

ANALIZNA METODA ZA DOLOČANJE VITAMINA B₁₂ V VZORCIH FERMENTIRANE KISLE SIROTKE

ANALYTICAL METHOD FOR VITAMIN B₁₂ DETERMINATION IN FERMENTED ACID WHEY

Timeja Planinšek Parfant¹, Nika Osel¹, Albin Kristl¹, Diana Paveljšek², Bojana Bogovič Matijašič², Robert Roškar¹

¹Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija, robert.roskar@ffa.uni-lj.si

²Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Slovenija

LIFE FOR ACID WHEY



UVOD

Vitamin B₁₂ predstavlja skupino spojin kobalaminov, med katerimi so adenoilkobalamin (ACbl), metilkobalamin (MeCbl) in hidrokskobalamin (OHCbl) naravnega izvora. Cianokobalamin (CNCbl) je sinteznega izvora in je tudi najstabilnejša oblika, ki se najpogosteje uporablja v prehranskih dopolnilih in zdravilih. Pridobiva se s procesom biosintezne fermentacije z bakterijami *P. denitrificans* in *P. shermanii*. Po fermentaciji sledi ekstrakcija vitamina B₁₂, kjer se bakterijske celice običajno segreva 10–30 minut pri 80–120 °C in pri pH vrednosti 6,5–8,5. Nato se z obdelavo vzorca s cianidom oziroma tiocianatom izvede pretvorba v CNCbl (Martens in sod., 2002).

INTRODUCTION

Vitamin B₁₂ is a group of cobalamin compounds, among which adenosylcobalamin (ACbl), methylcobalamin (MeCbl), and hydroxocobalamin (OHCbl) are of natural origin. Cyanocobalamin (CNCbl), a synthetic form of vitamin B₁₂, is the most stable form and most commonly used in nutritional supplements and medicines. It is produced by a biosynthetic fermentation process using *P. denitrificans* and *P. shermanii* bacterial species. Fermentation is followed by the extraction of vitamin B₁₂, where the whole broth is usually heated at 80–120 °C for 10–30 min at pH 6.5–8.5. The conversion to CNCbl is obtained by treating the sample with cyanide or thiocyanate (Martens et al., 2002).

NAMEN

Namen raziskovalnega dela je bil razvoj analizne metode za določanje vsebnosti vitamina B₁₂ v vzorcih, pridobljenih s fermentacijo kisle sirotke s sevom *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* van Niel 1928.

MATERIALI IN METODE

Razvoj analizne metode za določanje vitamina B₁₂ v vzorcih iz gojišč je potekal s standardi CNCbl, ACbl, OHCbl (vsi Sigma-Aldrich) in MeCbl (Carbosynth). Vzorce, ki so bili pridobljeni s fermentacijo obogatene kisle sirotke s sevom *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii* van Niel 1928, smo pridobili od projektnih partnerjev (UL BF). Vzorce smo analizirali s predhodno razvito in validirano instrumentalno LC-MS/MS metodo. Ločba analitov je potekala na koloni Kinetex C18 50 × 2,1 mm, 2,6 μm delci (Phenomenex, USA) pri 40 °C z gradientnim programom in mobilno fazo, ki jo sestavlja 0,05 % mravljinčna kislina v MilliQ vodi ter metanol s pretokom 0,5 mL/min. Uporabili smo UHPLC Infinity 1290 sistem, sklopljen s 6460 QQQ masnim spektrometrom in ESI ionskim izvorom (Agilent Technologies, USA) za kvantifikacijo pa smo uporabili multirezidualno analizo. Pri razvoju postopka priprave vzorcev smo za ekstrakcijo vitamina B₁₂ uporabili več načinov razbitja bakterijskih celic (avtoklaviranje, uporaba encimov, ultrazvočna kopel) ter različne pogoje avtoklaviranja in dodatek KCN za pretvorbo kobalaminov naravnega izvora v stabilnejšo obliko – CNCbl. Po optimizaciji smo analizo metodo tudi ovrednotili ter jo uporabili pri vrednotenju vsebnosti vitamina B₁₂ v realnih vzorcih.

REZULTATI IN DISKUSIJA

Vitamin B₁₂ se ne izloča iz bakterijskih celic, zato je treba najprej porušiti strukturno integriteto celične stene. Za sprostitve vitamina B₁₂ iz bakterijskih celic smo uporabili več metod, in sicer dodatek encimov, ki razgradijo bakterijsko celično steno (lizocim in mutanolizin), ekstrakcijo v ultrazvočni kopeli in postopek avtoklaviranja, kjer celice uničimo s povišano temperaturo. Ugotovili smo, da se z avtoklaviranjem sprosti največ vitamina B₁₂ iz celic (Slika 1a in 2).

Avtoklaviranje je dolgotrajen postopek, zato je bilo treba pogoje čim bolj optimizirati. Preverili smo različne temperature in čas avtoklaviranja. Ugotovili smo, da je avtoklaviranje pri 105 °C manj učinkovito, saj je bila količina nastalega CNCbl najnižja. Najvišjo pretvorbo smo dosegli z avtoklaviranjem pri 121 °C (Slika 1b). Za končni postopek priprave vzorcev smo izbrali najkrajši čas (10 minut) avtoklaviranja z zadovoljivo pretvorbo.

Pri fermentaciji z bakterijami nastaja vitamin B₁₂ v obliki ACbl ali MeCbl. Ti obliki sta pod vplivom svetlobe nestabilni in se pretvarjata v obliko OHCbl. Da bi dobili stabilnejšo obliko vitamina B₁₂, smo uporabili dodatek KCN, ki omogoča pretvorbo teh oblik v CNCbl.

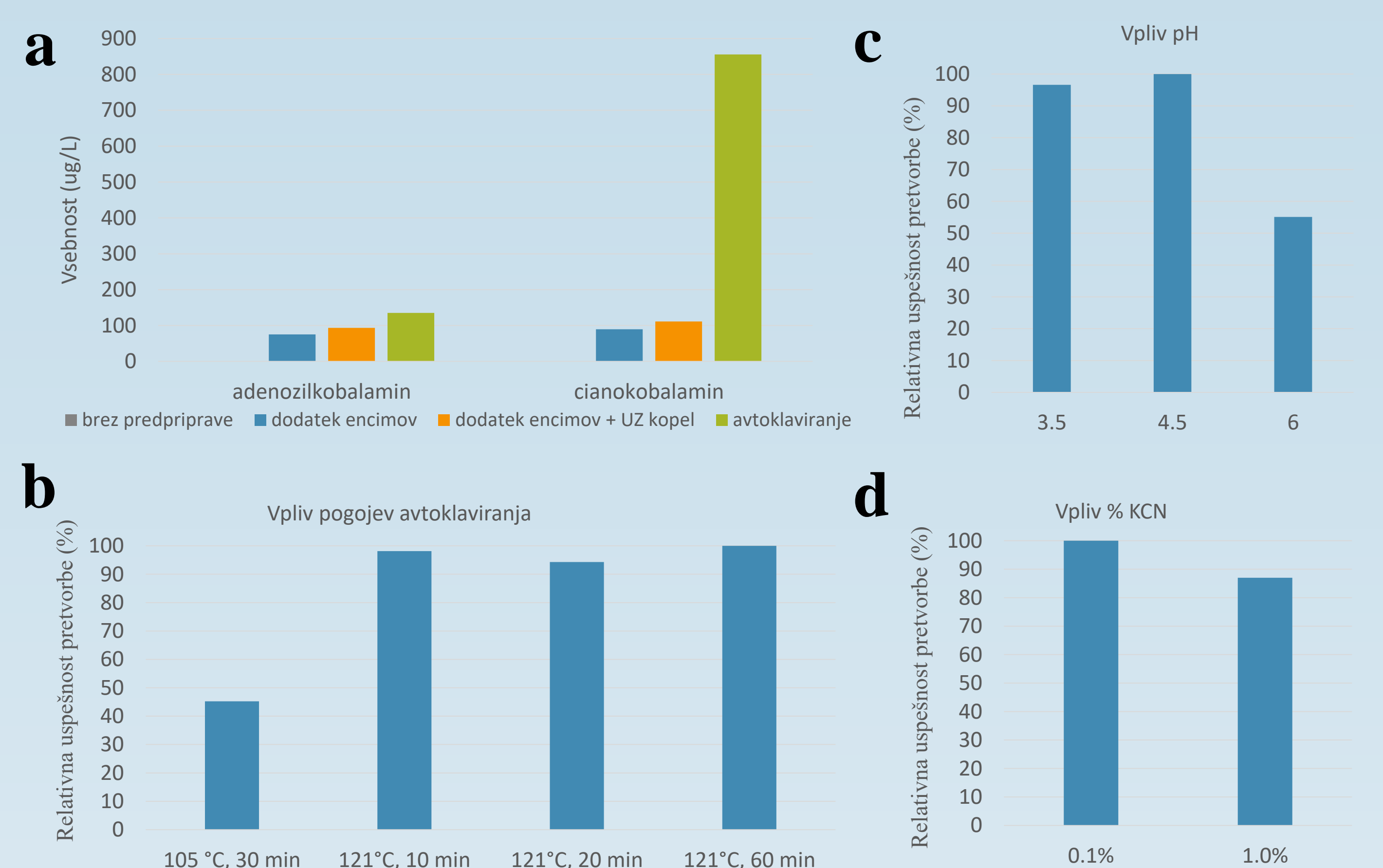
Viri

Martens J. H. in sod., Microbial production of vitamin B₁₂, Appl Microbiol Biotechnol. 58: 275–285 (2002).

References

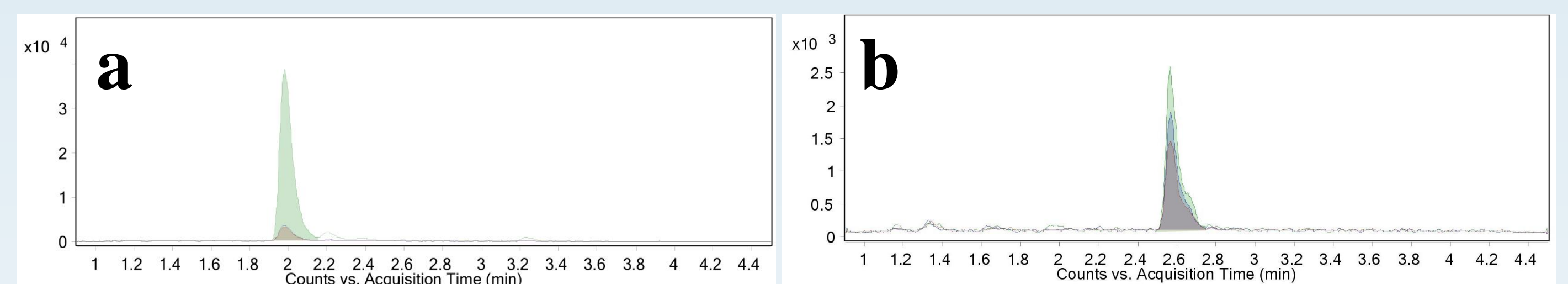
Martens J. H. et al., Microbial production of vitamin B₁₂, Appl Microbiol Biotechnol. 58: 275–285 (2002).

Pripravili smo 0,2 M acetatni pufer z različnimi pH vrednostmi (3,5–6,0) in različnim deležem KCN (0,1 in 1,0 %). Pripravljen pufer smo dodali k vzorcu v razmerju 1:1 ter avtoklavirali pri izbranih pogojih. Ugotovili smo, da je bila pretvorba najbolj uspešna pri uporabi 0,1 % KCN v 0,2 M acetatnem pufru s pH vrednostjo 4,5 (Sliki 1c in 1d). V okviru validacije analizne metode smo preverjali linearnost, ponovljivost, točnost, selektivnost, stabilnost in učinek matrice, s čimer smo glede na predhodno postavljene kriterije potrdili ustreznost metode. Analizno metodo smo v nadaljevanju aplicirali na realne vzorce. Ker ACbl s postopkom avtoklaviranja in dodatka KCN nismo popolnoma pretvorili v CNCbl, iščemo alternativne poti za optimizacijo, npr. dodatna izpostavitve vzorca sončni svetlobi.



Slika 1: Vpliv dejavnikov na nastanek CNCbl; a – vpliv metod za razbitje bakterijskih celic na sprostitve vitamina B₁₂, b – vpliv pogojev avtoklaviranja, c – vpliv pH raztopine s KCN, d – vpliv % KCN. Relativno uspešnost pretvorbe (%) smo podali glede na najboljši rezultat.

Figure 1: Influence of factors on CNCbl formation; a – influence of methods for bacterial cell membrane lysis on vitamin B₁₂ extraction, b – influence of autoclaving conditions, c – influence of KCN solution pH value, d – influence of KCN content. The relative conversion efficiency (%) has been presented considering the best result.



Slika 2: Kromatogrami vzorcev, ki so bili pripravljani z različnimi metodami za razbitje bakterijskih celic (a – CNCbl, b – ACbl, — avtoklaviranje, — dodatek encimov + UZ kopel, — dodatek encimov). Figure 2: Chromatograms of samples prepared by various methods for bacterial cell membrane lysis (a – CNCbl, b – ACbl, — autoclaving, — enzyme addition + ultrasound bath, — enzyme addition).

ZAKLJUČKI

Razvili smo analizo metodo za določanje vsebnosti vitamina B₁₂ v vzorcih, pridobljenih s fermentacijo kisle sirotke. Ugotovili smo, da sta pri pripravi vzorcev zelo pomembna dva koraka. S postopkom avtoklaviranja uničimo bakterijsko celično steno in povzročimo sprostitve vitamina B₁₂, z dodatkom KCN pa ACbl oziroma MeCbl pretvorimo v stabilnejšo obliko CNCbl. Validirana analizna metoda nam omogoča določanje vsebnosti vitamina B₁₂ v gojiščih s kislom sirotko, prav tako bi jo lahko prenesli tudi na druga gojišča.

CONCLUSIONS

An analytical method for vitamin B₁₂ determination in samples obtained by acid whey-based media fermentation was developed. Two steps are very important in the sample preparation procedure. Extraction of vitamin B₁₂ is achieved by bacterial membrane lysis with autoclaving, while the conversion of ACbl or MeCbl into a more stable CNCbl form is achieved with the addition of KCN. A validated analytical method allows the vitamin B₁₂ determination in acid whey-based media and could also apply to other growth media.

Zahvala LAKTIKA

Raziskava je bila sofinancirana s projektom LAKTIKA (št. pogodbe OP20.03521) Operativnega programa EKP 2014 – 2020 in projektom LIFE for Acid Whey (št. pogodbe LIFE16 ENV/SI/000335) evropskega finančnega instrumenta LIFE.

Acknowledgements LAKTIKA

This research was co-funded by the project LAKTIKA (contract No. OP20.03521) in the frame of the Operational Programme ECP 2014 – 2020 and the project LIFE for Acid Whey (contract No. LIFE16 ENV/SI/000335) of the European financial instrument LIFE.

