (2 mg/g s.m.) (2mg/g d.m.)	[29]
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	ciągła / continuous	melasa trzcinowa cane molasses sacharoza/ sucrose	34,8 mg/l 33,0 mg/l	[65]
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	immobilizacja w alginianie immobilization in alginate	Glukoza / glucose	4,3 mg/l	[18]
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	hodowla mieszana z <i>Ralstonia eutrophia</i> mixed culture with <i>Ralstonia eutrophia</i>	pepton z dodatkiem hydrolizatów kazeiny peptone with casamino acids addition	19 mg/ml	[54]
<i>Propionibacterium shermanii</i>	okresowa / batch	ciecze pofermentacyjne (fermentacja mlekowa) post-fermentation liquid (lactic acid fermentation)	1,8 µg/l	[27]
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	ciągła / continuous	glukoza (suplementacja betainą) / glucose (betaine feeding)	177,49 mg/l	[42]
<i>Lentinula edodes</i>	okresowa / batch	melasa buraczana beet molasses glukoza / glucose	11,2 µg/g s.m. 11,2 2 µg/g d.m. 11,9 µg/g s.m./ 11,9 µg/g d.m.	[89]

Metody oznaczania witaminy B₁₂

Podstawowe techniki oznaczania witaminy B₁₂ w materiale mikrobiologicznym opracowano w latach 50. XX w. Przez wiele lat poziom kobalaminy w badanej próbie, możliwy był do wykrycia tylko przy użyciu metod mikrobiologicznych. Do tego celu wykorzystywano drobnoustroje *Lactobacillus leichmannii* [83, 88], *Euglena gracilis* [55, 75], *Ochromonas malhamensis* [26] oraz *Escherichia coli* 113-3 [9, 19]. Przy użyciu tych metod możliwe jest jednak oznaczenie sumy korynoidów, a więc oprócz biologicznie aktywnej formy witaminy B₁₂, także jej analogów oraz innych związków zawierających pierścień korynowy. Analogi te wykazują aktywność witaminy B₁₂ w komórkach bakteryjnych, lecz nie mają jej w metabolizmie ludzi i zwierząt. Stosując metody spektrofotometryczne analogi te, przy tej samej długości fali, mają takie samo maksimum absorpcji jak witamina B₁₂, co może być przyczyną błędów w oznaczeniu jej prawdziwego stężenia [66]. Obecnie, w celu określenia poziomu witaminy B₁₂ wytworzonej przez drobnoustroje w procesach mikrobiologicznych stosuje się techniki chromatograficzne, dzięki którym możliwe jest rozdzielenie powstałych korynoidów i pomiar ilości każdego związku oddzielnie [41, 48, 87].

W diagnostyce laboratoryjnej coraz rzadziej określa się zdolność wchłaniania witaminy B₁₂ za pomocą testu Schillinga na rzecz w pełni zautomatyzowanych technik immunometrycznych, określających całkowite stężenie witaminy B₁₂ [8, 33]. Innym testem diagnostycznym jest oznaczanie kwasu metylomalonowego w moczu lub surowicy, który jako marker metaboliczny ulega podwyższeniu przy niedoborze kobalaminy. Oznaczenie to jest wprawdzie parametrem bardzo czułym, ale cechuje się wysokim kosztem i zawyżoną wartością w przypadku niewydolności nerek [44].

Nową metodą pomiaru poziomu witaminy B₁₂ w organizmie człowieka jest oznaczanie holotranskobalaminy (holoTC, kobalamina związana z TCII), tzw. „aktywnej witaminy B₁₂”. Test ten polega na oznaczaniu kompleksu witamina B₁₂-TCII, który rozpoznawany jest przez receptory tkankowe i stanowi jedyny rezerwuuar kobalaminy możliwy do wykorzystania przez komórki. Technika ta znalazła zastosowanie głównie w przypadkach stężenia witaminy B₁₂ na poziomie 200 - 300 pg/ml [30, 33]. Herman i wsp. [30], badając zależność pomiędzy zmniejszaniem zapasów kobalaminy w organizmie a dostępnością holotranskobalaminy, doszli do wniosku, że oznaczenia holoTC oraz kwasu metylomalonowego w pełnijszy sposób obrazuje poziom witaminy B₁₂ niż jej całkowite stężenie. Inni autorzy wykazują jednak swoistą równorzędność diagnostyczną pomiędzy pomiarem całkowitego stężenia witaminy B₁₂ a testem holoTC [13, 43, 52].

Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawiono aktualną wiedzę dotyczącą budowy witaminy B₁₂, szlaków metabolicznych jej powstawania, funkcji w organizmie człowieka oraz metod jej otrzymywania i oznaczania. Witamina B₁₂ jest jedyną witaminą, której biosynteza jest możliwa tylko w komórkach prokariotycznych. Ze względu na jej ważne funkcje w organizmie człowieka istotne jest dokładne poznanie budowy tego związku i jego analogów oraz ich aktywności terapeutycznej, ustalenie szlaków metabolicznych ich powstawania i identyfikacja genów odpowiedzialnych za biosyntezę tych związków. Obecnie do produkcji witaminy B₁₂ na skalę przemysłową wykorzystuje się drobnoustroje modyfikowane genetycznie (*Pseudomonas denitrificans*), co przy jej zastosowaniu w profilaktyce zdrowia ludzi budzi kontrowersje. Prowadzone od wielu lat poszukiwania mikroorganizmów zdolnych do jej produkcji z dużą wydajnością, przy użyciu tanich i łatwo dostępnych substratów, z zastosowaniem różnych metod prowadzenia hodowli, jak dotychczas, nie dały zadowalających rezultatów.

Literatura

- [1] Aleman G., Tovar A.R., Torres N.: Homocysteine metabolism and risk of cardiovascular diseases: importance of the nutritional status on folic acid, vitamins B6 and B₁₂. *Rev. Invest. Clin.*, 2001, **53** (2), 141-151.
- [2] Battersby A.R.: Tetrapyrroles: the pigments of life. *Nat. Prod. Rep.*, 2000, **17**, 507-526.
- [3] Beck W.S.: Cobalamin (Vitamin B₁₂). In: *Handbook of Vitamins*, 3d ed. Rucker R.B., Suttie J.W., McCormick D.B., Machlin L.J. Eds, Marcel Dekker Inc., New York 2001, pp. 466-476.
- [4] Bednarski W., Fiedurek J. (pod red.): *Podstawy biotechnologii przemysłowej*. WNT, Warszawa, 2007, s. 448-449.
- [5] Blanche F., Cameron B., Crouzet J., Debussche L., Levy-Schil S., Thibaut D.: Rhône- Poulenc Biochimie. Eur. Patent 0516647 B1, 1998.
- [6] Blanche F., Cameron B., Crouzet J., Debussche L., Thibaut D., Vuilhorgne M., Lepper F.J., Battersby A.R.: Vitamin B₁₂: how the problem of its biosynthesis was solved. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 383-411.
- [7] Blanche F., Debussche L., Thibaut D., Crouzet J., Cameron B.: Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: uroporphyrinogen III methyltransferase from *Pseudomonas denitrificans*. *J. Bacteriol.*, 1989, **171**, 4222-4231.
- [8] Bobilewicz D.: Nowe spojrzenie na witaminę B₁₂. *Abbott Voice*, 2003, **3**, 2-3.
- [9] Burkholder P.R.: Determination of vitamin B₁₂ with a mutant strain of *Escherichia coli*. *Science*, 1951, **114**, 459-460.
- [10] Bykhovsky V.Y., Zaitseva N.I., Eliseev A.A.: Tetrapyrroles: diversity, biosynthesis, and biotechnology. *Appl. Biochem., Microbiol.*, 1998, **34**, 1-18.
- [11] Camilleri M.: Integrated upper gastrointestinal response to food intake. *Gastroent.*, 2006, **131**, 640-658.
- [12] Cheong C.-G., Escalante-Semerena J.C., Rayment I.: Structural investigation of the biosynthesis of alternative lower ligands for cobamides by nicotinate mononucleotide: 5,6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase from *Salmonella enterica*. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 37612-37620.

- [13] Clarke R., Sherliker P., Hin H., Nexo E., Hvas A.M., Schneede J.: Detection of vitamin B₁₂ deficiency in older people by measuring vitamin B₁₂ or the active fraction of vitamin B₁₂, holotranscobalamin. *Clin. Chem.*, 2007, **53**, 963-970.
- [14] Czaczyk K., Trojanowska K., Wiszumirska E.: Hydrolyzed whey as a medium for propionic acid fermentation. *Acta Biotechnol.*, 1996, **16**, 175-183.
- [15] Czaczyk K., Albrecht A., Mroczkowski A., Trojanowska K.: Mechanical stability of carrageenan and carrageenan/locust bean gum gels used for immobilization of propionic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 1997, **53**, 13-20.
- [16] Czaczyk K., Trojanowska K., Stachowiak B.: The effect of immobilization of propionic acid bacteria in alginate gel on the course of fermentation. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997, **4**, 55-60.
- [17] Czaczyk K., Trojanowska K.: Batch propionic acid fermentation using *Propionibacterium* sp. immobilized in different supports. *Biotechnologia*. 1998, **1 (40)**, 188-198.
- [18] Czaczyk K., Trojanowska K., Grajek W.: The influence of a specific microelemental environment in alginate gel beads on the course of propionic acid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, **48**, 630-635.
- [19] Davis B.D., Mingioli E.S.: Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.*, 1950, **60**, 17-28.
- [20] Dharmarajan T.S., Adiga G.U., Norkus E.P.: Vitamin B₁₂ deficiency. Recognizing subtle symptoms in older adults. *Geriatr.*, 2003, **58**, 30-34.
- [21] Duda J., Pędziwilk Z., Zodrow K.: Studies on the vitamin B₁₂ content of leguminous plants. *Acta Microbiol. Pol.*, 1967, **6**, 233-238.
- [22] Eschenmoser A.: Organische naturstoffsynthese heute, vitamin B₁₂ als beispiel. *Naturwissenschaften.*, 1974, **61**, 513-525.
- [23] Fenech M.: The role of folic acid and vitamin B₁₂ in genomic stability of human cells. *Mutat. Res.*, 2001, **475**, 57-67.
- [24] Figlin E., Chetrit A., Shahar A., Shpilberg O., Zivelin A., Rosenberg N., Brok-Simoni F., Gadoth N., Sela B-A., Seligsohn U.: High prevalences of vitamin B₁₂ and folic acid deficiency in elderly subjects in Israel. *Br. J. Haematol.*, 2003, **123**, 696-701.
- [25] Food and Nutrition Board, Institute of Medicine.: Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamins B₆, folate, vitamins B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, DC, National Academy Press., 1998.
- [26] Ford J. E.: The microbiological assay of "vitamin B₁₂". The specificity of the requirement of *Ochromonas malhamensis* for cyanocobalamin. *Br. J. Nutr.*, 1953, **7**, 299-306.
- [27] Gradner N., Champagne C.P.: Production of *Propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B₁₂ on spent Media. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **99**, 1236-1245.
- [28] Hammerschmidt D.E.: A landmark article in translational medicine: Robert Schilling and intrinsic factor. *J. Lab. Clin. Med.*, 2004, **144 (5)**, 225-226.
- [29] Hatanaka H., Wang E., Taniguchi M., Iijima S., Kobayashi T.: Production of vitamin B₁₂ by a fermentor with a hollow-fiber module. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **27**, 470-473.
- [30] Herman W., Obeid R., Schorr H., Geisel J.: Functional vitamin B₁₂ deficiency and determination of holotranscobalamin in population at risk. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, **41 (11)**, 1478-1488.
- [31] Hodgkin D.C., Kamper J., MacKay M., Pickworth J., Trueblood K.N., White J.G.: Structure of vitamin B₁₂. *Nature*. 1956, **178**, 64-66.
- [32] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności. *Dz. U.* 2010 r. Nr 174, poz. 1184.
- [33] Hvas A.M., Nexo E.: Holotranscobalamin as a predictor of vitamin B₁₂ status. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, **41**, 1489-1492.

- [34] IUPAC-IUB.: Tentative rules: nomenclature and symbols for folic acid and related compounds. J. Biol. Chem., 1966, **241**, 2991-1992.
- [35] IUPAC-IUB.: The nomenclature of corrinoids (rules approved 1975). Pure Appl. Chem., 1976, **48**, 495-502.
- [36] IUPAC-IUB.: The nomenclature of corrinoids. Biochemistry, 1974, **13**, 1555-1560.
- [37] Jordan P.M.: Highlights in hem biosynthesis. Curr. Opin. Struct. Biol., 1994, **4**, 902-911.
- [38] Knasmüller S., Verhagen H.: Impact of dietary on cancer causes and DNA integrity: new trends and aspects. Food Chem. Toxicol., 2002, **40**, 1047-1050.
- [39] Kolling K., Ndrepepa G., Koch W., Braun S., Mehilli J., Schoming A., Kastrati A.: Methylene-tetrahydrofolate reductase gene *C677T* and *A1298C* polymorphism, plasma homocysteine, folate and vitamin B₁₂ levels and the extent of coronary artery disease. Am. J. Cardiol., 2004, **93** (10), 1201-1206.
- [40] Lewis V., Yang S.-T.: A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose. Biotechnol. Bioeng., 1992, **8**, 104-110.
- [41] Li H.-B., Chen F., Jiang Y.: Determination of vitamin B₁₂ in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chrom. A., 2000, **891** (2), 243-247.
- [42] Li K.-T., Liu D.-H., Li Y.-L., Chu J., Wang Y.-H., Zhuang Y.-P., Zhang S.-L.: Improved large-scale production of vitamin B₁₂ by *Pseudomonas denitrificans* with betaine feeding. Biores. Technol., 2008, **99**, 8516-8520.
- [43] Lindgren A., Kilander A., Bagge E., Nexø E.: Holotranscobalamin - a sensitive marker of cobalamin malabsorption. Eur. J. Clin. Invest., 1999, **29**, 321-329.
- [44] Lorenzl S., Vogeser M., Müller-Schunk S., Pfister H.W.: Clinically and MRI documented funicular myelosis in a patient with metabolic vitamin B₁₂ deficiency but normal vitamin B₁₂ serum level. J. Neurol., 2003, **250**, 1010-1011.
- [45] Louie G., Brownlie P., Lambert R., Cooper J.B., Blundell T.L., Wood S.P., Warren M.J., Woodcock S.C., Jordan P.M.: Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. Nature., 1992, **359**, 33-39.
- [46] Luggen A.S.: Gerontologic nurse practitioner care guidelines: vitamin B₁₂ deficiency in older adults. Geriatr. Nurs., 2006, **27** (1), 32-33.
- [47] Lukaski H.C.: Vitamin and mineral status: effect on physical performance. Nutr., 2004, **20**, 632-644.
- [48] Luo X., Chen B., Ding L., Tang F., Yao S.: HPLC-ESI-MS analysis of vitamin B₁₂ in food products and in multivitamins-multimineral tablets. Anal. Chim. Acta, 2006, **562** (2), 185-189.
- [49] Martens J.-H., Barg H., Warren M.J., Jahn D.: Microbial production of vitamin B₁₂. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, **58**, 275-285.
- [50] Meile L., Gwenaëlle L.B., Thierry A.: Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. Int. J. Food Microbiol., 2008, **126**, 316-320.
- [51] Miller A., Korem M., Almong R., Glaboz Y.: Vitamin B₁₂, demyelination, remyelination and repair in multiple sclerosis. J. Neurol. Sci., 2005, **233**, 93-97.
- [52] Miller J.W., Garrod M.G., Rockwood A.L., Kushnir M.M., Allen L.H., Haan M.N., Green R.: Measurement of total vitamin B₁₂ and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B₁₂ deficiency. Clin. Chem., 2006, **52**, 278-285.
- [53] Minot G.R., Murphy W.P.: Treatment of pernicious anemia by a special diet. J. Am. Med. Assoc. (JAMA), 1926, **87**, 470-476.
- [54] Miyano K., Ye K., Shimizu K.: Improvement of vitamin B₁₂ fermentation by reducing in the inhibitory metabolites by cell recycle system and mixed culture. J. Biochem Eng., 2000, **6**, 207-214.

- [55] Mollin D.L., Ross G.I.M.: The vitamin B₁₂ concentrations of serum and urine of normals and of patients with megaloblastic anaemias and other diseases. *J. Clin. Pathol.*, 1952, **5**, 129-139.
- [56] Nakano K., Kataoka H., Matsumara M.: High density culture of *Propionibacterium freudenreichii* coupled with propionic acid removal system with activated charcoal. *J. Ferment. Bioeng.*, 1996, **81**, 37- 41.
- [57] Neidle E.L., Kaplan S.: Expression of the *Rhodobacter sphaeroides hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. *J. Bacteriol.*, 1993, **175**, 2292-2303.
- [58] Ortigues-Marty I., Thomas E., Prévéraud D.P., Girard C.L., Bauchart D., Durand D., Peyron A.: Influence of maturation and cooking treatments on the nutritional value of bovine meats: Water losses and vitamin B₁₂. *Meat Sci.*, 2006, **73**, 451-458.
- [59] Paoloni-Giacombino A., Grimble R., Pichard C.: Genetics and nutrition. *Clinic. Nutr.*, 2003, **22** (5), 429-435.
- [60] Perez-Mendoza J.L., Garcia-Fernandez F.: Fermentation of a waste product from the industrial processing of the lime for the vitamin B₁₂ production. *Biotechnol. Lett.*, 1983, **5** (4), 259-264.
- [61] Perlman D.: Microbial synthesis of cobamides. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1959, **1**, 87-122.
- [62] Piao Y., Yamashita M., Kawaraichi N., Asegawa R., Ono H., Murooka Y.: Production of vitamin B₁₂ in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2004, **98** (3), 167-173.
- [63] Pollich M., Klug G.: Identification and sequence analysis of genes involved in late steps in cobalamin (vitamin B₁₂) synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 4481-4487.
- [64] Pollich M., Wersig C., Klug G.: The *bluF* gene of *Rhodobacter capsulatus* is involved in conversion of cobinamide to cobalamin (vitamin B₁₂). *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 7308-7310.
- [65] Quesada-Chanto A., Afschar A.S., Wagner F.: Microbial production of propionic acid and vitamin B₁₂ using molasses or sugar. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **41**, 378-383.
- [66] Quesada-Chanto A., Schmid-Meyer C., Schroeder A.G., Fuchter A., Carvalho-Jonas M.F., Koehntopp P.I., Jonas R.: Comparison of methods for determination of vitamin B₁₂ in microbial material. *Biotechnol Tech.*, 1998, **12** (1), 75-77.
- [67] Raux E., Lanois A., Levillayer F., Warren M.J., Brody E., Rambach A., Thermes C.: *Salmonella typhimurium* cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes: functional studies in *S. typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 753-767.
- [68] Raux E., Lanois A., Rambach A., Warren A., Hermes C.: Cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis: identification and characterization of *Bacillus megaterium cobI* operon. *Biochem J.*, 1998, **335**, 159-166.
- [69] Raux E., Schubert H.J., Warren M.J.: Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂): a bacterial conundrum. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, **57**, 1880-1893.
- [70] Raux E., Schubert H.L., Roper J.M., Wilson K.S., Warren M.J.: Vitamin B₁₂: Insights into biosynthesis's mount improbable. *Bioorg. Chem.*, 1999, **27**, 100-118.
- [71] Rickes E.L., Brink N.G., Koniuszy F.R., Wood T.R., Folkers K.: Crystalline vitamin B₁₂. *Science*, 1948, **107** (2781), 396-397.
- [72] Rodionov D.A., Vitreschak A.G., Mironov A.A., Gelfand M.S.: Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. *J. Biol. Chem.*, 2003, **278** (42), 41148-41159.
- [73] Roessner C.A., Huang K.X., Warren M.J., Raux E., Scott A.I.: Isolation and characterization of 14 additional genes specifying the anaerobic biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂) of *Propionibacterium freidenreichii* (*P. shermani*). *Microbiology*, 2002, **148**, 1845- 1853.
- [74] Roman R.V., Iluc E., Mustea A., Neacsu A., Asandului V.: Optimisation of medium components in vitamin B₁₂ biosynthesis. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 2001, **6**, 343-350.
- [75] Ross G.I.M.: Vitamin B₁₂ assay in body fluids. *Nature*, 1950, **166**, 270-271.

- [76] Roth J.R., Lawrence J.G., Bobik T.A.: Cobalamin (coenzyme B₁₂): synthesis and biological significance. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1996, **50**, 137-181.
- [77] Roth J.R., Lawrence J.G., Rubenfield M., Dieffer- Higgins S., Church G.M.: Characterization of cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1993, **175**, 3303-3316.
- [78] Sali A., Vitetta L.: Nutritional supplements and cardiovascular disease. *Heart Lung Circ.*, 2004, **13**, 363-366.
- [79] Sattler I., Roessner C.A., Stolowich N.J., Hardin S.H., Haris-Haller L.W., Yokubaitis N.T., Murooka Y., Hashimoto Y., Scott A.I.: Cloning, sequencing, and expression of the uroporphyrinogen III methyltransferase *cobA* gene of *Propionibacterium freidenreichii* (*shermani*). *J. Bacteriol.*, 1995, **177**, 1564-1569.
- [80] Scott A.I., Roessner C.A.: Biosynthesis of cobalamin (vitamin B₁₂). *Biochem. Soc. Trans.*, 2002, **30**, 613-620.
- [81] Scott A.I.: The discovery of nature's pathway to vitamin B₁₂. A 25 year Odyssey. *Tetrahedron*, 1994, **50**, 13315-13333.
- [82] Seiler W.O.: Clinical pictures of malnutrition in ill elderly subjects. *Nutr.*, 2001, **17**, 496-498.
- [83] Skeggs H.R., Huff J.W., Wright L.D., Bosshardt D.K.: The use of *Lactobacillus leichmannii* in the microbiological assay of the "animal protein factor". *J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 1450-1455.
- [84] Smith A.G., Croft M.T., Moulin M., Webb M.E.: Plants need their vitamins too. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2007, **10**, 266-275.
- [85] Smith E.L., Parker L.F.J.: Purification of antipernicious anaemia factor. *Biochem. J.*, 1948, **43**, VIII.
- [86] Smith E.L.: Vitamin B₁₂. 3d ed., Wiley, New York 1965.
- [87] Snow C.F.: Laboratory diagnosis of vitamin B₁₂ and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch. Intern. Med.*, 1999, **159**, 1289-1298.
- [88] Thompson H.T., Dietrich L.S., Elvehjem C.A.: The use of *Lactobacillus leichmannii* in the estimation of vitamin B₁₂ activity. *J. Biol. Chem.*, 1950, **184**, 175-180.
- [89] Turło J., Gutkowska B., Herold F., Krzyczkowski W., Błażewicz A., Kocjan R.: Optimizing vitamin B₁₂ biosynthesis by mecelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. *Enzym. Microb. Technol.*, 2008, **43**, 369-374.
- [90] Visioli F., Hagen T.M.: Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. *Pharm. Res.*, 2007, **55**, 199-206.
- [91] Warren M.J., Cooper J.B., Woods S.P., Shoolingin-Jordan P.M.: Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem. Sci.*, 1998, **23**, 217-221.
- [92] Warren M.J., Raux E., Schubert H.L., Escalante-Semerena J.C.: The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B₁₂). *Nat. Prod. Rep.*, 2002, **19**, 390-412.
- [93] Warren M.J., Roessner C.A., Santander P.J., Scott A.I.: The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes S-adenosyl-methionine-dependent uroporphyrinogen III methylase. *Biochem. J.*, 1990, **165**, 725-729.
- [94] Whipple G.H., Robscheit F.S., Hooper C.W.: Blood regeneration following simple anemia. IV. Influence of meat, liver and various extractives, alone or combined with standard diets. *Am. J. Physiol.*, 1920, **53**, 236-262.
- [95] Woodward R.B.: The total synthesis of vitamin B₁₂. *Pure Appl. Chem.*, 1973, **33**, 145-177.
- [96] Yang S.-T., Huang Y.: A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, **45**, 379-386.
- [97] Zhang S.-T., Matsuoka H., Toda K.: Production and recovery of propionic and acetic acid in electro-dialysis culture of *Propionibacterium shermani*. *J. Ferment. Bioeng.*, 1993, **75**, 276-282.

VITAMIN B₁₂ - STRUCTURE, BIOSYNTHESIS, FUNCTIONS, AND METHODS OF DETERMINATION

S u m m a r y

In the paper, the currently available studies are presented, which deal with the vitamin B₁₂ (cobalamin), its structure, the biochemical pathways of its biosynthesis, its importance for human health, as well as with the methods of determining it. In addition, research results into the biotechnological production of vitamin B₁₂ are reported. The vitamin B₁₂ is an important co-factor for the metabolism of carbohydrates, lipids, amino acid, and nucleic acids in the human body. It is also an anti- pernicious anaemia factor. The cobalamin biosynthesis is almost exclusively restricted to the prokaryotic organisms. Many bacterial species are able to synthesize vitamin B₁₂, but only appear significantly important: *Propionibacterium freudenreichii* and *Pseudomonas denitrificans*.

Key words: vitamin B₁₂, cobalamin, *Propionibacterium* sp., pernicious anaemia ☒

XL Sesja Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk „Tradycja i nowoczesność w żywności i żywieniu”

Tematyka sesji

- Właściwości i ocena jakości surowców i produktów
- Innowacyjność w produkcji żywności
- Produkty tradycyjne i regionalne a współczesny przemysł i konsument

Informacje

<http://latwnoz.sggw.pl/index.php>

Adres Komitetu organizacyjnego:

e-mail: konferencja_knos@sggw.pl

lub

Wydział Nauki o Żywności

XL Sesja Komitetu Nauk o Żywności Polskiej Akademii Nauk

„Tradycja i nowoczesność w żywności i żywieniu”

ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa