



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Romana ČERNE

VITAMIN B₁₂ – VIRI IN VPLIV NA ZDRAVJE

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Romana ČERNE

VITAMIN B₁₂ – VIRI IN VPLIV NA ZDRAVJE

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

VITAMIN B₁₂ – SOURCES AND EFFECT ON HEALTH

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Živilstvo in prehrana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo, univerzitetni študijski program prve stopnje Živilstvo in prehrana je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Marka Krefta in za recenzenta prof. dr. Janeza Salobirja.

Mentor: prof. dr. Marko KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzent: prof. dr. Janeza SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentor:

Recenzent:

Datum zagovora:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 577.164.1:61:613.2(043)=163.6
- KG vitamini/vitamin B₁₂/kemijska sestava/koristne lastnosti/metabolizem/principi delovanja/bolezni/posledice pomanjkanja vitamina B₁₂/anemija/nevrološke motnje/vpliv na zdravje/prehranska dopolnila
- AV ČERNE, Romana
- SA KREFT, Marko (mentor)/SALOBIR, Janez (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2017
- IN VITAMIN B₁₂ – VIRI IN VPLIV NA ZDRAVJE
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
- OP VI, 21 str., 4 sl., 54 vir.
- IJ sl
- JI sl
- AI Vitamin B₁₂ je v vodi topen vitamin, ki v človeškem telesu igra vlogo kofaktorja dveh encimov: metionin sintaze in L-metilmalonil-CoA mutaze. Je nepogrešljiv pri vseh procesih delitve celic in rasti in je poleg folne kisline in železa nujno potreben za nastanek rdečih krvnih teles. Je bistven pri metabolizmu ogljikovih hidratov, maščobe in beljakovin ter potreben za sintezo purina in timidina. Prav tako je potreben za pravilno delovanje ščitnice, krepi imunski sistem ter zmanjšuje utrujenost. Vitamin B₁₂ je bistven pri razvoju možganov, mielinizaciji živčnih vlaken, kognitivnih funkcijah in drugo. Vzroke pomanjkanja vitamina B₁₂ lahko iščemo v pomanjkljivi prehrani in v različnih predelih prebavne poti, saj je za dobro absorpcijo potrebno pravilno delovanje tako želodca, tankega črevesa kot tudi trebušne slinavke. Navkljub vsem pomembnim vlogam, ki jih ima ta kompleks, v vodi topen vitamin, naj bi ga po priporočilih DACH dnevno zaužili le 3 µg. Edini zadovoljiv in zanesljiv naraven vir B₁₂ so živila živalskega izvora. Drugi viri, kot so fermentirani sojini izdelki, črni čaj, nekatere gobe, alge in zelenjava, ki je gnojena z organskimi gnojili ali gojena s hidroponiko in obogatena z vitaminom B₁₂, so z vidika oskrbe nepomembni. Z vidika oskrbe z B₁₂ so edina zanesljiva zamenjava živil živalskega izvora zato preparati z B₁₂, katerih industrijska proizvodnja temelji na mikrobiološki biosintezi, medtem ko je kemijska sinteza ekonomsko neugodna in zahtevna.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 577.164.1:61:613.2(043)=163.6
- CX vitamins/vitamin B₁₂/chemical composition/useful benefits/metabolism/principles of action/disorders/the consequences of shortages of vitamin B₁₂/anemia/neurological disorders/influence on health/food supplements
- AU ČERNE, Romana
- AA MARKO, Kreft (supervisor)/SALOBIR, Janez (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2017
- TI VITAMIN B₁₂ – SOURCES AND EFFECT ON HEALTH
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes): Field Food Science and Nutrition
- NO VI, 21 p., 4 fig., 54 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Vitamin B₁₂ is a water-soluble vitamin that plays a role in the human body as a cofactor of two enzymes: methionine synthase and the L-methylmalonyl-CoA mutase. It is indispensable in all cell division processes, for growth, and in addition to folic acid and iron, it is essential for the formation of red blood cells. It is also essential in the metabolism of carbohydrates, lipids, proteins, and necessary for the synthesis of purine and thymidine. It is needed for the proper functioning of the thyroid, it boosts the immune system and reduce fatigue. Vitamin B₁₂ has a key role in the normal function of the brain, the myelination of nerve fibers, cognitive functions and other functions. The vitamin B₁₂ deficiency may be due to malfunctioning of several sections of the gastrointestinal tract, since normal absorption of vitamin B₁₂ requires a healthy stomach, pancreas, and small intestine. In spite of all the important roles that this complex vitamin has, the daily recommendation according to the DACH is 3 µg only. The only satisfying and reliable natural source is food of animal origin. Other sources like fermented soy products, black tea, some mushrooms, algae and vegetables which is fertilized with organic fertilizers or hydroponic cultivation and enriched with vitamin B₁₂, are unimportant from nutritional aspect. From the point of view of supply of vitamin B₁₂, the only reliable replacement for food of animal origin are preparations with vitamin B₁₂, whose industrial production is based on microbiological biosynthesis, while the chemical synthesis is uneconomical and extremely demanding.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 ZGRADBA VITAMINA B₁₂	1
3 ABSORPCIJA VITAMINA B₁₂	2
4 FUNKCIJE VITAMINA B₁₂	4
4.1 KOFAKTOR ZA METIONIN SINTAZO	4
4.2 KOFAKTOR ZA L-METILMALONIL-KOENCIM A MUTAZO	4
5 POMANJKANJE VITAMINA B₁₂	5
5.1 ANEMIJA	5
5.2 NEVROLOŠKE MOTNJE	6
5.3 DOLOČANJE STATUSA VITAMINA B ₁₂	6
6 VZROKI ZA POMANJKANJE VITAMINA B₁₂	7
6.1 NEZADOSTEN VNOS S HRANO	7
6.2 INFEKCIJA S <i>Helicobacter pylori</i>	8
6.3 PREKOMERNO IZLOČANJE ŽELODČNE KISLINE	9
6.4 KIRURŠKI POSEGI IN ZDRAVILA	9
6.5 PODEDOVANA BOLEZEN ABSORPCIJE VITAMINA B ₁₂	9
6.6 ODPRAVLJANJE POMANJKANJA	9
7 POTREBE PO VITAMINU B₁₂ IN TOKSIČNOST	10
8 VIRI VITAMINA B₁₂	11
8.1 ŽIVILA ŽIVALSKEGA IZVORA	11
8.1.1 Drobovina in mišičnina živali	11
8.1.2 Ribe	11
8.1.3 Mleko in mlečni izdelki	11
8.1.4 Jajca	12
8.2 DRUGA ŽIVILA	12
8.2.1 Zelenjava obogatena z vitaminom B₁₂	12
8.2.2 Črni čaj	12
8.2.3 Užitne gobe	13
8.2.4 Fermentirani sojini izdelki	13
8.2.5 Alge	14
8.3 PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINOM B ₁₂	15
8.3.1 Proizvodnja vitamina B₁₂	15
8.3.2 Merjenje prisotnega vitamina B₁₂	16
9 ZAKLJUČEK	16
10 VIRI	18

KAZALO SLIK

Slika 1: Vitamin B ₁₂ in njegove psevdo oblike (Watanabe, 2007)	2
Slika 2: Absorpcija in vzroki pomanjkanja vitamina B ₁₂ (Stabler, 2013)	3
Slika 3: Megaloblastni eritrocit (Routh in Koenig, 2014)	6
Slika 4: Tempeh (Tempeh, 2017)	14

1 UVOD

Vitamini so organske molekule, ki so v majhnih vrednostih nujno potrebne za pravilno delovanje človeškega organizma. Z izjemo vitamina K, ki ga proizvajajo bakterije v naši črevesni mikroflori ter vitamina D, katerega glavni vir poleg hrane je endogena sinteza, pri kateri je nujna sončna svetloba, jih moramo v telo vnesti z zaužito hrano. Glede na topnost vitamine delimo na tiste ki so topni v vodi ter vitamine, ki so topni v maščobah. V prvo skupino sodijo vitamin C ter vitamini B kompleksa, kamor sodi tudi vitamin B₁₂, ki ga bom podrobneje predstavila v nadaljevanju. Vitamini topni v maščobah pa so vitamin A, D, E in K (Kozyraki in Cases, 2012).

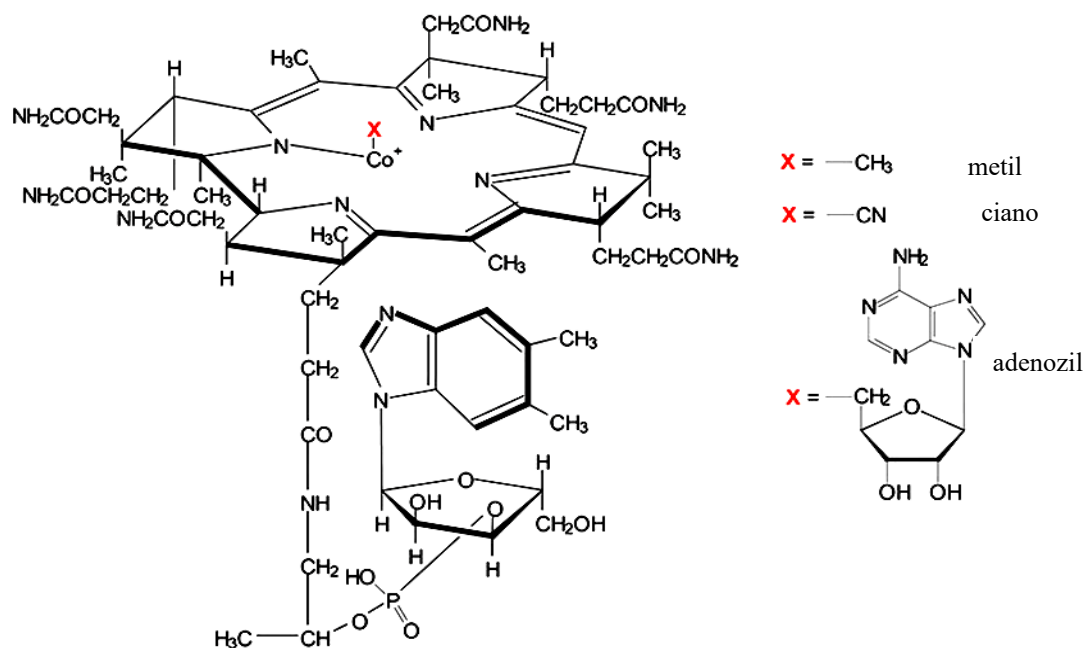
Vitamin B₁₂ je bil odkrit v zgodnjih dvajsetih letih dvajsetega stoletja, ko sta ameriška zdravnik Minot in Murphy pokazala, da lahko ozdravita perniciozno anemijo z uživanjem živalskih jeter. Bolezen je bila do tedaj življenjsko usodna, prvič pa je bila opisana leta 1835. Minot, Murphy in njun sodelavec Whipple so za svoje odkritje o zdravljenju anemije z uživanjem jeter leta 1934 prejeli Nobelovo nagrado. Vitamin B₁₂ je svoje ime dobil dobrih 20 let za tem, ko so začeli perniciozno anemijo zdraviti z uživanjem jeter. Takrat so znanstveniki izolirali rdečo kristalinično snov iz jeter, s katero so tudi lahko ozdravili to bolezen. Kmalu za tem so vitamin B₁₂ našli še v mleku v prahu, govejem ekstraktu in mesni juhi. Leta 1955 so določili njegovo strukturo s pomočjo rentgenske praškovne difrakcije (X-ray Powder Diffraction) (Martens in sod., 2002).

Znanstveniki so predvsem v devetdesetih letih prejšnjega stoletja raziskave namenili odkrivanju funkcij in aktivnosti vitamina B₁₂ v organizmu ter raziskavam virom, kjer se leta nahaja. Iz začetnih domnev, da je vitamin B₁₂ le v živilih živalskega izvora, je sedaj dobro znano, da je lahko prisoten tudi v drugih živilih. Veliko več je znanega tudi o vplivu vitamina B₁₂ na zdravje, tako iz hematološkega kot nevrobiološkega področja. To bom v diplomskem delu natančneje predstavila. Poleg zdravstvenega vidika bom več pozornosti namenila virom vitamina B₁₂. Opisala bom tako živalske kot druge vire, ki bi lahko bili uporabni za ljudi, ki se prehranjujejo z različnimi načini vegetarijanske prehrane, kot so na primer vegani, lakto vegetarijanci, laktoovo vegetarijanci in drugi. Živila ne živalskega izvora, ki jih bom predstavila, so fermentirani sojini izdelki, črni čaj, gobe, alge in zelenjava obogatena z vitaminom B₁₂.

2 ZGRADBA VITAMINA B₁₂

Vitamin B₁₂ je najbolj kompleksen in po molekulski masi največji vitamin ter sodi v skupino vitaminov, ki so topni v vodi. Sestavljen je iz tetrapirrolnega obroča ter centralnega kobaltovega atoma. Splošen izraz za biološko aktivni obliki vitamina B₁₂ je kobalamin (Kozyraki in Cases, 2012). Stabilen je pri vrednostih pH med 4-7, ter prenese temperature

do 120 °C (Watanabe in sod., 2013). Glede na to, katera molekula je vezana na centralni kobaltov atom, poznamo štiri različne oblike vitamina B₁₂. V človeškem telesu sta aktivni obliki adenzilkobalamin in metilkobalamin. V prehranskih dopolnilih se uporablja cianokobalamin, saj cianid stabilizira molekulo kobalamina, ki bi v nasprotnem primeru v stiku s svetlobo razpadla. Še druga neaktivna oblika pa je hidrosikobalamin (Obeid in sod., 2015).

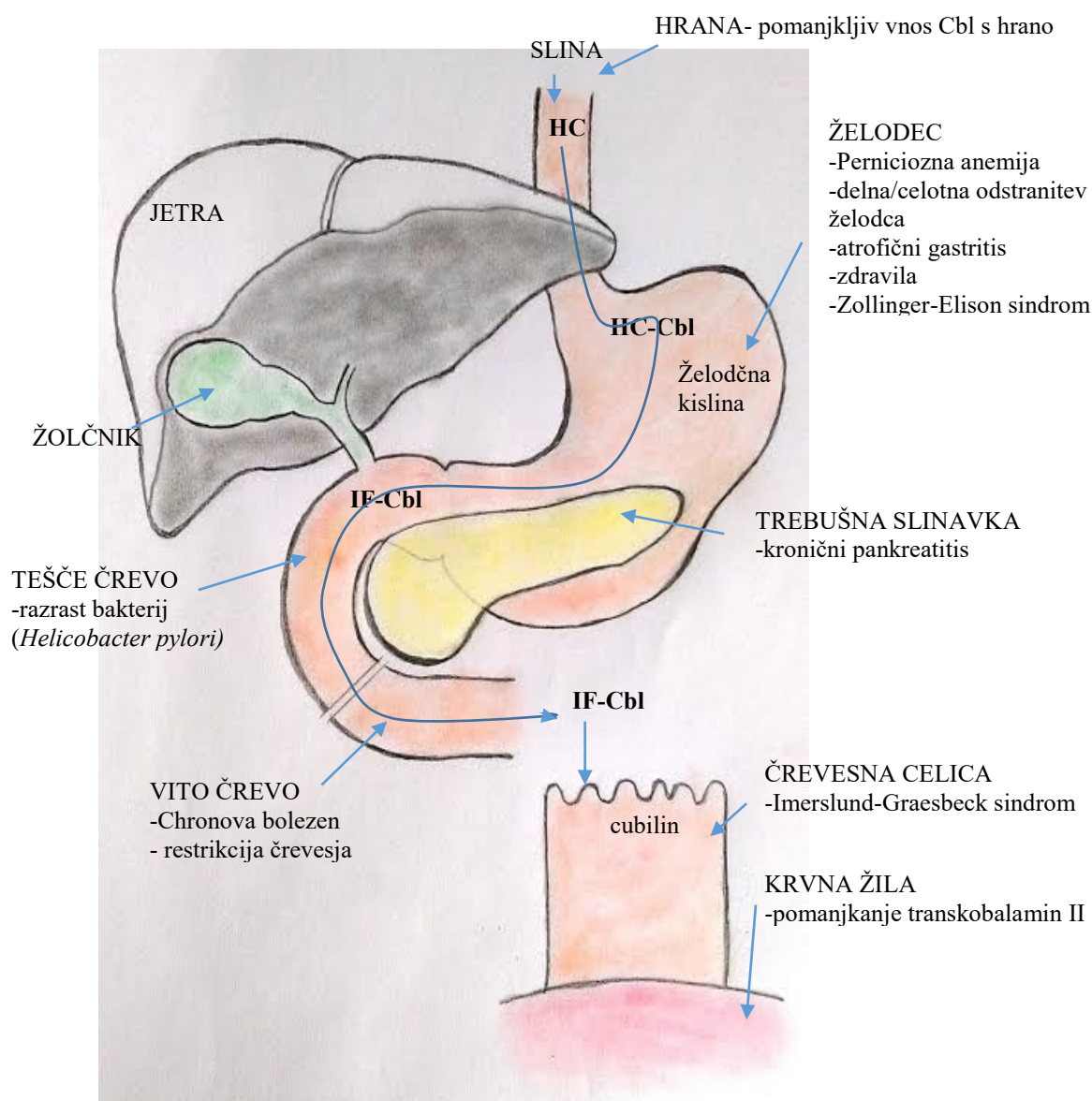


Slika 1: Vitamin B₁₂ in njegove pseudo oblike (Watanabe, 2007)

3 ABSORPCIJA VITAMINA B₁₂

Tako kot vsi drugi vitamini se mora tudi vitamin B₁₂ v črevesju absorbirati, da lahko opravlja svoje funkcije. Proces je zaradi delovanja več encimov in proteinov kompleksen, za kar je ključnega pomena pravilno delovanje želodca, trebušne slinavke ter tankega črevesja (Smolin in Grosvenor, 2008). Vitamin B₁₂ je v zaužiti hrani vezan na beljakovine, od koder se mora sprostiti, za kar je odgovoren encim pepsin. Slednji se v želodcu izloča kot pepsinogen in je aktiviran s klorovodikovo kislino (Gille in Schmid, 2015). Prosti vitamin B₁₂ se v želodcu veže na transkobalamin I (R-faktor), ki se izloča iz žleze slinavke, želodčnega soka, žolča, črevesnega soka in seruma ter tako nastane kompleks med R-faktorjem in vitaminom B₁₂ (Baik in Russell, 1999). V alkalnem okolju lumna tankega črevesja encimi trebušne slinavke razgradijo protein R-faktor, saj mora biti vitamin prost, da se lahko poveže z glikoproteinom imenovanim intrinzični faktor (IF). Le-ta se izloča iz želodčnih parietalnih celic, ko zaužijemo hrano (Smolin in Grosvenor, 2008). Nastane

stabilna povezava vitamina z IF, ki lahko le ob prisotnosti kalcija, ki ga izloča trebušna slinavka, vstopi skozi apikalno površino celic v tankem črevesju. Veže se na specifični receptor cubilin in s procesom fagocitoze preide do lizosomov. Po tej fazi vitamin ni več vezan na IF. Za nadaljnji prenos se kobalamin poveže s proteinom transkobalamin II, kar imenujemo holotranskobalamin, ki je aktivna oblika vitamina (Gille in Schmid, 2015). Opisan proces je odvisen od IF in ima zato omejeno sposobnost absorpcije vitamina. Pri velikem vnosu vitamina B₁₂ se lahko majhen del prostega kobalamina v črevesne celice absorbira tudi s pasivno difuzijo (Baik in Russell, 1999).



*Cbl = kobalamin

**HC = transkobalamin I

Slika 2: Absorpcija in vzroki pomanjkanja vitamina B₁₂ (Stabler, 2013)

4 FUNKCIJE VITAMINA B₁₂

Vitamin B₁₂ je nepogrešljiv pri vseh procesih delitve celic in rasti in je poleg folne kisline in železa nujno potreben za nastanek rdečih krvnih teles. Je bistven pri metabolizmu ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin. Nujno je potreben za sintezo purina in timidina ter je udeležen pri presnovi homocisteina. Prav tako je potreben za pravilno delovanje ščitnice, obenem pa krepi imunski sistem ter zmanjšuje utrujenost (Kozyraki in Cases, 2012). Vitamin B₁₂ je bistven pri razvoju možganov, mielinizaciji živčnih vlaken in kognitivnih funkcijah. Pomankanje vitamina B₁₂ v času nosečnosti in zgodnjem otroštvu je povezano s škodljivim vplivom na zdravje otrok, vključno z motnjami kognitivnega razvoja. Mehanizmi delovanja še vedno niso natanko pojasnjeni (Venkatramanan in sod., 2016).

Na celični ravni je vitamin B₁₂ potreben kofaktor dveh encimov: citoplazemske metionin sintaze in mitohondrijske metilmalonil-CoA mutaze (Gille in Schmid, 2015).

4.1 KOFAKTOR ZA METIONIN SINTAZO

Metilkobalamin ima vlogo kofaktorja pri biosintezi metionina iz homocisteina. Reakcijo pretvorbe homocisteina katalizira citosolni encim metionin sintaza, ki je od folata odvisen encim. Pri pretvorbi dobi kobalamin metilno skupino od N⁵-metil-FH₄ in nastane tetrahidrofolat in metilkobalamin. V primeru pomanjkanja vitamina B₁₂ ostane folat ujet v obliki N⁵-metil-FH₄, kar privede do pomanjkanja aktivnega folata. Tetrahidrofolat je nujno potreben za biosintezo nukleinskih kislin. Ob pomanjkanju vitamina B₁₂ pride do kopičenja homocisteina in metilmalonilne kisline (Hannibal in sod., 2016). Metionin sintaza torej preprečuje zbiranje homocisteina v tkivu in serumu, ter s tem zmanjša tveganje za nastanek kardiovaskularnih bolezni, arterijsko in vensko trombozo ter nevroloških nepravilnosti, kot sta depresija in možganska atrofija. Tvorba metionina pa je potrebna za več reakcij metilacije, ki so potrebne za nastanek nukleotidov, DNA, RNA ter sintezo beljakovin. V kostnem mozgu lahko pride do motenj v sintezi DNA, kar se izrazi pri celični rasti in delitvi, ter privede do megaloblastne anemije (Kozyraki in Cases, 2012). Za pretvorbo homocisteina v metionin je potrebna prisotnost tako vitamina B₁₂ kot folata, zato pride ob pomanjkanju katerega koli prej omenjenega mikroelementa, do kopičenja homocisteina v serumu in urinu (Hannibal in sod., 2016).

4.2 KOFAKTOR ZA L-METILMALONIL-KOENCIM A MUTAZO

Adenozilkobalamin sodeluje pri pretvorbi metilmalonil-CoA v sukcinil-CoA, ki vstopa v Krebsov cikel. Pretvorba je katalizirana z mitohondrijsko metilmalonil-CoA sintazo. Pomanjkanje vodi v kopičenje metilmalonila-CoA in prekursorja propionil-CoA, zato pride do sinteze nefizioloških maščobnih kislin z lihim številom ogljikovih atomov in

njihove vgradnje med lipide nevronov, kar vodi v propad živčnih vlaken. Nepravilni potek reakcije se kaže v nevroloških težavah, kot so motnje gibanja, epileptični napadi ter intelektualna manjzmožnost (Kozyraki in Cases, 2012).

5 POMANJKANJE VITAMINA B₁₂

5.1 ANEMIJA

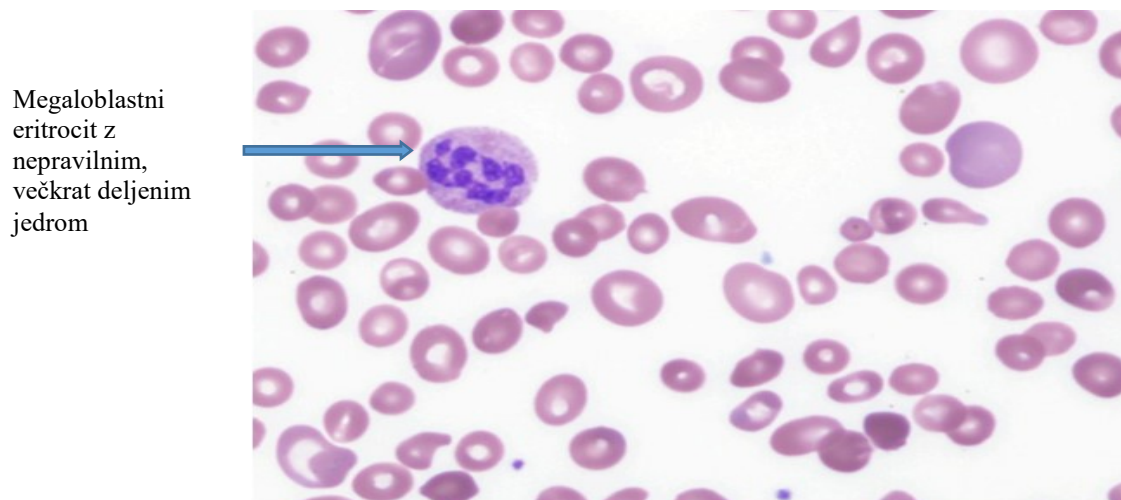
Glede na patofiziologijo delimo anemije na:

- motnje v eritropoezi (nezadostna eritropoeza glede na stopnjo anemije),
- motnje v dozorevanju rdečih krvničk in neučinkovita eritropoeza (kamor sodi anemija zaradi pomanjkanja železa, vitamina B₁₂, folne kisline in drugo),
- krvavitve,
- hemolitične anemije (Mlakar, 2005).

Splošno se anemija nanaša na stanje zmanjšane števila eritrocitov ali koncentracije hemoglobina v krvi nižje od 130 g/L za moške in 120 g/L za ženske. Pokažejo se simptomi kot so glavobol, izguba teka, razdražljivost, težja koncentracija, utrujenost, saj kri ne more prenašati dovolj kisika po telesu (Pokorn, 2004). Med hematološkimi motnjami je megaloblastna anemija najpogostejša bolezen, ki se pojavi zaradi pomanjkanja vitamina B₁₂ (in folne kisline). Anemija se razvije postopno, težave nastajajo pri hujših stopnjah anemije. Za megaloblastno anemijo so značilni veliki, ovalni, s hemoglobinom dobro polnjeni eritrociti. Poleg eritrocitov pa so prizadeti tudi granulociti, trombociti in druga tkiva (Mlakar, 2005). Nastane zaradi motene oziroma nezadostne sinteze DNA in rezultira v velikih celicah z normalnim razvojem citoplazme, a nepravilnostmi v dozorevanju jedra. Splošni simptomi megaloblastne anemije so hujšanje, utrujenost, zmedenost, depresija, zmanjšano pomnjenje, pekoč jezik, temnejša koža ter barvna slepota (za modro in rumeno). Znaki megaloblastne anemije pa so lahko podobni drugim bolezenskim stanjem na primer mikrocitni anemiji, ki je posledica pomanjkanja železa, anemije zaradi kroničnih bolezni ali talasemije minor (Pokorn, 2004).

Drugo stanje, kjer lahko pride do zamenjave bolezni je akutna levkemija ali mielodisplazija. Prognoza in zdravljenje se med stanji močno razlikujejo, zato je potrebno izvesti primerne teste, da se izključi možnost megaloblastne anemije. Do izboljšanja lahko pride pri pacientih z napredno megaloblastno anemijo, ki se zdravijo z vitaminom B₁₂ ali folatom ali v skrajnem primeru transfuzijo, preden zdravljenje deluje na kostni mozeg, kjer krvne celice nastajajo. Akutna megaloblastna anemija najpogosteje nastane zaradi anestezij z dušikovim oksidom, ki uniči metilkobalno obliko vitamina B₁₂. Akutna megaloblastna anemija nastane v 12 do 24 urah. Razvije se lahko tudi pri zelo bolnih

pacientih, ki se zdravijo na intenzivni negi, pri pacientih, ki prejmejo večje količine transfuzije med operacijo ali pri tistih, ki se hranijo le s parenteralno prehrano ali so dializni bolniki (Antony, 2011).



Slika 3: Megaloblastni eritrocit (Routh in Koenig, 2014)

5.2 NEVROLOŠKE MOTNJE

Pomanjkanje vitamina B₁₂ se lahko kaže tudi z nevrološkimi motnjami, ki se pridružujejo anemiji. Pri redkih primerih posameznikov se lahko izrazijo le nevrološke motnje. Nevropsihiatrične motnje, ki so pogosto povezane s pomanjkanjem vitamina B₁₂, vključujejo mielopatijo, nevropatijo, demenco, nevropsihiatrične anomalije, redko prihaja do atrofije vidnega živca. Tako imenovana Lichtheim-ova bolezen oziroma subakutno kombinirana degeneracija hrbtenjače je najpogostejša posledica pomanjkanja vitamina B₁₂. Tipični klinični znaki vključujejo spastično paraparezo, Babinski refleks, oslABLJENO zaznavanje položaja in vibracij ter otopelost (Ralapanawa in sod., 2015). Pacienti otopelost oziroma mravljinčenje opazijo predvsem v rokah in nogah. Spastična parapareza se običajno pojavi v spodnjih okončinah, lahko pa tudi v zgornjih okončinah. Pri tem pride do neenakomerne razgradnje mielinskih vlaken in izgub aksonov tako v posteriornem kot lateralnem delu hrbtenjače. Običajno se proces začne v območju prsne regije in se nato širi navzgor ali navzdol (Tan in sod., 2010).

5.3 DOLOČANJE STATUSA VITAMINA B₁₂

Pomanjkanje folata se od pomanjkanja vitamina B₁₂ loči po tem, da se pri pomanjkanju folata kopiči le homocistein, pri pomanjkanju vitamina B₁₂ pa se poleg tega kopiči še metilmalonska kislina (Hannibal in sod., 2016). Ob prisotni povišani vrednosti

homocisteina se z merjenjem metilmalonske kisline določi, ali gre za anemijo zaradi pomanjkanja vitamina B₁₂. Ob pomanjkanju folata lahko prav tako pride do makrocitne anemije, ki pa ima drugačne nevrološke značilnosti kot tista povzročena zaradi pomanjkanja vitamina B₁₂. Bistveno je torej ugotoviti pravi vzrok anemije, saj lahko z zdravljenjem s folatom v primeru anemije povzročene zaradi pomanjkanja vitamina B₁₂ izboljšamo hematološke znake, obenem pa nevrološki znaki ostanejo nezdravljeni (Clarke in sod., 2003).

Najbolj neposredna metoda za določanje vsebnosti vitamina B₁₂ v telesu je merjenje skupnega serumskega vitamina B₁₂. Normalne vrednosti znašajo > 250 pmol/L, vrednosti med 150 in 249 pmol/L veljajo za nizke, pri vrednostih nižjih od 149 pmol/L gre za akutno pomanjkanje. Ta metoda ima kljub vsemu tudi nekaj pomanjkljivosti. Ena izmed njih je ta, da je približno 80 % od skupne serumske vrednosti vitamina B₁₂ vezanega na transkobalamin I ter posledično ni razpoložljiv za celični prevzem. Merjenje skupne serumske vsebnosti se ni izkazalo za zanesljiv pokazatelj stanja vitamina B₁₂, saj so rezultati raziskav pokazali, da meritve serumskih vrednosti niso vedno reprezentativne za vrednosti vitamina B₁₂ v celicah (Hannibal in sod., 2016).

Nizka vrednost kobalamina pa ne pomeni vedno bolezenskega stanja. 20-40 % starejših ljudi ima nižje vrednosti, prav tako pa tudi nosečnice ter oboleni z virusom HIV (Carmel, 2000).

6 VZROKI ZA POMANJKANJE VITAMINA B₁₂

Vzroke pomanjkanja vitamina B₁₂ lahko iščemo v različnih predelih prebavne poti, saj je za dobro absorpcijo potrebno pravilno delovanje želodca, tankega črevesa kot tudi trebušne slinavke (Smolin in Grosvenor, 2008).

6.1 NEZADOSTEN VNOS S HRANO

Do pomanjkanja vitamina B₁₂ pride ob nezadostnem vnosu vitamina s hrano. Vitamin sicer proizvajajo tudi nekatere bakterije v debelem črevesu, vendar absorpcija tam ni možna, saj se vitamin B₁₂ na prej opisan zapleten način absorbira v vitem črevesu (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004).

Vse vrste vegetarijanske prehrane, vključno z vegansko, so ob dobrem načrtovanju ter zadostnem znanju o živilih, primerne in pokrijejo vse potrebe po hranilih ter zagotavljajo normalno rast v vseh fazah življenja, vključno z nosečnostjo, dojenjem, zgodnjim otroštvom, v mladostništvu ter pri starejših odraslih in športnikih (Melina in sod., 2016). Največji problem pri tem predstavlja prav B₁₂, saj so živila živalskega izvora edini

zadosten naraven vir B₁₂. Alternativni rastlinski viri (fermentirana živila, alge) so z vidika oskrbe nepomembni, saj ne vsebujejo praktično pomembne količine B₁₂ in/ali je ta v neizkoristljivi obliki. Za zagotavljanje primerne oskrbe z B₁₂ se je v prehrani brez živil živalskega izvora zato mogoče zanašati le na prehranska dopolnila z B₁₂ ali živila obogatena z B₁₂, ki je mikrobnega ali sintetičnega izvora. Ljudje, ki ne uživajo živalskih živil, morajo zato po priporočilih relevantnih prehranskih organizacij trajno uživati preparate z B₁₂ (Richter in sod., 2016).

Prav zato se strogo vegansko prehrano v času nosečnosti in dojenja odsvetuje, saj se nosečnice in doječe matere tako ne morejo prehranjevati na ustrezen način. Stroga veganska prehrana z izogibanjem vsem živilom živalskega izvora pomeni tveganje za pomanjkanje tudi mnogih drugih hranil: železa, cinka, kalcija, joda, vitaminov B₁₂, B₂, A, D, n-3 dolgoveržnih večkrat nenasičenih maščobnih kislin (zlasti DHA-dokozaheksaenojska kislina), beljakovin in energije (Fidler Mis in Orel, 2013). V primerjavi z vsejedi imajo vegetarijanci, zlasti striktni vegani, nižji vnos vitamina B₁₂. Količina vnosa je odvisna od načina vegetarijanske prehrane (lakto, laktoovo, ovo, vegani, frutarjanci, pesco, semi) ter uživanja prehranskih dopolnil, ki so za striktno vegane priporočena (Hannibal in sod., 2016). Pogostost pojavljanja pomanjkanja je prav tako višja pri ljudeh, ki se prehranjujejo z vegansko prehrano že od rojstva, oziroma se njihova mati prehranjuje le z vegansko prehrano, kot pa pri tistih, ki so z veganstvom pričeli kasneje v življenjskem obdobju (Pawlak in sod., 2013). Pri novorojenčkih je status vitamina B₁₂ odvisen predvsem od zalog matere med nosečnostjo, funkcionalnosti placente, teže novorojenčka ter gestacijskega obdobja (Hannibal in sod., 2016).

6.2 INFEKCIJA S *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je Gram negativna, mikroaerofilna in spiralno zavita bakterija, ki naj bi poseljevala želodec več kot polovice svetovne populacije. Okužba s to bakterijo naj bi vplivala na homeostazo nekaterih mikrohranil kot so vitamin B₁₂, folna kislina, vitamin C, alfa-tokoferol in beta-karoten. Perniciozna anemija je lahko posledica dolgotrajne okužbe s to bakterijo. Mehanizem vpliva okužbe na zmanjšano absorpcijo vitamina B₁₂ vključuje zmanjšanje izločanja želodčne kisline. Ta je nujno potrebna, da se sprost kobalamin vezan na beljakovine iz hrane, ter da se poveča afiniteta R-faktorja do prostega kobalamina (Lahner in sod., 2012). Zaradi zmanjšanega izločanja želodčne kisline, vrednost pH želodca ni dovolj nizka. To povzroči razrast bakterij, ki pa začnejo vitamin B₁₂ uporabljati za lastne potrebe. Zdravljenje z antibiotiki izboljša absorpcijo vitamina B₁₂, saj odpravi bakterijsko okužbo (Serin in sod., 2002).

6.3 PREKOMERNO IZLOČANJE ŽELODČNE KISLINE

Prekomerno izločanje želodčne kisline je posledica tumorja gastrinoma na dvanajstniku ali trebušni slinavki. Tumorske celice izločajo gastrin, ta pa povzroči povečano izločanje kisline iz želodčnih parietalnih celic. To vodi v nezadostno nevtralizacijo črevesne vsebine, kar onemogoča vezavo vitamina B₁₂ na IF. To je tako imenovan Zollinger-Elison sindrom (Antony, 2011).

6.4 KIRURŠKI POSEGI IN ZDRAVILA

Različni kirurški posegi, kjer pacientu odstranijo del ali celoten želodec (gastrektomija), del tankega črevesa ali trebušno slinavko so eden izmed vzrokov za pomanjkanje ne le vitamina B₁₂ temveč tudi drugih vitaminov in mineralov. Takšni operativni posegi so v veliki večini potrebni zaradi rakavih obolenj in tumorjev, kjer je indicirano, da cel organ ali del odstranijo. V nekaterih primerih, kot je na primer zdravljenje želodčne razjede, se uporablja zaviralce protonskih črpalk, ki zavirajo nastanek želodčne kisline in na ta način poslabšujejo sproščanje vitamina B₁₂ vezanega v hrani (Lahner in sod., 2012).

6.5 PODEDOVANA BOLEZEN ABSORPCIJE VITAMINA B₁₂

Sindrom Imerslund-Graesbeck (IGS) je redka avtosomna recesivna bolezen, pri kateri je značilno pomanjkanje vitamina B₁₂ in običajno rezultira v megaloblastni anemiji. Pojavi se v otroštvu, vendar ne takoj po rojstvu, običajno med 4 mesecem starosti in 7 letom starosti. Pogosto je prisotna blaga proteinurija, opaziti je mogoče blage nevrološke bolezenske znake. Pri IGS prihaja do nezmožnosti prenosa vitamina B₁₂ skozi črevesno steno in ni povezana s pomanjkanjem IF. Načeloma pride do podobnega stanja ob pomanjkljivem delovanju kateregakoli člena pri prenosu kobalamina, vezanega na intrinzični faktor v lumnu tankega črevesja, do specifičnih prenašalcev kobalamina v krvi. IGS zahteva vseživljenjsko zdravljenje z vitaminom B₁₂ (Gräsbeck, 2006). Do napake pride večinoma na enem od dveh genov (cub ali amn), ki skupaj kodirata protein cubilin, ki igra vlogo receptor za kompleks med IF in vitaminom B₁₂ (Antony, 2011).

6.6 ODPRAVLJANJE POMANJKANJA

Pomanjkanje kobalamina redko zahteva takojšnje zdravljenje. Z zdravljenjem moramo začeti takoj ob nekaterih nevroloških znakih, ki bi lahko vodili v trajne poškodbe. Mednje sodijo na primer obsežne senzorične motnje in kognitivne spremembe. Zdravljenje se prične z intamuskularnimi injekcijami kobalamina, saj se tako zagotovi takojšnjo učinkovitost. Običajen odmerek kobalamina je 1000 µg in naj bi zadostoval za zdravljenje anemije in obnovo zalog v telesu. Oblike kobalamina imajo različne lastnosti. Cianokobalamin se mora v telesu pretvoriti v aktivno obliko, injekcije s

hidroksikobalaminom se dozirajo v manj pogostih intervalih, metilkobalamin pa je zelo občutljiv na svetlobo in se uporablja redkeje (Carmel, 2013).

Če je vzrok megaloblastne anemije nezadosten prehranski vnos vitamina B₁₂, je potrebno vitamin nadomeščati s prehranskimi dopolnili ali pa preprosto zaužiti več hrane, ki ta vitamin vsebuje v količinah, s katerimi lahko primanjkljaj nadomestimo. V primeru pomanjkanja zaradi nesposobnosti absorpcije vitamina B₁₂ je potrebno vnašati intramuskularne injekcije vitamina B₁₂ vse življenje, v časovnih intervalih 2 do 3 mesecev (Pokorn, 2004).

Ključnega pomena je spremljane poteka zdravljenja. Hematološke spremembe se začnejo nekaj dni po začetku zdravljenja. Po enem tednu zdravljenja je prvo zanesljivo merilo, ki nam pove, kako zdravljenje napreduje, določanje števila retikulocitov, ki je kazalec tvorbe eritrocitov v kostnem mozgu. V primeru, da se stanje ne izboljša, gre lahko za napačno diagnozo. Enako lahko predpostavljamo v primeru, da se vrednost homocisteina ali metilmalonske kisline ne normalizirata in vemo, da obenem ni prisotnih ledvičnih okvar. Končno hematološko merilo je merjenje povprečnega volumna eritrocitov (MCV), ki naj bi se po osmih tednih zdravljenja popolnoma normaliziralo. Izboljšanje nevroloških znakov se prav tako začne v prvem tednu. Popolno izboljšanje sledi v obdobju šestih tednov do treh mesecev (Carmel, 2013).

7 POTREBE PO VITAMINU B₁₂ IN TOKSIČNOST

V človeškem organizmu imajo predvsem jetra založno funkcijo vitamina B₁₂. Tu ga je v normalnem stanju shranjenega od 2 do 5 mg. Pri manjkajoči ali nezadostni absorpciji naj bi se klinični znaki pojavili šele po več letih, saj se vitamin B₁₂ iz zalog sprošča z metabolično stopnjo okoli 0,1 % na dan. Po referenčnih vrednostih DACH naj bi mladostniki in odrasli zaužili 3,0 µg, nosečnice 3,5 µg ter doječe matere 4,0 µg/dan. Dnevne potrebe zdravega odraslega znašajo 2 µg dejansko vnesenega vitamina B₁₂, ker pa se ga iz mešane prehrane povprečno absorbira le 50 %, pri starejših pa celo manj, je za zagotovljeno pokrivanje potreb priporočena višja vrednost. Z ustreznim prehranjevanjem so priporočene vrednosti hitro presežene, kar pa z zdravstvenega vidika ni problematično, saj je to v vodi topen vitamin, ki ga izločamo s sečem (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004).

8 VIRI VITAMINA B₁₂

8.1 ŽIVILA ŽIVALSKEGA IZVORA

Med živila živalskega izvora, ki vsebujejo vitamin B₁₂, uvrščamo poleg mišičnine in drobovine živali tudi mleko in mlečne izdelke, jajca ter morske živali.

8.1.1 Drobovina in mišičnina živali

Vitamin B₁₂ se v največjih koncentracijah nahaja v jetrih prežvekovalcev ter njihovem mesu. Jetra govedi vsebujejo med 59,0 in 110,0 µg/100 g vitamina B₁₂, medtem ko ga telečja jetra vsebujejo približno 60 µg/100 g. Monogastrične živali kot so svinjina in perutnina imajo nižje vrednosti vitamina B₁₂ kot prežvekovalci, saj njihova prebavila poseljuje manjša količina bakterijske populacije, ki ta vitamin proizvaja. Poleg tega imajo starejše živali višje vsebnosti vitamina B₁₂ kot mlajše. Obenem so višje vrednosti vitamina B₁₂ prisotne v bolj aktivnih mišicah, saj imajo več mitohondrijev, kjer je lociran adenoilkobalamin (Gille in Schmid, 2015). Vsebnost vitamina B₁₂ v surovi in kuhani govedini so enake in znašajo približno 3,17 µg/100 g. Če pa izrazimo izgubo vitamina na enoto dušika, le-te znašajo približno 30 %, saj pride med kuhanjem do izgub vode in maščob (Bennink in Ono, 1982).

8.1.2 Ribe

Nishioka in sod. (2011) so z mikrobiološkim testom določali vsebnost vitamina B₁₂ v sardelah. Ugotovili so, da je vsebnost vitamina B₁₂ v drobovini do trikrat večja kot v mesu, in sicer 37,5 µg/100 g v drobovini in 12,2 µg/100 g v mesu. Toplotna obdelava sardel je vodila v večje izgube vitamina B₁₂. Pri cvrenju, mikrovalovnem segrevanju, parjenju, kuhanju in pečenju na žaru je prihajalo do izgub glede na maso pred toplotno obdelavo med 41 in 59 %. Edini toplotni postopek, kjer do izgub vitamina ni prihajalo, je bilo kuhanje v vakumu pri nižjih temperaturah daljši čas (postopek Sous-vide).

8.1.3 Mleko in mlečni izdelki

Mleko in mlečni izdelki so dober vir vitamina B₁₂, še posebej za lakto-vegetarijance. Kravje mleko vsebuje povprečno 0,4 µg/100 g vitamina B₁₂. Pasterizacija mleka in obdelava z visoko temperaturo za krajši čas (UHT) vodi le v manjše izgube vitamina B₁₂, povprečno za 10 % (Arkbåge, 2003). V jogurtu, fermentiranem mlečnem izdelku, proizvedenem iz starter kulture *Lactobacillus bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus*, pride do znižanja vsebnosti vitamina B₁₂ za 25 % glede na sveže mleko. Tudi daljše hranjenje jogurta povzroči izgube vitamina B₁₂ (Alm, 1982). Do izgub vitamina B₁₂ pride tudi pri izdelavi sira in skute, saj se del vitamina izloči s sirotko (Gille in Schmid, 2015).

8.1.4 Jajca

Jajca spadajo med visoko hranljiva živila, saj vsebujejo skoraj vse elemente, ki jih potrebuje naše telo. Celo surovo ali kuhano kokošje jajce vsebuje približno 0,9 µg/100 g. Večina vitamina B₁₂ je v rumenjaku (Teng in sod., 2016).

8.2 DRUGA ŽIVILA

Rastlinska živila vsebujejo B₁₂ le v primeru, da jim ga dodajamo, jih z njim tretiramo, ali če so podvržena mikrobnii fermentaciji, pri kateri se sintetizira B₁₂. V večini primerov gre le za prisotnost B₁₂, ki ga z modernimi analitskimi metodami lahko določimo, vsebnost B₁₂ pa je tako majhna, da z vidika oskrbe oz. pokrivanja potreb po B₁₂ nima praktičnega pomena. Na fermentirana živila, alge in neobogaten prehranski kvas se ne moremo zanašati kot na primeren in praktičen vir vitamina B₁₂ (Melina in sod., 2016).

8.2.1 Zelenjava obogatena z vitaminom B₁₂

Rastline sicer ne sintetizirajo B₁₂, a ga nekatere vsebujejo, saj ga preko svojih korenin absorbirajo. Vendar je akumulirana količina s prehranskega vidika zanemarljiva. Ker živalski iztrebki vsebujejo precej vitamina B₁₂, ki se izloča z blatom in urinom, vsebujejo rastline gnojene z organskimi gnojili več B₁₂, kot rastline gnojene z mineralnimi gnojili. Ugotovljeno je bilo, da se je vsebnost vitamina B₁₂ v ječmenovih zrnih in špinačnih listih, ki so rastle v zemlji, ki ji je bil dodan čist vitamin B₁₂ ali pa je bila zemlja gnojena s kravjim gnojem, povečala, a bila še vedno izredno nizka, prehransko nepomembna (ng količine). Tako so ječmenova zrna vsebovala 9,1 ng, špinačni listi pa 17,8 ng vitamina B₁₂ na 100 g suhe mase. V primeru mineralnih gnojil pa so bile vrednosti vitamina še nižje (Mozafar, 1994).

Drug način, s katerim lahko povečamo vsebnost vitamina B₁₂ v rastlinah, je hidroponika. Pri tem se rastline gojijo brez prsti, le ob prisotnosti vode in hranilnih snovi. Izkazalo se je, da solata gojena 30 dni po metodi hidroponike in tretirana z različnimi koncentracijami cianokobalamina, vsebuje $164 \pm 74,7$ ng vitamina B₁₂ na 100 g sveže mase, čeprav običajno gojena solata ne vsebuje zaznavnih vrednosti vitamina B₁₂ (Bito in sod., 2013). Podobno so ugotovili za kalčke fižola mungo, ki so jih namakali v vodni raztopini z dodanim vitaminom B₁₂. Vrednosti tega vitamina so narastle na 1,5 µg/g svežih kalčkov. (Sato in sod., 2004).

8.2.2 Črni čaj

Čaj je ena izmed najbolj priljubljenih pijač in je po svetovni porabi na drugem mestu, takoj za vodo. Glede na pridelavo se v groben delijo na ne-fermentirane (zeleni čaj), pol-fermentirane (čaj oolong) ter fermentirane (črni čaj) čaje. V slednjem so bile ravno zaradi fermentacije izmerjene manjše količine vitamina B₁₂ (Lin in sod., 1996). Različni kitajski fermentirani črni čaji kot so Pu'erh, Fu, Brick, vsebujejo vitamin B₁₂ v sledovih,

povprečno 0,49 µg/100 g suhe mase. Le nekoliko več - povprečno 0,69 µg/100 g suhe mase ga je bilo izmerjenega v čaju, ki je podoben zgoraj naštetim, čaj Ryubao (Teng in sod., 2014). Tudi bolj znani Japonski črni čaj (Batabata cha) vsebuje približno 0,456 µg/100 g vitamina B₁₂. Pitje črnega čaja pripomore k vnosu vitamina B₁₂, čeprav v manjših količinah. Seveda pa ga ne moremo dnevno zaužiti toliko, da bi pokrili dnevne potrebe po vitaminu (Kittaka-Katsura in sod., 2004).

8.2.3 Užitne gobe

V evropskih državah uživamo več različnih vrst gob, ki vsebujejo manjše količine vitamina B₁₂. Pri jesenskem gobanu (*Bluteus edulis*), orjaškem dežniku (*Macrolepiota procera*), bukovem ostrigarju (*Pleurotus ostreatus*) ter pri navadni lisički (*Cantharellus cibarius*) so bile izmerjene vrednosti vitamina B₁₂ zelo nizke, in sicer med 0,01-0,09 µg/100 g suhe mase. Nekoliko višje vrednosti so bile izmerjene pri užitnem smrčku oziroma mavrahu (*Morchella esculenta*) in črni trobenti (*Craterellus cornocopioides*). Le-te so znašale med 1,09 in 2,65 µg/100 g suhe mase. Gobe so v prehrani precej priljubljene, v nobenem primeru pa jih ne moremo zaužiti v tako velikih količinah, da bi pokrili dnevne potrebe po vitaminu B₁₂. Užitni smrček in črna trobenta lahko predstavljata le občasen dopolnilni vir za pokritje dnevnih potreb po vitaminu B₁₂ (Watanabe in sod., 2012).

8.2.4 Fermentirani sojini izdelki

Sojina semena vsebujejo približno 0,39 ng/g vitamina B₁₂, kar je tako malo, da sama sojina semena iz prehranskega stališča niso pomemben vir vitamina B₁₂. Slednjega so v večjih količinah našli v fermentiranem sojinem izdelku imenovanem tempeh. Le-ta vsebuje veliko beljakovin in je vegetarijancem predstavljal prvi mesni analog (Liem in sod., 1977). Tempeh nastane tako, da micelij plesni *Rhizopus* (nekateri sevi) preraste hidrirana, oluščena in delno kuhana sojina semena. Prepleten micelij plesni tvori čvrsto strukturo v obliki torte, ki se lahko kasneje nareže na kocke in uporabi namesto mesa (Steinkraus, 1983). Šele prisotnost bakterij skupaj s plesnijo v času fermentacije zagotavlja večje količine vitamina B₁₂, podaljša se tudi čas fermentacije. Opažena so bila nihanja glede na vsebnost vitamina B₁₂ v različnih vrstah sojinih semen. Vrednosti so se gibale med 86 in 150 ng/g, vzrok za različne vsebnosti pa naj bi bila različna prisotnost kobalta v semenih (Liem in sod., 1977). Pomembnejše količine vitamina B₁₂ so bile v tempehu zaznane po inokulaciji namočenih sojinih semen s *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* in *Streptococcus spp.* Izkazalo se je, da imata *Citrobacter freundii* in *Klebsiella pneumoniae* najboljše sposobnosti za proizvodnjo vitamina B₁₂. Medtem ko *Propioni Freudenreichii subsp.*, sev, ki se v moderni biotehnologiji uporablja za proizvodnjo vitamina B₁₂, ni dajal večjih vsebnosti vitamina, saj ni prilagojen na zahtevane pogoje fermentacije sojinih semen. Plesen igra ključno vlogo pri proizvodnji vitamina B₁₂, čeprav ga sama ni zmožna proizvajati. Skupaj z bakterijami dajejo dober rezultat, saj bakterije porabljajo produkte, ki nastanejo s hidrolitskimi encimi plesni in tako

izboljšajo produkcijo vitamina. Poleg tega pa plesni ustvarijo primerno strukturo in ostale pogoje za nastanek tempeha (Keuth in Bisping, 1993).



Slika 5: Tempeh (Tempeh, 2017)

8.2.5 Alge

Alge se v grobem delijo na enocelične in mnogocelične. Med enocelične med drugim spadajo klorela (*Chlorella spp.*) in spirulina (*Spirulina spp.*). Klorela je sladkovodna enocelična zelena alga, ki v primerjavi z ostalimi rastlinami vsebuje veliko proteinov in klorofila. Prav tako je bogata z minerali (železo, magnezij) in vitamini (folat, B₆, B₁₂). Nakano in sod. (2010) so preučevali vpliv prehranskih dopolnil klorela pri nosečnicah ter ugotovili, da ima uživanje klorela pozitivne učinke na zmanjšanje pojava nosečniške anemije, proteinurije in edemov. Obenem pa ni bilo nobenih neželenih učinkov. Bito in sod. (2016) so analizirali 19 prehranskih dopolnil s klorela. Vrednost vitamina B₁₂ se je med njimi gibala vse od 0,1 µg do 415 µg/100 g suhe mase. V nekaterih so bile prisotne tudi neaktivne oblike kobalamina. Ugotovili pa so tudi, da klorela vitamina B₁₂ ne potrebuje za svojo rast.

V komercialno dostopnih tabletah spiruline so izmerili od 127-244 µg vitamina B₁₂ na 100 g suhe mase. Navkljub visoki vsebnosti vitamina B₁₂ pa je večji del bil v neaktivni obliki in ga ljudje ne moremo absorbirati (Watanabe in sod., 1999). Približno 144 µg vitamina B₁₂ so raziskovalci našli tudi v modro-zeleni cepljivki Suizenji-nori, ki pa je prav tako bil v neaktivni obliki (Watanabe in sod., 2006).

Med užitnimi algami so sušene rdeče morske alge (*Porphyra sp.*) (eng. Purple lavers) ter sušene zelene morske alge (*Enteromorpha sp.*) (eng. Green lavers) najbolj razširjene, boljše prepoznane pod imenom nori. Vsebujejo visoke koncentracije vitamina B₁₂, ki se nahaja v

aktivni oziroma razpoložljivi obliki in so zato lahko dober vir vitamina B₁₂ predvsem za vegetarijance, še posebej vegane. Alge *Porphyra* vsebuje približno 133,8 µg vitamina B₁₂ na 100 g suhe mase, ki se najbolje absorbira pri vrednosti pH nižjem od 2. Začinjeni in praženi izdelki iz teh alg vsebujejo nižje vrednosti vitamina B₁₂, približno 51,7 µg/100 g suhe mase. Izgube so povzročene na račun splošnega znižanja mase samih alg med obdelavo (Miyamoto in sod., 2009). Sušene zelene morske alge vsebujejo približno 63,6 µg vitamina B₁₂ na 100 g suhe mase (Watanabe in sod., 1999). Vendar, alge so neprimerne kot edini vir vitamina B₁₂, saj je njegova izkoristljivost nepoznana oz. vsebujejo B₁₂ v neaktivni obliki (Richter in sod., 2016).

8.3 PREHRANSKA DOPOLNILA Z VITAMINOM B₁₂

8.3.1 Proizvodnja vitamina B₁₂

Woodward in Eschenmoser sta leta 1973 ob pomoči več kot 100 znanstvenikov in njihovem 10 letnem delu odkrila celoten proces kemične sinteze proizvodnje vitamina B₁₂. Proces kemične sinteze je zelo zahteven in vsebuje približno 70 procesnih korakov. Zaradi zahtevnosti in visokih cen se tovrstni način proizvodnje vitamina ne uporablja. Za proizvodnjo vitamina B₁₂ se uporabljajo biološki postopki fermentacije z izbranimi in genetsko optimizirani mikroorganizmi.

Biosintezna pot je bila dokončno pojasnjena leta 1993 v aerobni bakteriji *Pseudomonas denitrificans*. Rodovi ki so zmožni proizvodnje so: *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Norcardia*, *Propionibacterium*, *Protaminobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Streptococcus* and *Xanthomonas*. Sinteza vitamina B₁₂ na novo je tako omejena na nekaj bakterij in arhej in posledično so tudi živila živalskega izvora vir vitamina le zaradi svoje poseljenosti prebavil z bakterijami. Za biosintezo na novo je potrebnih 30 genov. Proizvodnja lahko poteka po aerobni poti, ki je odvisna od kisika, kot na primer pri *Pseudomonas denitrificans* ali po anaerobni poti, od kisika ne odvisni, kot na primer pri *Bacillus megaterium*, *P. shermanii* in *Salmonella typhimurium* (Martens in sod., 2002). *Escherichia coli* ni zmožna proizvesti vitamina B₁₂ na novo ampak iz že prisotnih delnih komponent vitamina. Sevi bakterije *Salmonella* pa proizvajajo kobalamin le pri anaerobnih pogojih (Lawrence in Roth, 1996).

Industrijska produkcija vitamina B₁₂ temelji na uporabi bakterij *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium shermanii* in *Sinorhizobium meliloti*. Kljub temu pa imajo ti sevi nekaj pomanjkljivosti kot so na primer dolg fermentacijski cikel, kompleksen in drag medij ter pomanjkanje primernih genetskih sistemov za inženiring sevov (Fang in sod., 2017).

8.3.2 Merjenje prisotnega vitamina

Vsebnost vitamina B₁₂ v hrani je z nekaj izjemami zelo nizka, približno 1 µg/100 g ali še nižja. Zato je njegovo določanje izjemno zahtevno. Uporablja se več metod, med katerimi je najpogostejša mikrobiološka metoda, pri kateri se običajno uporablja mlečnokislinsko bakterijo *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* kot testni organizem, ki porablja vitamin B₁₂ (Arkbåge, 2003).

Mikrobiološka metoda določanja vsebnosti vitamina B₁₂ sodi med starejše metode in je bila prvič opisana že leta 1950. Kot testni organizem je bila uporabljena *Euglena gracillis var bacillaris*, ki pa je imela rastno dobo dolgo nekaj dni, zato so začeli iskati primernejše mikroorganizme. Za malo boljšega se je izkazala bakterija *Lactobacillus leismannii*, ki je bila odporna na kloramfenikol, rezultati so bili že v 24 urah, obenem pa pri delu ni bilo potrebno zagotoviti aseptičnih pogojev (Karmi in sod., 2011).

Druga najbolj pogosto uporabljena metoda je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), ki pa daje dobre rezultate predvsem pri določanju vsebnosti vitamina B₁₂ v prehranskih dopolnilih, kjer so koncentracije višje (Arkbåge, 2003). Poleg omenjenih obstajajo še elektroluminiscenca in radioimunska metoda, ki sta zelo hitri in preprosti, obenem pa izredno dragi, saj zahtevata čisti intrinzični faktor in posebne reagente. Redko se uporabljajo še masna spektrometrija in atomska absorpcijska spektroskopija. Masna spektrometrija je ena izmed boljših metod določanja vsebnosti vitamina B₁₂ zaradi svoje natančnosti, občutljivosti in popolnega avtomatskega dela. Pogosto se uporablja v kombinaciji z metodo HPLC, kjer se kobalamin pretvori v proste kobaltove ione. Zaradi visokih cen se masna spektrometrija uporablja večinoma le za farmacevtske namene (Karmi in sod., 2011).

9 ZAKLJUČEK

V obdobju v katerem živimo, izvajamo več različnih načinov prehranjevanja, vsakodnevno se srečujemo z novimi dietami, na voljo pa so nam tako rekoč vse znane informacije. Med njimi je potrebno poiskati uporabne in si tako ustvariti pravo sliko o tem, kaj in zakaj je nekaj zdravo in čemu naj se izogibamo. Ljudje smo si genetsko podobni, obenem pa tako različni, da nekatera vrsta hrane nekomu ustreza, pri drugem pa ista hrana lahko povzroči alergijsko reakcijo. Nedvomno pa vsi za normalen razvoj, rast in delovanje potrebujemo zadostno količino vitamina B₁₂. Edini zadovoljiv in zanesljiv naraven vir B₁₂, so živila živalskega izvora, predvsem jetra ter rdeče meso. S tehnološkim razvojem in vedno boljšimi oziroma natančnejšimi analitskimi metodami določanja vitamina B₁₂ so ta vitamin našli v različnih živilih, tudi tistih, kjer ga niso pričakovali, na primer v gobah, algah in zelenjavi. V nekaterih izdelkih se vrednost vitamina B₁₂ s tehnološkimi postopki zmanjša,

kot na primer v jogurtu, drugod pa tehnološki postopki, predvsem fermentacija, bistveno zvišajo njegovo vsebnost. Fermentirani izdelki so veliko bolj kot pri nas poznani v Azijskih deželah, kjer fermentirajo različne vrste zelenjave, ter jim tako povečajo prehransko vrednost. Tudi način gojenja in gnojenja rastlin vpliva na vsebnost vitamina B₁₂. Obenem pa je potrebno poudariti, da večina omenjenih živil, v katerih so odkrili prisotnost vitamina B₁₂, vsebuje le manjše količine in zato niso zadosten vir za pokritje dnevnih potreb. Le-te znašajo za odraslo osebo 3 µg/dan. Do pomanjkanja lahko pride zaradi različnih razlogov, od perniciozne anemije, nezadostnega vnosa s hrano, okužbe z bakterijami *Helicobacter pylori*, kirurških posegov, do Chronove bolezni in drugih razlogov. Bistvene posledice pomanjkanja so vidne predvsem na krvni sliki, za katero je značilna megaloblastna anemija, nič manj pomembne niso nevrološke motnje. Pri določanju, ali gre v telesu za pomanjkanje vitamina B₁₂, je bistveno merjenje vsebnosti homocisteina in metilmalonske kisline v krvni plazmi, saj sta v primeru pomanjkanja obe vrednosti povečani. Zdravljenje je večinoma vseživljenjsko in vključuje intramuskularne injekcije ali prehranska dopolnila v obliki kapsul ali spreja.

Proizvodnja vitamina B₁₂ zaradi zavedanja njegove pomembnosti narašča. Glavna proizvajalka je Kitajska, kjer je proizvodna cena leta 2008 znašala med 2000 €/kg in 4300 €/kg. Glede na naše dnevne potrebe lahko izračunamo, da je proizvodnja vitamina B₁₂ cenovno zelo ugodna, saj znaša proizvodna cena za 3 µg, ki jih potrebujemo dnevno, med 0,0000020 in 0,0000043 €, torej manj kot desetinko centa na leto (Yamei, 2009).

Navkljub vsemu že znanemu je še precej neznanega predvsem o mogočih naravnih virih in možnostih povečanja vsebnosti vitamina B₁₂ v živilih, ki niso živalskega izvora. Do takrat pa velja, da morajo ljudje, ki ne uživajo živalskih živil, po priporočilih relevantnih prehranskih organizacij, trajno uživati preparate z B₁₂.

10 VIRI

- Alm L. 1982. Effect of fermentation on B-vitamin content of milk in Sweden. *Journal of Dairy Science*, 65, 3: 353-359
- Antony A. C. 2011. Megaloblastic anemias. V: *Goldman's Cecil medicine.*: Vol 1. 24th ed. Goldman L., Schafer A. I.(eds). New York, Elsevier: 1075-1083
- Arkbåge K. 2003. Vitamin B₁₂, folate and folate- binding proteins in dairy products analysis, process retention and bioavailability. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences: 69 str.
- Baik H. W., Russell R. M. 1999. Vitamin B₁₂ deficiency in the elderly. Boston, USDA Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, 19: 357-371
- Bennink M. R., Ono K. 1982. Vitamin B₁₂, E and D content of raw and cooked beef. *Journal of Food Science*, 47, 6: 1786-1792
- Bito T., Ohishi N., Hatanaka Y., Takenaka S., Nishihara E., Yabuta Y., Watanabe F. 2013. Production and characterization of cyanocobalamin-enriched lettuce (*Lactuca sativa L.*) grown using hydroponics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 16: 3852-3858
- Bito T., Bito M., Asai Y., Takenaka S., Yabuta Y., Tago K., Ohnishi M., Mizoguchi T., Watanabe F. 2016. Characterization and quantitation of vitamin B₁₂ compounds in various *Chlorella* supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 45: 8516-8524
- Carmel R. 2000. Current concepts in cobalamin deficiency. New York, Department of Medicine, 51: 357-375
- Carmel R. 2008. How I treat cobalamin (vitamin B₁₂) deficiency. *Blood*, 112, 6: 2214-2221
- Chan C. Q. H., Low L. L., Lee K. H. 2016. Oral vitamin B₁₂ replacement for the treatment of pernicious anemia. *Frontiers in Medicine*, 3, 38: doi: 10.3389/fmed.2016.00038: 6 str.
- Clarke R., Refsum H., Birks J., Evans J. G., Johnston C., Sherliker P., Ueland P. M., Schneede J., McPartlin J., Nexo E., Scott J. M. 2003. Screening for vitamin B₁₂ and folate deficiency in older persons. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1241-1247
- Fang H., Kang J., Zhang D. 2017. Microbial production of vitamin B₁₂: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 16, 15: 1-14
- Fidler Mis N., Orel R. 2013. Vegetarian diets in pregnancy, lactation, infancy and childhood. *Zdravniški Vestnik*, 82, 1:133-137
- Gille D., Schmid A. 2015. Vitamin B₁₂ in meat and dairy products. *Nutrition Reviews*, 73, 2: 106-115

- Gräsbeck R. 2006. Imerslund-Gräsbeck syndrome (selective vitamin B₁₂ malabsorption with proteinuria). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1, 17: 1-6
- Hannibal L., Lysne V., Bjørke-Monsen A.-L., Behringer S., Grünert S. C., Spiekerkoetter U., Jacobsen D. W., Blom H. J. 2016. Biomarkers and algorithms for the diagnosis of vitamin B₁₂ deficiency. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 27: doi: 10.3389/fmolb.2016.00027: 16 str.
- Karmi O., Zayed A., Baragethi S., Qadi M., Ghanem R. 2011. Measurement of vitamin B₁₂ concentration: a review on available methods. *The IIOABJ Journal*, 2, 2: 23-32
- Keuth S., Bisping B. 1993. Formation of vitamins by pure cultures of tempe moulds and bacteria during the tempe solid substrate fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 5: 427-434
- Kittaka-Katsura H., Ebara S., Watanabe F., Nakano Y. 2004. Characterization of corrinoid compounds from a Japanese black tea (Batabata-cha) fermented by bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4: 909-911
- Kozyraki R., Cases O. 2012. Vitamin B₁₂ absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie*, 95, 5: doi: 10.1016/j.biochi.2012.11.004: 6 str.
- Lahner E., Persechino S., Annibale B. 2012. Micronutrients (other than iron) and *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter*, 17, 1: 1-15
- Lawrence J. G., Roth J. R. 1996. Evolution of coenzyme B₁₂ synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. *Genetics*, 142, 1: 11-24
- Liem I. T. H., Steinkraus K. H., Cronk T. C. 1977. Production of vitamin B₁₂ in tempeh, a fermented soybean food. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 6: 773-776
- Lin Y.-L., Juan I.-M., Chen Y.-L., Liang Y.-C., Lin, J.-K. 1996. Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 6: 1387-1394
- Martens J. H., Barg H., Warren M., Jahn D. 2002. Microbial production of vitamin B₁₂. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 3: 275-285
- Melina V., Craig W., Levin S. 2016. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: vegetarian diets. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 116, 12: 1970-1980
- Miyamoto E., Yabuta Y., Kwak C. S., Enomoto T., Watanabe F. 2009. Characterization of vitamin B₁₂ compounds from Korean purple laver (*Porphyra sp.*) products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7: 2793-2796
- Mlakar U. 2005. Megaloblastna anemija. V: *Interna medicina*. Kocjančič A., Mravlje F. (ur.). Ljubljana, Littera Picta d.o.o.: 1202-1231
- Mozafar A. 1994. Enrichment of some B-vitamins in plants with application of organic fertilizers. *Plant and Soil*, 167, 2: 305-311

- Nakano S., Takekoshi H., Nakano M. 2010. *Chlorella pyrenoidosa* supplementation reduces the risk of anemia, proteinuria and edema in pregnant women. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 1: 25-30
- Nishioka M., Kanosue F., Yabuta Y., Watanabe F. 2011. Loss of vitamin B₁₂ in fish (Round Herring) meats during various cooking treatments. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 57, 6: 432-436
- Obeid R., Fedosov S. N., Nexo E. 2015. Cobalamin coenzyme forms are not likely to be superior to cyano- and hydroxyl-cobalamin in prevention or treatment of cobalamin deficiency. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 7: 1364-72
- Pawlak R., Parrott S. J., Raj S., Cullum-Dugan D., Lucus D. 2013. How prevalent is vitamin B₁₂ deficiency among vegetarians? *Nutrition Reviews*, 71, 2: 110-117
- Pokorn D. 2004. Dietna prehrana bolnika. Ljubljana, Založba Marbona d.o.o.: 315-320
- Ralapanawa D. M. P. U. K., Jayawickreme K. P., Ekanayake E. M. M., Jayalath W. A. T. A. 2015. B₁₂ deficiency with neurological manifestations in the absence of anaemia. *BMC Research Notes*, 8, 458: doi: 10.1186/s13104-015-1437-9: 4 str.
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 215 str.
- Richter M., Boeing H., Grünewald-Funk D., Heseker H., Kroke A., Leschik-Bonnet E., Oberritter H., Strohm D., Watzl B. 2016. Vegan diet- position of the German Nutrition Society (DGE). *Ernaehrungs Umschau International*, 63,4: 92-102
- Routh J. K., Koenig S. C. 2014. Severe vitamin B₁₂ deficiency mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 124, 11: 1844-1845
- Sato K., Kudo Y., Muramatsu K. 2004. Incorporation of a high level of vitamin B₁₂ into a vegetable, kaiware daikon (Japanese radish sprout), by the absorption from its seeds. *Biochim Biophys Acta*, 1672, 3: 135-137
- Serin E., Gümürdülü Y., Özer B., Kayaselçuk F., Yılmaz U., Koçak R. 2002. Impact of *Helicobacter pylori* on the development of vitamin B₁₂ deficiency in the absence of gastric atrophy. *Helicobacter*, 7, 6: 337-341
- Smolin A. L., Grosvenor B. M. 2008. *Nutrition: science and application*. 4th ed. Hoboken, J. Wiley & Sons: 349-352
- Stabler S. P. 2013. Vitamin B₁₂ deficiency. *New England Journal of Medicine*, 368, 2: 149-160
- Steinkraus K. H. 1983. Traditional food fermentations as industrial resources. *Acta Biotechnologica*, 3, 1: 3-12
- Tan L. T. H., Ho K. K. F., Fong G. C. Y., Ong K. L. 2010. Subacute combined degeneration of the spinal cord. *Hong Kong Journal of Emergency Medicine*, 17, 1: 79-81

- Tempeh. 2017. Združene države Amerike, Wikipedia: 1 str. <https://en.wikipedia.org/wiki/Tempeh> (junij 2017)
- Teng F., Bito T., Takenaka S., Yabuta Y., Watanabe F. 2014. Determination of vitamin B₁₂ in chinese black tea leaves. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 14: 1326-1332
- Teng F., Bito T., Takenaka S. 2016. Yolk of the centuri egg (Pidan) contains a readily digestible form of free vitamin B₁₂. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 62: 366-371
- Venkatramanan S., Armata I. E., Strupp B. J., Finkelstein J. L. 2016. Vitamin B₁₂ and cognition in children. *Advances in Nutrition*, 7: 879-888
- Watanabe F., Katsura H., Takenaka S., Fujita T., Abe K., Tamura Y., Nakatsuka T., Nakano Y. 1999. Pseudovitamin B₁₂ is the predominant cobamide of an algal health food, spirulina tablets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 11: 4736-4741
- Watanabe F., Miyamoto E., Fujita T., Tanioka Y., Nakano Y. 2006. Characterization of a corrinoid compound in the edible (blue-green) alga, *Suizenji-nori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 12: 3066-3068
- Watanabe F. 2007. Vitamin B₁₂ sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 232, 10: 1266-1274
- Watanabe F., Schwarz J., Takenaka S., Miyamoto E., Ohishi N., Nalle E., Hochstrasser R., Yabuta Y. 2012. Characterization of Vitamin B₁₂ compounds in the wild edible mushrooms black trumpet (*Craterellus cornucopioides*) and golden chanterelle (*Cantharellus cibarius*). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 58, 6: 438-441
- Watanabe F., Yabuta Y., Tanioka Y., Bito T. 2013. Biologically active vitamin B₁₂ compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 28: 6769-6775
- Yamei Z. 2009. New round of price slashing in vitamin B₁₂ sector. *China chemical report*: 1 str. http://blog.tianya.cn/blogger/post_show.asp?BlogID=2968076&PostID=24434221 (junij 2017)