



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Erik HROVATIN

**PRISOTNOST VITAMINA B12 V ZELENJAVI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Erik HROVATIN

**PRISOTNOST VITAMINA B12 V ZELENJAVI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

**PRESENCE OF VITAMIN B12 IN VEGETABLES**

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje Živilstvo in prehrana. Delo je bilo opravljeno tudi eksperimentalno na Univerzi v Ljubljani na Oddelku za živilstvo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Iztoka Prislana in za recenzenta prof. dr. Rajka Vidriha.

Mentor: doc. dr. Iztok PRISLAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzent: prof. dr. Rajko VIDRIH  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentor:

Recenzent:

Datum zagovora:

Erik HROVATIN

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Du1
- DK UDK 577.164.1:613.26:641.1(043)=163.6
- KG vitamin B12, cianokobalamin, *Lactobacillus*, rastlinska živila, zelenjava, vsebnost vitamina B12, veganska prehrana
- AV HROVATIN, Erik
- SA PRISLAN, Iztok (mentor), VIDRIH, Rajko (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2019
- IN PRISOTNOST VITAMINA B12 V ZELENJAVI
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
- OP VIII, 18 str., 5 pregl., 4 sl., 33 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Vitamin B12 je esencialen za človeško življenje. Splošno prepričanje je, da ga z vegansko prehrano ne moremo zagotavljati, ker ga v živilih rastlinskega izvora načeloma ne najdemo. Rastline ga namreč same po sebi ne morejo sintetizirati, vendar pa obstajajo teorije, ki opisujejo možnost obogatitve rastlinske hrane z vitaminom B12 pod določenimi pogoji iz okolja. V diplomski nalogi obravnavamo načine, kako lahko vitamin B12 najde pot v rastline s pravilnimi postopki gnojenja tal, v rastlinah gojenih v hidroponiki, v fermentiranih rastlinah in v algah. V delu so predstavljene prednosti in slabosti različnih kvalitativnih in kvantitativnih metod določevanja prisotnosti in količine vitamina B12 v živilih. Z namenom določevanja količine vitamina B12 v različnih vzorcih hrane smo v delu preizkusili kvantitativno mikrobiološko metodo z *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*). S standardom vitamina B12 smo določili linearno območje krivulje, v katerem velja, da metoda ponazarja pravilne koncentracije vitamina B12 v vzorcih. Tekom raziskovanja smo ugotovili, da ima lahko metoda nekatere pomanjkljivosti, ki jih je potrebno nadalje preiskati. Te sta vpliv cianida v procesu ekstrakcije vitamina B12 iz živil in če je rast mikroorganizma *Lactobacillus delbrueckii* odvisna le od prisotnosti cianokobalamina ali tudi njegovih analogov.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

ND Du1  
DC UDC 577.164.1:613.26:641.1(043)=163.6  
CX vitamin B12, cyanocobalamin, *Lactobacillus*, food of plant origin, vegetables, vitamin B12 content, vegan nutrition  
AU HROVATIN, Erik  
AA PRISLAN, Iztok (supervisor), VIDRIH, Rajko (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2019  
TI PRESENCE OF VITAMIN B12 IN VEGETABLES  
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition)  
NO VIII, 18 p., 5 tab, 4 fig, 33 ref  
LA sl  
AL sl/en  
AB Vitamin B12 is essential for human life. It is common belief that it cannot be provided with a vegan diet, because it cannot be found in food of plant origin. Plants cannot synthesize it by themselves, but there are theories that support the possibility to add vitamin B12 to plants under certain environmental circumstances. In this BSc thesis different pathways of incorporation of vitamin B12 in plants with proper soil fertilization procedures, hydroponics agricultural practices, lactic fermentation of plant food and production of algae are reviewed. Advantages and disadvantages of the various qualitative and quantitative methods of determination of vitamin B12 will be discussed. For the purpose of determining the quantity of vitamin B12 in different samples of food of plant origin, the quantitative microbiological method with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*) was tested. With a vitamin B12 standard we have determined the linear range of the curve in which the method shows the right concentration ranges of vitamin B12 in samples. In the course of the research we found out that the method may have some drawbacks that need to be further explored. These are how does cyanide affect the extraction process of vitamin B12 from food samples and if the *Lactobacillus* micro-organism can grow only in the presence of cyanocobalamin or also in the presence of its analogues.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN .....	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>1</b>
2.1 VITAMIN B12.....	2
2.1.1 <b>Struktura in lastnosti.....</b>	<b>3</b>
2.1.2 <b>Analogi vitamina B12 .....</b>	<b>4</b>
2.1.3 <b>Sinteza in bakterije, ki proizvajajo vitamin B12 .....</b>	<b>4</b>
2.1.4 <b>Absorpcija .....</b>	<b>5</b>
2.1.5 <b>Pomanjkanje .....</b>	<b>5</b>
2.2 TESTI IN NAČINI DOLOČANJA VSEBNOSTI VITAMINA B12 V ŽIVILIH .	6
2.3 PREHRANSKI VIRI VITAMINA B12 .....	7
2.3.1 <b>Vitamin B12 v tleh .....</b>	<b>8</b>
2.3.2 <b>Solata gojena v hidroponiki .....</b>	<b>9</b>
2.3.3 <b>Gobe .....</b>	<b>10</b>
2.3.4 <b>Fermentirana živila .....</b>	<b>10</b>
2.3.5 <b>Alge .....</b>	<b>11</b>
2.3.5.1 <b>Cianobakterije .....</b>	<b>11</b>
2.3.5.2 <i>Chlorella</i> .....	12
2.3.5.3 <i>Spirulina</i> .....	12
2.3.5.4 <b>Nori.....</b>	<b>12</b>
2.3.5.5 <i>Coccolithophorid algae</i> .....	13
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>14</b>
<b>4 REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>15</b>
<b>5 SKLEPI.....</b>	<b>17</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>18</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>19</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost vitamina B12 v nekaterih živil (Korošec in Vertnik, 2011).....	8
Preglednica 2: Količina vitamina B12 v odvisnosti načina gnojenja tal (Mozafar, 1994)..	9
Preglednica 3: Količina absorbiranega vitamina B12 v rastlinah gojenih z organskimi gnojili in brez gnojenja (Mozafar, 1994).....	9
Preglednica 4: Količina vitamina B12 v gobah (Watanabe in sod., 2012).....	10
Preglednica 5: Nivo metilmalonske kisline (MMK) v krvi po prehrani z nori algami (Yamada in sod., 1999).....	13

## KAZALO SLIK

Slika 1. Molekula kobalamina in njuni radikali (Martens in sod., 2001) .....	3
Slika 2. Mikrotiterska plošča po inkubaciji; motnost narašča iz leve proti desni in od spodaj navzgor (levo) in spektrofotometer za mikrotiterske plošče (desno).....	14
Slika 3. Primerjalni graf med našo in standardizirano umeritveno krivuljo iz kita .....	15
Slika 4. Grafikon z združenimi podatki iz literature in v našem laboratoriju izmerjenimi podatki s prikazom linearne odvisnosti med koncentracijo in odzivom spektrofotometra.....	16



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DMB - dimetilbenzimidazol

DNK - deoksiribonukleinska kislina

EFSA - Evropska agencija za varnost hrane (ang. European Food Safety Authority)

MCV - srednji korpuskularni volumen (ang. mean corpuscular volume)

MMK - metilmalonska kislina

## 1 UVOD

Za optimalno delovanje telesa potrebuje človek veliko snovi, ki jih lahko pridobi le s prehrano. Ena izmed takšnih je tudi vitamin B12. Ob porastu števila ljudi, ki se prehranjujejo z vegansko prehrano, je vitamin B12 čedalje bolj v središču pozornosti, tako v javnosti kot v znanstvenem svetu. Za vegane je ključnega pomena, ker pravilno zastavljena veganska prehrana ne more, med vsemi molekulami, ki jih telo potrebuje, zagotavljati le vitamina B12 in D vitamina. Odsotnost vitamina D v prehrani ni tako kritična, saj ga lahko telo sintetizira samo po sebi iz holesterola, ko je izpostavljeno sončnim žarkom. Zato je pomanjkanje vitamina B12 najšibkejša točka veganske prehrane. V diplomski nalogi obravnavam teorije, ki zagovarjajo, da je lahko ta vitamin prisoten tudi v rastlinah. V delu sta predstavljeni struktura in funkcija vitamina B12 ter posledice njegovega pomanjkanja, prehranski viri in vsa potencialna rastlinska živila, kamor ga lahko vključimo. Podrobno so predstavljeni testi in metode s katerimi je mogoče vitamin B12 kvantificirati ter mikrobiološki test kvantifikacije z *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*), ki smo ga preizkusili laboratoriju.

### 1.1 NAMEN

Namen diplomske naloge je predstaviti možnosti vključitve vitamina B12 v živila rastlinskega izvora ter raziskati hipotezo, če bi lahko s prehrano, ki izključuje živila živalskega izvora, zadostili potrebam po tem vitaminu na dnevni ravni skozi celotni življenjski cikel. Prav tako je bil namen diplomskega dela preizkusiti in ovrednotiti mikrobiološko metodo z uporabo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*), s pomočjo katere lahko določamo vsebnost vitamina B12 v različnih vzorcih.

### 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Delovna hipoteza je, da lahko vitamin B12 vključimo ali najdemo v živilih rastlinskega izvora.

## 2 PREGLED OBJAV

Kazimierz Funk je že leta 1911 sestavil besedo vitamin iz dveh latinskih izrazov: vita (življenje) in amin (vsebuje dušik). Prepričan je bil, da so vitamini življenjsko pomembne snovi, ki vsebujejo dušik. Frunkov prvi del trditve je še danes pravilen saj so vitamini organske spojine, ki so organizmu esencialne za pravilno opravljanje osnovnih življenjskih nalog. Telo jih samo, z redkimi izjemami, ne more ustvarjati. V manjši meri lahko nekatere vitamine sintetiziramo tudi sami, vendar izključno iz provitaminov (na primer vitamin A ustvarjamo iz provitamina A, holesterol pa z ultravijolično svetlobo spremenimo v vitamin D), v veliki meri pa se vitamine zaužije in zagotavlja s hrano. Če v daljšem časovnem obdobju s prehrano ne zagotovimo dovoljšne količine zgolj enega vitamina, se pojavijo znamenja pomanjkanja, ki lahko nenazadnje privedejo tudi do smrti. Danes lahko vitamine

uživamo tudi v obliki preparatov, bodisi kot nadomestek prehrani, bodisi v terapevtske namene. Če se ti preparati uporabljajo v dietetične namene, jih lahko kupimo ne le v lekarnah brez recepta, ampak tudi v trgovinah z živili. Na tak način je njihova prodaja premalo nadzorovana, izbira preparatov pa je prepuščena površnemu znanju povprečnega človeka in njegovi kupni moči. Zato je vitamine sicer najboljše zaužiti s prehrano, saj sta takrat izkoristek in absorpcija največja. Jemljemo jih tudi lahko v obliki farmacevtskih pripravkov, ki so lahko sintetičnega ali naravnega izvora. Znanstvene raziskave so pokazale, da je absorpcija tako sintetično pridelanih vitaminov kot pridelanih iz naravnih virov praviloma enaka, vendar so tisti, izdelani iz naravnih virov, velikokrat dražji. Lipofilni vitamini (A, D, E in K) se najboljše absorbirajo, če jih jemljemo med obrokom. Tudi vodotopni vitamin C je primernejše zaužiti med obroki, saj to pripomore k boljši absorpciji biogenih elementov, na primer železa. Poleg omenjenih vitaminov obstajajo še vodotopni B vitamini, med katere spadajo vitamini B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niacin ali nikotinska kislina), B5 (pantotenska kislina), B6 (piridoksin), B8 (biotin), B9 (folna kislina ali folat) in B12 (kobalamin) (Medić-Šarić in sod., 2002). Naše telo potrebuje za nemoteno delovanje 13 vitaminov in čas je pokazal, da je drugi del Funkove trditve napačen. Dušika namreč ne vsebujejo vsi vitamini. Njihovo delovanje je v osnovi resda podobno, vsi so namreč vpleteni v nadzorovanje in uravnavanje pomembnih kemijskih reakcij presnove v našem telesu, vendar pa so to s stališča kemije povsem različne organske spojine, ki imajo po strukturi le nekaj podobnih ali skupnih značilnosti. V splošnem vitamini delujejo bodisi kot koencimi ali pro-hormoni, vendar tako kot vse poenostavitve, to izpušča nekatere druge vitalne funkcije, ki jih opravljajo (Marks, 1993; Muhleib, 1999).

## 2.1 VITAMIN B12

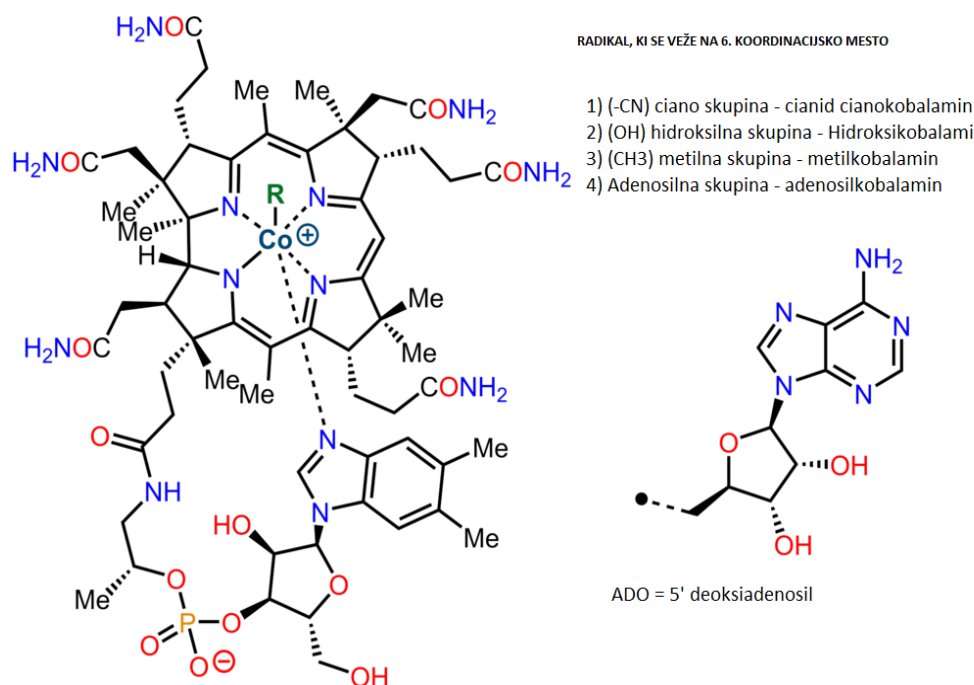
Vitamin B12 spada v skupino molekul, imenovanih kobalamini. Vsem je skupno, da vsebujejo v molekuli kobaltov atom, od tod tudi ime kobalamini. Je vodotopna molekula, ki v organizmu deluje kot koencim. Sodeluje pri presnovi aminokislin, maščobnih kislin, folata pri sintezi DNK ter je nujno potreben za sintezo purina in timidina, rast krvnih celic, delovanje ščitnice in sintezo mielina (EFSA, 2015). EFSA (European Food Safety Authority) je odobrila, da se živilom, ki so dober vir vitamina B12, lahko pripiše naslednje zdravstvene trditve:

- prispeva k sproščanju energije pri presnovi,
- prispeva k delovanju živčnega sistema,
- prispeva k presnovi homocisteina,
- prispeva k normalnemu delovanju kognitivnih funkcij,
- ima vlogo pri nastajanju rdečih krvničk,
- ima vlogo pri delovanju imunskega sistema,
- prispeva k zmanjšanju utrujenosti in izčrpanosti,
- ima vlogo pri delitvi celic (EFSA, 2010).

Do večjega zanimanja za vitamin B12 je v znanstvenem svetu prišlo v letu 1920, ko sta ameriška znanstvenika Minot in Marphy dokazala, da se lahko pozdravi Pernicijozno anemijo (prvič opisana leta 1835) s prehrano, ki je vključevala jetrca. Znanstvenika sta snov, ki aktivno deluje pri zdravljenju bolezni, imenovala ekstrinzični faktor. Odkritje je sprožilo zanimanje in preiskave za identifikacijo dotične snovi, kar je posledično vodilo v razvoj novih področij znanstvenih raziskav (Martens in sod., 2001).

### 2.1.1 Struktura in lastnosti

Vitamin B12 je največji in strukturno najkompleksnejši med vitamini z molsko maso 1580 g/mol. Molekulo lahko obravnavamo v treh delih: jedro je planarna krožna struktura imenovana korinov obroč, ki ima v središču kation kobalta Co (III) in se zaradi tega v vodi temno rdeče obarva. Kobalt tvori 6 koordinacijskih mest, od katerih so štiri vezana na pirolne enote, peta na dimetilbenzimidazol (DMB), na šesto mesto pa se lahko vežejo različni radikali, po katerih se nato molekula poimenuje (Martens in sod., 2001; Wells in sod., 2016). Vitamin B12 je stabilen pri toplotni obdelavi in na zraku, najbolj pa mu škoduje močna svetloba, pri kateri se zlahka pretvori v hidroksikobalamin. V prisotnosti cianida se tvori stabilnejši cianokobalamin. V tradicionalnem načinu priprave hrane se izgubi približno 12% vitamina B12 iz živil (Martens in sod., 2001; Watanabe, 2007).



Slika 1. Molekula kobalamina in njuni radikali (Martens in sod., 2001)

Peto mesto koordinacijske vezi je ključnega pomena pri določevanju aktivnosti molekule. Ko se na tem mestu veže DMB (slika 1), je molekula kot koencim za ljudi aktivna. To velja za vse 4 radikale, ki so lahko vezani na 6. koordinacijskem mestu. Poznamo torej:

- Cianokobalamin je aktivna koencimska oblika, ki v veliki meri v naravi nastane samo zato, ker se ostale tri oblike, ob prisotnosti cianida, pretvorijo vanj. V telesu naravno ni prisoten. To obliko je mogoče z lahkoto kristalizirati poleg tega je odporna na oksidativne pogoje, zato se najpogosteje uporablja v prehranskih dodatkih.
- Hidroksikobalamin je druga oblika vitamina, ki ni navadno prisotna v človeškem telesu. Večinoma ga proizvajajo bakterije in se ga pretvori v cianokobalamin za komercialne dodatke. Ker ta molekula zelo hitro veže cianid se ga uporablja tudi kot protistrup ob zastrupitvah s cianidom. Ta je kot koencim v encimskih procesih najbolj reaktiven, vendar se ga zaradi višje cene uporablja le v skrajnih primerih pomanjkanja.
- Adenosil in metil kobalamin sta aktivni obliki, ki naravno obstajata in se tvorita v telesu. Telo v jetrih shranjuje obliko adenosilkobalamina in ga po potrebi spremeni v metilkobalamin (EFSA, 2015; Martens in sod., 2001).

### 2.1.2 Analogi vitamina B12

Obstaja tudi možnost, da se na 5. koordinacijskem mestu namesto DMB veže adenzin. V tem primeru je za ljudi molekula kot koencim neaktivna, saj ima adenzin manjšo afiniteto na intrinzični faktor in ga zaradi tega telo ne more absorbirati. Neaktivne molekule za ljudi imenujemo analogi vitamina B12. V povprečju je približno 1/3 vseh spojin s korinovim obročem v telesu neaktivnih (Watanabe, 2007).

### 2.1.3 Sinteza in bakterije, ki proizvajajo vitamin B12

Biosinteza vitamina B12 je zelo zapletena in omejena na nekatere člane prokariotskega sveta, nikoli pa ni prišlo do prehoda k evkariontom. Mikrobna „de novo“ (na novo) biosinteza vitamina B12 se pojavlja prek dveh alternativnih poti: aerobne ali anaerobne, v bakterijah oziroma arhejah. Nekateri sevi lahko sintetizirajo tudi vitamin B12 tako, da absorbirajo spojine s korinovim obročem preko „salvage“ (reševalne) poti in jih nato pretvorijo v vitamin B12 (Martens in sod., 2001).

Cianobakterije so najbolj razširjeni mikrobi, ki v morju izvajajo fotosintezo. Dva seva tega rodu, *Crocospaera watsonii* WH8501 in *Synechococcus* sp. WH7803, sproščajo B12 z izjemno veliko hitrostjo, in so glavni vir kobalaminov za alge in druge oblike morskega življenja. *Synechococcus* sevi sintetizirajo v glavnem pseudokobalamin. Ostali najpomembnejši mikrobi, ki proizvajajo ta vitamin so:

- Aerobno: *Pseudomonas dentrificans*, *Rhodobacter capusulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Sinorhizobium meliloti*.

- Anaerobno: *Salmonella typhimurium*, *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium shermanii*, *Escherichia coli*, *Thermotoga thermarum*, *Thermotoga lettingae*, *Fervidobacterium nodosum*, *Thermosipho melanesiensis*, *Thermosipho africanus*, *Kosmotoga olearia* (Fang in sod., 2017).

Letno se iz številnih bakterijskih vrst komercialno proizvede več kot 10 ton vitamina B12. Industrijska proizvodnja se zanaša na mikrobo fermentacijo, pri čemer se uporabljajo predvsem *Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium shermanii* ali *Sinorhizobium meliloti*. Toda ti sevi imajo več pomanjkljivosti, na primer dolge fermentacijske cikle, kompleksne in drage zahteve za medije ter pomanjkanje ustreznih genetskih sistemov za genski inženiring. Dodatki vitamina B12 se proizvajajo tudi z cianobakterijo *Arthrospira* sp. (Spirulina), ki večinoma proizvaja pseudovitamin, zato imajo takšni pripravki zelo nizko biološko razpoložljivost vitamina B12. Nedavno pa so inženirji svojo pozornost usmerili na *Escherichia coli* za platformo proizvodnje vitamina B12. *E. coli* lahko sintetizira vitamin B12 tudi po poti »salvage« (rešavalni). (Fang in sod., 2017; Watanabe in sod., 2002; Watanabe in sod., 2006).

#### 2.1.4 Absorpcija

Čeprav v debelem črevesju nekatere bakterije proizvajajo vitamin B12, ga ostali mikroorganizmi porabijo že na samem mestu nastajanja, zaradi česar ne prodira v ostale dele telesa. Posledično je telo za absorpcijo obravnavane molekule odvisno od prehranskih virov. V živilih najdemo vitamin B12 večinoma vezan na beljakovine, tako je presnova precej kompleksnejša kot pri drugih hranilih. Pri zdravih ljudeh se iz hrane absorbira približno 50% zaužitega vitamina B12. Otroci od 13. leta dalje in odrasli potrebujejo 3 µg vitamina B12 dnevno. Potrebe po vitaminu B12 se povečajo v nosečnosti (3,5 µg dnevno) in pri dojenju (4 µg) (Pitkin in sod., 2000; Marks, 1993).

#### 2.1.5 Pomanjkanje

Do pomanjkanja pride najpogosteje, ko iz prehrane izključimo popolnoma meso, mlečne izdelke in jajca (veganstvo), ali kot posledica slabe absorpcije zaradi odsotnosti intrinzičnega faktorja, to je transportni protein, ki veže vitamin B12 za nadaljnjo absorpcijo. Ta nastaja in se sprošča iz želodčne sluznice. Razlog pomanjkanja pa je vedno v neprimerni prehrani, ali zaradi nezadostnega vnosa vitamina B12 ali zaradi pomanjkanja beljakovin (Pitkin in sod., 2000; Marks, 1993).

Neprimerno prehranjevanje nosečnic je v obdobju dojenja in med samo nosečnostjo lahko zelo nevarno, saj pomanjkanje vitamina B12 pri dojenčkih lahko hitro privede do nevroloških in metabolnih motenj, ali celo bolezni. V odrasčanju pa se pomanjkanje največkrat izrazi v nenormalnem nastajanju celic v kostnem mozgu, ki vodi v slabokrvnosti (megaloblastična anemija), za katero je značilen povečan srednji korpuskularni volumen (velikost rdečih krvnih celic) (MCV). Ob pomanjkanju se tudi

zviša nivo homocisteina v krvi (normalna vrednost 6–8 ng/mol), zviša se tudi nivo metilmalonske kisline (MMK). Merjenje nivoja MMK-ja je najbolj točen dokaz pomanjkanja vitamina B12, saj je ta edini faktor ki vpliva na to vrednost, obratno pa je za vrednosti MCV-ja in homocisteina odgovornih več faktorjev, med katerimi je tudi vitamin B9. Drastično pomanjkanje lahko povzroči tudi degeneracijo določenih predelov hrbtnega mozga (mnikularna mieloza), v najhujših primerih povzroča trajne okvare živčnega sistema. Posledice pomanjkanja vitamina B12 so tudi slab spomin in celo demenca, neplodnost in spontani splavi. Niso pa poznani škodljivi učinki previsokih vnosov vitamina B12 (Pitkin in sod., 2000).

## 2.2 TESTI IN NAČINI DOLOČANJA VSEBNOSTI VITAMINA B12 V ŽIVILIH

Številni prispevki v literaturi navajajo napačne vrednosti vitamina B12 v hrani, saj je kar 80 % tako imenovanega vitamina B12 v obliki analogov B12, ki biološko niso aktivni (Herbert, 1988). Nekateri izmed testov za določanje vsebnosti vitamina B12 so:

- Mikrobiološki testi – hranjenje bakterij, katerih preživetje je odvisno od prisotnosti vitamina B12. Velikokrat mikroorganizmi lahko zrastejo v prisotnosti tako aktivnih kot neaktivnih analogov, zato je večinoma ločevanje med aktivnimi in neaktivnimi nemogoče.
- Test s transportnimi proteini:
  - a) Transkobalamin I ali Haptocorrin: je protein, ki se sintetizira v ustni votlini, ko zaužijemo hrano. Protein se pred procesom presnove veže na vitamin B12 in tvori stabilnejši kompleks, ki brani molekulo vitamina B12 pred kislim okoljem želodca. Ima močno afiniteto na vse kobalamine, zato je neprimeren za določevanje razmerja med aktivnim vitaminom B12 in neaktivnimi analogi.
  - b) Intrinzični faktor: deluje pri transportu vitamina B12 v črevesne celice v *Ileumu*. Ima zelo majhno afiniteto za večino neaktivnih analogov, zato veže večinoma aktivne analoge, vendar lahko tudi nekaj neaktivnih. Omenjeni test je najbolj selektiven med testi transportnih proteinov.
  - c) Transkobalamin II: tvori komplekse z analogi vitamina B12 in jih iz celic preusmeri do jeter. Protein ima visoko afiniteto na skoraj vse neaktivne analoge. Zato je neprimeren za določevanje razmerja med aktivnim vitaminom B12 in neaktivnimi analogi.
- RIDA: analiza z alternativnim redčenjem radioizotopov lahko najboljše odraža funkcionalno vsebnost B12.
- Drugi testi: s kapilarno elektroforezo, spektrometrijo in kromatografijo lahko določimo točno strukturo molekul, posledično lahko ločimo aktivni delež in delež

analogov med kobalamini (Pitkin in sod., 2000; Tsiminis in sod., 2016; Dagnelie in sod., 1991).

Obstajajo tudi neposredni testi na ljudeh, s katerimi lahko še najbolj določimo aktivnost vitamina B12 v živilih, saj lahko podajo informacije kakšno je razmerje med vitaminom B12 in neaktivnimi analogi v živilu. To so:

- Izboljšanje makrocitične anemije: pomanjkanje vitamina B12 lahko privede do makrocitične anemije. Če bolnika hranimo s hrano, ki ima aktivno komponento vitamina B12, se anemija izboljša. Ker pa lahko omenjeno bolezen povzroča tudi pomanjkanje vitamina B9, je potrebno biti zelo previden pri prebiranju rezultatov.
- Znižanje homocisteina v krvi: še ena izmed posledic pomanjkanja vitamina B12 je povečanje nivoja homocisteina v krvi. S prehranjevanjem z vitaminom B12 se nivo homocisteina izboljša. Ker je lahko vzrok povišanega nivoja homocisteina tudi pomanjkanje vitaminov B6 in B9, omenjena metoda ni najboljša za določevanje aktivnosti kobalaminov.
- Znižanje metilmalonske kisline: Znižanje nivoja MMK v krvi je odvisno le od vnosa aktivnega vitamina B12. Zato je normalizacija MMK nivoja v primerih, ko je ta visok, najboljši test za določanje aktivnosti kobalaminov. S tem testom obenem tudi preverimo, če je v živilu več neaktivnih analogov kot aktivnih, saj se v tem primeru nivo MMK ne zniža (Pitkin in sod., 2000; Baker in sod., 1986; Dagnelie in sod., 1991).

Razlikovanje med ne- in biološko razpoložljivimi oblikami kobalaminov je ključnega pomena. Pri pripravi živil v postopkih analiz lahko tudi spremeni kemijo molekul, posledično lahko vplivajo na rezultat. Na primer, Yamada s sod. (1999) je dokazal, da je na zraku sušena *Pyropia tenera* (*asakusa-nori*) spremenila vitamin B12 v neaktivni analog. Sušenje z liofilizacijo bi lahko imelo boljše prehranske rezultate, čeprav to še ni bilo natančno dokazano. Drugi dejavniki, ki so še posebej pomembni za ohranjanje vsebnosti vitaminov, so metode pranja, temperature shranjevanja, svetloba in vsebnost vlage (Yamada in sod., 1999).

### 2.3 PREHRANSKI VIRI VITAMINA B12

Zagotovo velja, da najdemo najizdatnejše količine vitamina B12 v živilih živalskega izvora: jetrcih, školjkah, skušah, slanikih in jajcih (preglednica 1). Rastline ga ne potrebujejo, zato ga same po sebi ne sintetizirajo. Ravno zaradi tega v primerih strogega veganstva lahko prihaja do hujšega pomanjkanja vitamina B12, zato se priporoča dopolnjevanje prehrane z živil, ki so obogatena z vitaminom oziroma jemanje prehranskih dodatkov (Pitkin in sod., 2000).



Preglednica 1. Vsebnost vitamina B12 v nekaterih živil (Korošec in Vertnik, 2011)

Živilo	Vsebnost vitamina B12 ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ )	% PDV*
Telečja jetra	60	2400
Hobotnica	10	400
Raki	10	400
Jajca	2	80
Nekatere alge	2	80
Govedina	1,4	56
Svinjina	0,7	28
Piščančja prsa	0,4	16

\* PDV je priporočen dnevni vnos za odrasle, na osnovi referenčnih vrednosti za označevanje živil. Za vitamin B12 znaša 2,5  $\mu\text{g}$ .

V živilih živalskega izvora je vitamin B12 vezan na protein in tako rahlo zaščiten. V kravjem mleku najdemo večinoma adenosilcobalamin, v posušenem mleku največ hidroksilcobalamin, z malo cianokobalamina, jajca in sardine pa imajo v večjem delu metilkobalamina (Watanabe, 2007).

Raziskovalno vprašanje diplomske naloge je ugotavljanje prisotnosti vitamina B12 v rastlinskih živilih. Pri dokazovanju se srečujemo s številnimi izzivi, saj so metode kompleksne, izvedene študije pa marsikdaj vprašljive in nepopolne. V nadaljevanju sem zbral seznam rastlinskih živil ter pogoje in možnosti, pod katerimi bi lahko veljalo, da vsebujejo ta vitamin. Določena literatura namreč navaja, da je lahko vitamin B12 prisoten v rastlinah, ki so zrasle v primerno pognojenih tleh, brez uporabe pesticidov, ki ubijejo iz gnojenja prenesene črevesne mikroorganizme (Campbell in Campbell, 2005). Količina vitamina B12, ki jo najdemo v rastlinah je odvisna od vrste rastline, stanja in vrste prsti, ter količine mikroorganizmov (bakterij, plesni in kvasovk) v koreninskem sistemu rastlin. Raziskave so pokazale, da rastline, ki so zrasle v zdravi zemlji z visoko vsebnostjo mikrobov in vitamina B12, hitro absorbirajo to hranilo (Vaughan in Geissler, 2009).

### 2.3.1 Vitamin B12 v tleh

Čeprav je vitamina B12 lahko prisoten tudi v tleh, ni sistematičnih raziskav o možnosti absorpcije le tega v korenine rastlin. Leta 1992 je bila v Švici izvedena študija o vnosu cianokobalamina v sojo. Raziskovalci so predlagali, da lahko dodajanje gnoja v tla, ki je bogat s tem vitaminom, izboljša zemljo in s tem vsebnost vitamina B12 v rastlinah. Ugotovitev se jim je zdela pomembna predvsem za ljudi, ki živijo po izbiri ali potrebi na vegetarijanskih dietah in jim običajno grozi pomanjkanje vitamina B12 (Mozafar in Oertli, 1992).

Mozafar je nato leta 1994 preučil, kako vpliva dodajanje kravjega gnoja v zemljo na vsebnost vitamina B12 v rastlinah. Za merjenje količine vitamina B12 so uporabili analizo z uporabo intrinzičnega faktorja. Študija je preučila vsebnost vitamina B12 v organsko in sintetično gnojnih tleh. Analizirali so vzorce iz tal, ki je bila v zadnjih 16-ih letih obdelana z enim in drugim tipom gnojila. Rezultati vsebnosti vitamina B12 so prikazani v preglednici 2 (Mozafar, 1994).

Preglednica 2. Količina vitamina B12 v tleh v odvisnosti načina gnojenja tal (Mozafar, 1994)

Gnojenje	Vzorec tal 1 (vitamin B12 v µg/kg)	Vzorec tal 2 (vitamin B12 v µg/kg)
Sintetično	9	5
Organsko	14	10

Raziskava dokazuje, da lahko živi mikrobi, množično prisotni v organskih gnojilih, proizvajajo ta vitamin tudi v tleh.

Z naslednjim poizkusom je nato preučeval rastline soje, ječmena in špinače. Gojil jih je v lončkih z 2,5 kg zemlje, v katere so dodali 10 g suhega kravjega gnoja. Rastlinske dele so pred analizo temeljito oprali, da bi odstranili vsakršni delec zemlje pred merjenjem B12. Preglednica 3 prikazuje rezultate.

Preglednica 3. Količina absorbiranega vitamina B12 v rastlinah gojenih z organskimi gnojili in brez gnojenja (Mozafar, 1994).

Rastlina	Zemlja brez dodatkov - koncentracija vitamina B12 v µg/100g	Organsko gnojenje - koncentracija vitamina B12 v µg/100g
Soja	1,6	2,9
Ječmen	2,6	9,1
Špinača	6,9	17,8

Dodatek kravjega gnoja ni veliko spremenil vsebnosti B12 v sojinih semenih, jo pa je znatno povečal v ječmenovih jedrcih in v listih špinače. Test je pokazal, da vsebujejo rastline, ki rastejo z organskimi gnojili, pogosto višje koncentracije vitaminov B1 (tiamin) in B12 (cianokobalamin) v primerjavi z rastlinami, gojenimi z anorganskimi gnojili. Ker lahko korenine rastlin absorbirajo B1 in B12, sklepamo, da mikroorganizmi v organskih gnojilih (kot so gnoj iz različnih virov ali blata iz čistilnih naprav, ki pogosto vsebujejo relativno visoke koncentracije mikrobov) sintetizirajo dodatne vitamine v tleh, kar nato vodi do povečanih vitaminov v rastlinah. Omenjena raziskava dokazuje, da imajo rastline sposobnost absorpcije vitamina B12 (Mozafar, 1994).

### 2.3.2 Solata gojena v hidroponiki

Ko so Bito in sod. leta 2013 30 dni gojili solato (*Lactuca sativa* L.) v vodni kulturi (hidroponiki) s 24-urno obdelavo z različnimi koncentracijami cianokobalamina, se je vsebnost vitamina B12 v listih bistveno povečala, in sicer od ničelne do  $164,6 \pm 74,7$  ng/g

sveže teže. Ta ugotovitev je pokazala, da je zaužitje le dveh ali treh tako predelanih svežih listov dovolj za izpolnitev priporočene prehranske vrednosti za odrasle (2,4 µg/dan). To so dokazali z mikrobiološko metodo z *Escherichia coli* 215, katere rast je odvisna od prisotnosti vitamina B12. V vzorcu s solato je mikroorganizem normalno zrastel in razvil kolonije. Nadalje so solato analizirali z gelsko filtracijo in ugotovili, da je večina (86 %) cianokobalamina v listih ostala nevezana. To pomeni, da bi bili listi solate, obogateni s cianokobalaminom, odličen vir vitamina B12, zlasti za stroge vegetarijance ali starejše ljudi z motnjami pri absorpciji vitamina B12 (Bito in sod., 2013).

### 2.3.3 Gobe

Študija Watanabija in sod. iz leta 2012 je raziskovala vsebnost vitamina B12 v nekaterih gobah. Signifikantne vrednosti vitamina B12 so našli v nekaterih gobah, ki so prikazane v preglednici 4.

Preglednica 4. Količina vitamina B12 v gobah (Watanabe in sod., 2012).

Vrsta gobe	Vsebnost vitamina B12 v µg/100g suhe mase
Črna trobenta ( <i>Craterellus cornucopioides</i> )	2,9–3,9
Navadna lisička ( <i>Cantharellus cibarius</i> )	1,3–2,1
Orjaški dežnik ( <i>Macrolepiota procera</i> )	1,3
Goban ( <i>Boletus</i> spp.)	3–4
Bukov ostrigar ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	2
Koničasti smrček ( <i>Morchella conica</i> )	1

Sto gramov suhe mase je enakovredno približno enemu kilogramu svežih gob. Zaradi tega so avtorji mnenja, da bi lahko zmerni vnos črne trobente ali zlate lisičke nekoliko prispeval k preprečevanju hudega pomanjkanja B12 pri vegetarijancih. O izvoru B12 so avtorji zapisali: »Visoka koncentracija vitamina B12 v lupini kaže, da ni bil sintetiziran v gobah, ampak je bil bodisi absorbiran neposredno iz komposta ali pa so ga na površini gob sintetizirale bakterije. Slednje je bolj verjetno, ker gobe nimajo koreninskega sistema, ki bi v kompostu prevzel vitamin, kot se je to zgodilo v primeru vnosa koreninskih rastlin iz tal« (Watanabe in sod., 2012).

### 2.3.4 Fermentirana živila

- Japonski fermentirani črni čaj (Batabata-cha): leta 2004 so Kittaka-Katsura in sod. s preizkusom na miših odkrili, da črni fermentirani čaj vsebuje vitamin B12. Pitje črnega čaja je pripomoglo k izboljšanju nivoja MMK. Zavedati pa se moramo, da je metabolizem miši podoben, vendar ne enak ljudem, zato so te študije le podlaga za nadaljnje raziskave (Kittaka-Katsura in sod., 2004).

- *Lactobacillus*: je vrsta bakterij, ki je prisotna v človeškem črevesnem traktu in v večini probiotičnih dodatkov. Nekateri sevi, kot *Lactobacillus reuteri* CRL1098, proizvajajo vitamin B12 in sicer cianokobalamin. V študiji iz leta 2000 so 4 presnojedi vegani uživali probiotične dodatke, ki so vsebovali *Lactobacillus acidophilus* in druge vrste *Lactobacillus*. Po 3 mesecih so se ravni MMA-ja treh veganov v urinu zmanjšale, vendar ne dovolj, da bi to smatrali za normalno raven. Čeprav je uživanje probiotičnih dodatkov z *Lactobacillus* obetavno, je še prezgodaj zaključiti, da bi s pomočjo omenjenih bakterij lahko telesu priskrbeli potrebne količine vitamina B12 (Donaldson, 2000).

### 2.3.5 Alge

Morske alge so običajno zelo bogate z jodom, zato lahko pri previsokih vnosih povzročajo težave, vendar pa so kljub temu ena izmed redkih veganskih virov kobalamina. Kobalamin sintetizirajo zgolj prokarioti, toda dokazano je, da živijo bakterije v simbiozi z algami na njihovi površini. (Croft in sod., 2005; Wagner-Döbler in sod., 2010). Obstaja negotovost glede dejstva ali koncentracija kobalaminov v živilih alg odraža tudi njihovo biološko aktivnost. Dagnelie in sod. (1991) so raziskovali, kako morske rastline vplivajo na zdravje otrok s pomanjkanjem B12, in ugotovili, da niso vse spojine kobalaminov prisotne v algah biološko aktivne pri ljudeh, je pa res, da je bila študija narejena na zelo majhni skupini ( $n = 5$ ) (Dagnelie in sod., 1991). Znatne količine vitamina B12 so odkrili v nekaterih užitnih algah nori (zelenih in vijoličnih umivalnikih), *Chlorelli* in *Spirulini* z mikrobiološko metodo, ki temelji na rasti *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 (Croft in sod., 2005).

#### 2.3.5.1 Cianobakterije

Cianobakterije ali modrozeleni cepčivke smatramo za prednike rastlin, alg in kloroplastov, saj imajo lastnosti bakterij, ampak proizvajajo energijo tudi preko fotosinteze. V italijanski študiji iz leta 2009 so na petnajstih veganih preiskovali vpliv dopolnil *Aphanizomenon flos-aquae*, ki vsebuje sev cianobakterij. Na samem začetku analize so imeli testiranci povprečni nivo homocisteina v krvi  $13,7 \mu\text{mol/l}$ . Pri ukinitvi vseh dodatkov, ki so predhodno ti jemali, se je nivo homocisteina v 3 mesecih zvišal do  $15,2 \mu\text{mol/l}$ . V nadaljevanju so prehrani dodali dodatek 6-ih kapsul *Aphanizomenon flos-aquae*. Na koncu testa se je nivo homocisteina znižal na  $12,0 \mu\text{mol/l}$ . Avtorji študije so prepričani, da je to dovolj dober dokaz, da imajo *Aphanizomenon flos-aquae* vitamin B12, vendar meritve nivoja homocisteina niso najboljši pokazatelj aktivnosti kobalaminov, ker je zanj odvisen tudi vnos vitamina B9. Najboljši test je preizkušanje nivoja MMK-ja. Dodatna težava je v tem, da je bil nivo homocisteina zelo visok na začetku študije, na koncu pa še vedno previsok, da bi ga smatrali za normalnega, ki je bližje  $6\text{--}8 \mu\text{mol/l}$  (Baroni in sod., 2009).

### 2.3.5.2 *Chlorella*

Pratt in Johnson (1968, ZDA) sta bila prva, ki sta preučila *Chlorella*, to je rod enoceličnih zelenih alg kroglaste oblike. Preiskala sta številne seve *Chlorella* in občasno našla prisoten vitamina B12. Vendar jima točnih količin ni uspelo določiti. Ugotovila sta, da nimata ustreznih postopkov ekstrakcije, čeprav sta uporabila veliko različnih metod (Pratt in Johnson, 1968).

V novejši študiji iz leta 2015 so Merchant in sod. opazovali nivoje MMK-ja pri 17 veganih s pomanjkanjem B12 in vegetarijancev z dodatkom *Chlorella pyrenoidosa* v obdobju 60 dni. Povprečne koncentracije MMK-ja v serumu so se po 30 dnevih znižale iz 441 nmol/l na 301 nmol/l in po 60 dnevih na 297 nmol/l. Povprečne koncentracije homocisteina v serumu so se znižale po 30 dnevih iz 10  $\mu\text{mol/l}$  na 9,5  $\mu\text{mol/l}$  in po 60 dni na 9  $\mu\text{mol/l}$ . Ko so uporabljali *Chlorella* niso opazili neželenih učinkov. O pomanjkanju B12 govorimo, ko je serumski raven MMK-ja nad 270 nmol/l, tako da kljub izboljšanju nivoja MMK-ja niso dosegli popolne normalizacije. Zato smatramo, da imajo nekateri sevi *Chlorella* najverjetneje aktivni vitamin B12, vendar je še prezgodaj trditi, da lahko vegani pri prehrani uporabljajo kot vir vitamina B12 *Chlorella* (Merchant in sod., 2015).

### 2.3.5.3 *Spirulina*

Indijska raziskovalna skupina je leta 2010 objavila članek, v katerem je proučila vsebnost vitamina B12 v *Spirulini* (*Spirulina platensis*), to je rod enoceličnih modrozelenih cepljivk. Menili so, da so odkrili 35–38  $\mu\text{g}$  metilkobalamina na 100 g suhe mase, vendar so nadaljnje merilne metode pokazale, da ima *Spirulina* široko paleto različnih analogov, od katerih so mnogi neaktivni, čeprav so jih s prva razglašali za aktivne (Kumudha in sod., 2010).

V nizozemski študiji (1991) so ocenili učinek alg (nori in *Spiruline*) in fermentirane rastlinske hrane na hematološki status otrok s pomanjkanjem vitamina B12. Čeprav so naraščajoče koncentracije vitamina B12 v plazmi pri otrocih, ki so zaužili samo rastlinsko hrano (0,1–2,7 mikrograma vitamina B12/dan) pokazale, da se je vitamin B12 absorbiral, so bile vrednosti MCV še vedno povišane. Nasprotno so se vrednosti MCV zmanjšale pri otrocih, ki so uživali ribe z 0,15–0,5 mikrograma vitamina B12/dan ali dodatek z vitaminom B12. Potrebne so nadaljnje študije s specifičnimi testi ugotavljanja aktivnosti vitamina B12. Dagnelie opozarja, da je neopravičeno zagovarjati alge in druge rastlinske hrane kot varen vir vitamina B12, dokler je njegova biološka razpoložljivost vprašljiva (Dagnelie in sod., 1991).

### 2.3.5.4 Nori

Nori je ime za alge, ki spadajo v rod *Porphyra*, znane tudi kot "vijolični umivalnik" in jih običajno v mnogih državah uporabljajo za zavijanje sušija. Leta 1999 je skupina

Watanabija ugotovila, da nori alge vsebujejo do 0,06 mg vitamina B12 na 100 g suhe mase alg, kar je primerljivo s količino v govejih jetrih. Navedene koncentracije so med študijami zelo različne, kar lahko odraža razlike med sevi, rastnimi pogoji ali obdobji nabiranja (Watanabe in sod., 1999). 7 let kasneje je ista skupina odkrila, da omenjena vrsta alg vsebuje precej več neaktivni analogov vitamina B12 in da zato ni primerna kot edini vnos vitamina B12 pri veganih (Watanabe in sod., 2006). Za dokončno pojasnilo je skupina pod vodstvom Yamade preizkusila, ali bi lahko nori alge (*P. tenera*) zmanjšale nivo MMK. Surove nori so kupili 48 ur po obiranju, posušene pa v trgovini. Študijo so izvedeli na vsejedi ljudeh. Rezultati analiz so prikazani v preglednici 5 (Yamada in sod., 1999).

Preglednica 5. Nivo metilmalonske kisline (MMK) v krvi po prehrani z nori algami (Yamada in sod., 1999).

Nori	N	Količina	Uživanje	MMK nivo
Posušeni	6	40 g/dan	6–9 dni	Povečal za 77 %
Surovi	4	320 g/dan	3–6 dni	Povečal za 5 %

Rezultati kažejo, da se lahko vitamin B12 v surovih norih s sušenjem spremenijo v neaktivne analoge. Posušeni nori ne vplivajo pozitivno na nivo MMK-ja, vendar so Yamada in sod. (1999) pripomnili, da v majhnih količinah posušene alge niso škodljive. Med uživanjem surovih nori se je raven MMK-ja pri osebah povečala za 5 %. Ta rezultat kaže, da bi lahko surove alge pozitivno pripomogle k izboljšanju vsebnosti vitamina B12 (Yamada in sod., 1999). Tudi s pomočjo preiskave na podganah so ugotovili, da nori vsebujejo znatne količine biološko razpoložljivega B12, saj se je v podganah, ki so se hranile z vijoličnim umivalnikom, za približno 2x povečal nivo homocisteina v primerjavi s tistimi brez dodatkov nori (Watanabe in sod., 2002).

### 2.3.5.5 *Coccolithophorid algae*

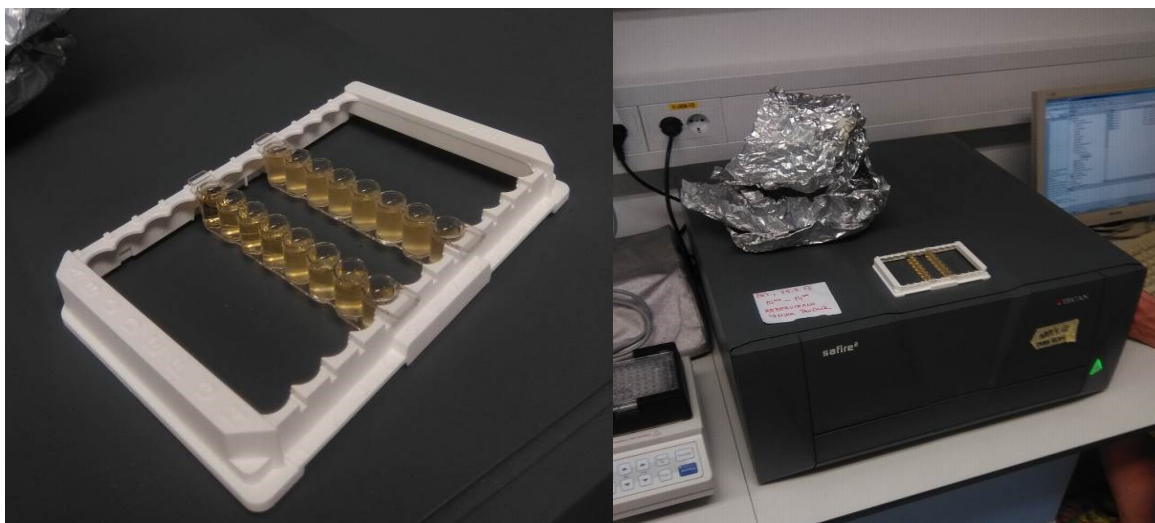
*Coccolithophorid algae* (*Pleurochrysis carterae*) so enocelični eukariotski fitoplankton, ki pripada kraljestvu *Protista*. Na Japonskem se uporablja *Coccolithophorid algo* kot dodatek kalcija. Miyamoto in sod. (2001) so analizirali količino vitamina B12. Z uporabo tekočinske kromatografije so raziskovalci ugotovili, da je prisoten vitamin B12. Testirali so ga na podganah s pomanjkanjem B12 in ugotovili, da se jim je normalizirala raven MMK. Vitamin B12 je ostal stabilen 6 mesecev skladiščenja. Ta alga si zasluži nadaljnjo pozornost, da bi ugotovili, ali lahko pri ljudeh dosledno znižuje nivoje MMK-ja (Miyamoto in sod., 2001).

### 3 MATERIAL IN METODE

V laboratoriju katedre za biokemijo in kemijo živil smo z namenom določanja vsebnosti vitamina B12 v živilih preizkusili kvantitativno mikrobiološko metodo z *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*). Pridobljeni kit iz Nemčije se imenuje VitaFast® vitamin B12 (cianokobalamin) (AOAC-RI). Test je namenjen kvantifikaciji celokupnega vitamina B12 v hrani, krmi in farmacevtskih izdelkih z uporabo mikrobioloških mikrotiterskih plošč (R-Biopharm, 2017).

Najprej vitamin B12 ekstrahiramo iz vzorca in dobljeni ekstrakt razredčimo. Rastopino nato odpipetiramo v vdolbine mikrotitrne plošče, ki je prevlečena z zgoraj omenjenim mikroorganizmom. Proizvajalci testa zagovarjajo, da je njegova rast odvisna le od prisotnosti cianokobalamina. Bakterije rastejo dokler se vitamin prisoten v standardu ali v živilskem vzorcu ne porabi (R-Biopharm, 2017).

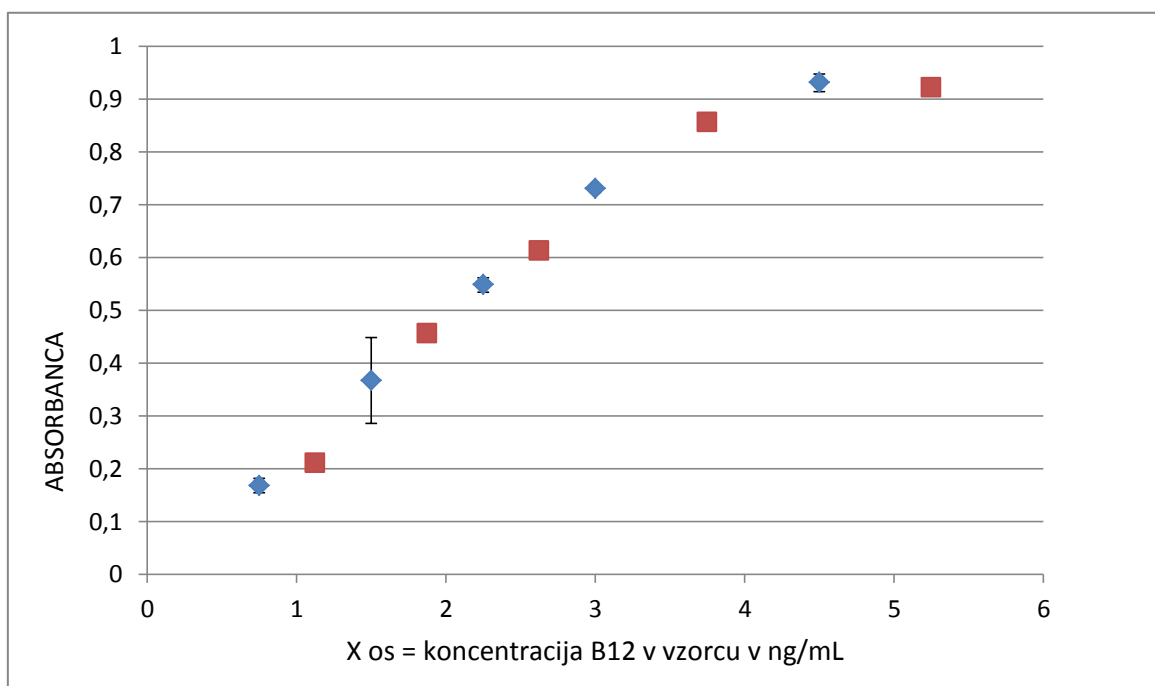
Preizkus metode z *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*) (ATCC7830) smo naredili s pomočjo standarda priloženega v testu, ki vsebuje točno določeno koncentracijo čistega liofiliziranega cianokobalamina. Standard smo odpipetirali skupaj z gojiščem na mikrotitersko ploščo (slika 2, levo), ki je vsebovala preizkusni mikroorganizem. Sledila je inkubacija, ki smo izvedli v temi pri 37 °C (98,6 °F), 44 do 48 ur. Intenzivnost presnove ali rasti se pokaže kot povečana motnost v vzorcu. Preko spektrofotometra za mikrotiterske plošče (slika 2, desno) smo nato ocenili rast mikroorganizmov in primerjali našo krivuljo s priloženo s strani proizvajalcev. Meritev smo izvedli pri 630 nm (R-Biopharm, 2017).



Slika 2. Mikrotiterska plošča po inkubaciji; motnost narašča iz leve proti desni in od spodaj navzgor (levo) in spektrofotometer za mikrotiterske plošče (desno)

#### 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

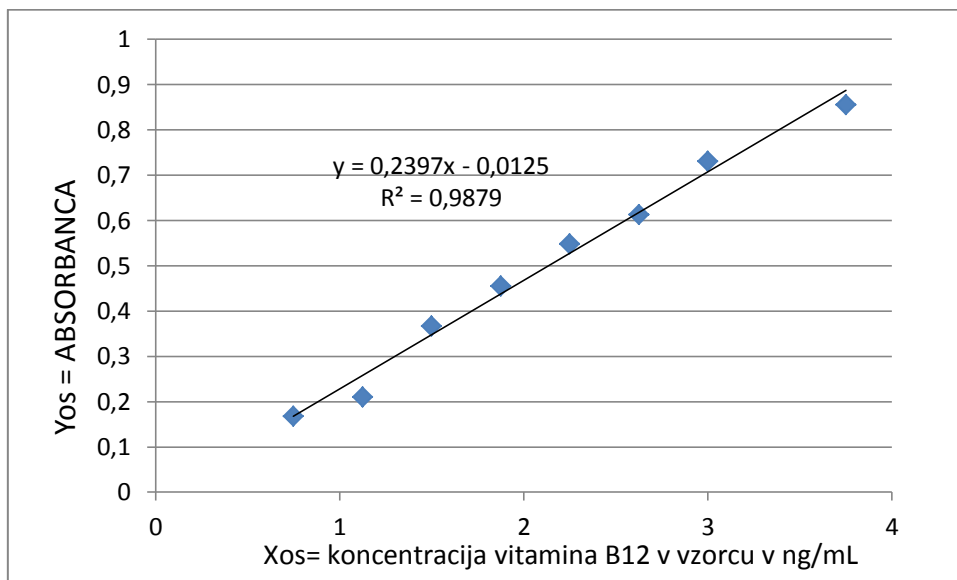
Pridobljena krivulja iz testa je primerljiva in v skladu s priloženo v kitu in bo podlaga za določevanje vsebnosti vitamina B12 v drugih živilih. Standardna deviacija je prikazana kot črna premica, ki gre navpično preko točk. Iz tega je razvidno, da večinoma rezultati ne odstopajo od povprečja, z izjemo druge meritve (slika 3).



Slika 3. Primerjalni graf med našo in standardizirano umeritveno krivuljo iz kita  
rdeče točke – priloženi rezultati iz kita  
modre točke – naši rezultati, z začrtano standardno deviacijo

Krivulja je v linearnem območju za vrednosti med 1 ng/ml do 3,75 ng/ml, in metoda je zato primerna za raziskovanje le v tem koncentracijskem območju (prikazano na sliki 4). V laboratoriju smo želeli preizkusiti tudi višje vrednosti, da bi lahko z gotovostjo vedeli, do katere vrednosti seže linearno območje (slika 4) in ugotovili, da je že za vrednosti nad 3,75 ng/ml izven linearnega območja.





Slika 4. Grafikon z združenimi podatki iz literature in v našem laboratoriju izmerjenimi podatki s prikazom linearne odvisnosti med koncentracijo in odzivom spektrofotometra.

Metoda ima verjetno tudi nekatere pomanjkljivosti. Kljub temu, da se v opisu testa poudarja, da mikrobi rastejo samo ob prisotnosti cianokobalamina, nekateri raziskovalci menijo, da so biološki testi z uporabo bakterij, ki so odvisne od vitamina B12, kot je na primer *Lactobacillus delbruekii* ssp. *lactis* (ATCC7830), neustrezni, ker lahko za razliko od ljudi te bakterije preživijo s presnovo tako vitamina B12 kot z neaktivnimi analogi. Potrebne bi bile nadaljnje preiskave. Druga pomanjkljivost je, da se zahteva za ekstrakcijo iz vzorcev reakcija s kalijevim ali natrijevim cianidom, ki po vsej verjetnosti pretvori ostale neaktivne analoge v aktivni cianokobalamin (Watanabe in sod., 2006; Martens in sod., 2001).

## 5 SKLEPI

V diplomski nalogi smo prišli do ugotovitve, da obstaja velika možnost, da lahko vitamin B12 dobimo v nekaterih rastlinskih živilih. V algah je najverjetneje prisoten, ker te živijo v simbiotskem razmerju z bakterijami, ki proizvajajo vitamin B12. Obstaja tudi možnost, da bi ga lahko našli še v drugih rastlinah, saj ga imajo slednje možnost absorbirati preko koreninskega sistema iz tal, ko je prst živa, rodovitna in vsebuje mnogo bakterij, ki ga proizvajajo. Da bi se to lahko zgodilo, bi bila potrebna uporaba pravih agro-ekoloških tehnik, ki bi ohranjale številnejše mikroorganizme v tleh.

## 6 POVZETEK

Vitamin B12 je človeku nepogrešljiva molekula, katere dovoljšno količino je nujno zagotoviti z ustrežno prehrano. Ker za rastline velja, da ga same po sebi ne morejo sintetizirati, so še posebej za vegansko prehrano posebnega pomena teorije in raziskave, ki odpirajo možnost dodajanja omenjenega vitamina rastlinam preko določenih tehnik in pogojev rasti. Pri tem se uporabljajo različni testi in metode, kot na primer mikrobiološke metode ali testi s transportnimi proteini, ki pa velikokrat ne razločujejo med vitaminom B12 in njegovimi analogi. Za še najprimernejše se je izkazalo neposredno testiranje na ljudeh s pomanjkanjem vitamina B12. Najvažnejša odkritja se dotikajo možnosti absorpcije rastlin obravnavanega vitamina preko koreninskega sistema, če je le ta prisoten v prsti in njegove prisotnosti v algah, ki živijo v simbiotskem razmerju z mikroorganizmi, ki ga proizvajajo. Ker točne količine vsebnosti vitamina B12 v rastlinskih živilih niso bile ugotovljene, zaenkrat ne moremo govoriti o tem, ali bi lahko te zadostovale za priporočen dnevni vnos. Zato smo z namenom določanja količine vitamina B12 v živilih preizkusili mikrobiološko analizo metodo z mikroorganizmom *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*leichmannii*). Pri analizi metodi je potrebno še dodatno preveriti nekatere pomanjkljivosti, vendar bo gotovo zelo uporabna za nadaljnje preiskave.

## 7 VIRI

- Baker H., Frank O., Khalil F., DeAngelis B., Hutner S.H. 1986. Determination of metabolically active B12 and inactive B12 analog titers in human blood using several microbial reagents and a radiodilution assay. *Journal of the American College of Nutrition*, 5, 5: 467-475
- Baroni L., Scoglio S., Benedetti S., Bonetto C., Pagliarani S., Benedetti Y., Rocchi M., Canestrari F. 2009. Effect of a Klamath algae product ("AFA-B12") on blood levels of vitamin B12 and homocysteine in vegan subjects: a pilot study. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 79, 2: 117-123
- 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
- Campbell T. C., Campbell II T. M. 2006. *The China study*. Dallas, BenBella Books: 417 str.
- Croft M. T., Lawrence A. D., Raux-Deery E. C., Warren M. J., Smith A. G. 2005. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*, 438, 7064: 90-93
- Dagnelie P. C., van Staveren W. A., van den Berg H. 1991. Vitamin B-12 from algae appears not to be bioavailable. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 3: 695-697
- Donaldson M. S. 2000. Metabolic vitamin B12 status on a mostly raw vegan diet with follow-up using tablets, nutritional yeast, or probiotic supplements. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44, 5: 229-234
- EFSA. 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to vitamin B12 and contribution to normal neurological and psychological functions (ID 95, 97, 98, 100, 102, 109), contribution to normal homocysteine metabolism (ID 96, 103, 106), maintenance of normal bone (ID 104), maintenance of normal teeth (ID 104), maintenance of normal hair (ID 104), maintenance of normal skin (ID 104), maintenance of normal nails (ID 104), reduction of tiredness and fatigue (ID 108), and cell division (ID 212) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006/EFSA. *EFSA Journal*, 8, 10: 1756, doi:10.2903/j.efsa.2010.1756: 23 str.
- EFSA. 2015. Scientific Opinion on dietary reference values for cobalamin (vitamin B12). *EFSA Journal*, 13, 7: 4150, doi:10.2903/j.efsa.2015.4150: 64 str.

- Fang H., Kang J., Zhang D. 2017. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*, 16, 1: 15, doi:10.1186/s12934-017-0631-y: 14 str.
- Herbert V. 1988. Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48, 3: 852-858
- 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
- Korošec Ž., Vertnik L. 2011. Vitamin B12. Ljubljana, Inštitut za nutricionistiko: 1 str.  
<https://www.nutris.org/prehrana/abc-prehrane/vitamini/123-vitamin-b12.html> (avgust 2019)
- Kumudha A., Kumar S.S., Thakur M.S., Ravishankar G.A., Sarada R. 2010. Purification, identification and characterization of methylcobalamin from *Spirulina platensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 18: 9925-9930
- Martens J. H., Barg H., Warren M. J., Jahn D. 2001. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 275–285
- Medić-Šarić M., Buhač I., Bradamante V. 2002. Vitamini in minerali, resnice in predsodki. Ptuj, In *Obs Medicus*: 342 str.
- Merchant R. E., Phillips T. W., Udani J. 2015. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* lowers serum methylmalonic acid in vegans and vegetarians with a suspected vitamin B12 deficiency. *Journal of Medicinal Food*, 8, 12:1357-1362
- Miyamoto E., Watanabe F., Ebara S., Takenaka S., Takenaka H., Yamaguchi Y., Tanaka N., Inui H., Nakano Y. 2001. Characterization of a vitamin B12 compound from unicellular *Coccolithophorid alga (Pleurochrysis carterae)*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 7: 3486-3489
- Mozafar A., Oertli J. J. 1992. Uptake of a microbially-produced vitamin (B12) by soybean roots. *Plant and Soil*, 139, 1: 23–30
- Mozafar A. 1994. Enrichment of some B-vitamins in plants with application of organic fertilizers. *Plant and Soil*, 167, 2: 305–311
- Muhleib F. 1999. Vitamini za zdravje in dobro počutje. Ljubljana, DZS: 111 str.
- Marks J. 1993. Biological functions of vitamins. V: *The technology of vitamins in food*. 1<sup>st</sup> ed. Ottaway P. B. (ur.). Glasgow, Chapman & Hall: 1-18

- Pitkin R. M., Allen I. H., Bailey L.B., Bernfield M., De Wals P., Greeni R., McCormick D. B., Russell R. M., Shane B., Zeisel S. H. 2000. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Pitkin R. M. (ur.). Washington, DC, National Academy Press. 312-348
- Pratt R., Johnson E. 1968. Deficiency of vitamin B12 in *Chlorella*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 57, 6: 1040-1041
- R-Biopharm. 2017. VitaFast® Vitamin B12 (Cyanocobalamin). Darmstadt, R-Biopharm AG: 27 str.  
<https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2017/02/P1002-TKB-Vitamin-B12-AOAC-2017-02-06.pdf> (julij 2019)
- Tsiminis G., Schartner E. P., Brooks J. L., Hutchinson M. R. 2016. Measuring and tracking vitamin B12: A review of current methods with a focus on optical spectroscopy. Applied Spectroscopy Reviews, 52, 5: 439-455
- Vaughan J.G., Geissler C. 2009. The New Oxford book of food plants. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, University press: 249 str.
- Watanabe F., Katsura H., Takenaka S., Fujita T., Abe K., Tamura Y., Nakatsuka T., Nakano Y. 1999. Pseudovitamin B(12) is the predominant cobamide of an algal health food, *Spirulina* tablets. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 11: 4736-4741
- Watanabe F., Takenaka S., Kittaka-Katsura H., Ebara S., Miyamoto E. 2002. Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 8, 5: 325-331
- Watanabe F., Miyamoto E., Fujita T. 2006. Characterization of a carrinoid 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: 1266–1274
- Wells M. L., Potin P., Craigie J. S., Raven J. A., Merchant S. S., Helliwell K. E., Smith A. G., Camire M. E., Brawley S. H. 2016. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. Journal of Applied Phycology, 29, 2: 949–982
- Yamada K., Yamada Y., Fukuda M., Yamada S. 1999. Bioavailability of dried asakusanori (*Porphyra tenera*) as a source of cobalamin (vitamin B12). International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 69, 6: 412-418