مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال پنجم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، صفحات ۳۱-۲۳

اثر بتائین بر تولید ویتامین B_{12} توسط باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی*

مرضیه موسوی نسب[۱]، سپیده علاسوند زراسوند[۲]، علیرضا یوسفی[۲]

۱- نویسنده مسئول: استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
پست الکترونیکی: marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۷

چکیده

سابقه و هدف: تولید این ویتامین با استفاده از روش‌های شیمیایی، به‌دلیل پیچیدگی فرایند بسیار مشکل است. هدف از انجام این پژوهش، که برای اولین بار در ایران انجام شده تولید ویتامین B_{12} توسط باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* و بررسی اثر بتائین بر میزان این تولید بوده است.

مواد و روش‌ها: باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* به محیط تخمیر حاوی ذرت خیسانده‌شده و فیلترشده تلقیح شد. پس از گرمخانه‌گذاری ارلن‌های حاوی محیط تخمیر در دمای $30^{o}C$ ، ترکیب بتائین در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر، به محیط کشت تخمیر اضافه شد. پس از انجام مراحل جداسازی و خالص‌سازی، برای شناسایی ترکیب ویتامین B_{12} و تعیین میزان تولید آن در محیط تخمیر ذکرشده از دستگاه HPLC استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیشترین مقدار تولید ویتامین B_{12} در غلظت ۱۰ گرم در لیتر بتائین به‌دست آمد (۳۱۸/۳۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر)، در حالی که این غلظت بتائین، اثر منفی بر وزن خشک سلولی داشت (۲۲/۳۷ گرم بر لیتر). این نتایج تأثیر منفی بتائین را بر رشد سلول‌ها و تأثیر مثبت آن را بر میزان تولید ویتامین B_{12} توسط باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* نشان داد.

نتیجه‌گیری: با اضافه کردن بتائین در غلظت مناسب به محیط کشت باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* می‌توان میزان تولید ویتامین B_{12} را افزایش داد و به راهی جهت تولید اقتصادی و تجاری ویتامین B_{12} دست یافت.

واژگان کلیدی: بتائین، *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی*، تخمیر، ویتامین B_{12}

• مقدمه

ویتامین B_{12} به گروهی از ترکیبات شامل کرونوئیدهای کبالت گفته می‌شود که شاخص‌ترین جزء آن کوبالامین است. در طبیعت ۵- دی‌اکسی‌آدنوزیل‌کوبالامین (کوآنزیم B_{12}) و متیل‌کوبالامین محصولات نهایی بیوسنتز B_{12} هستند، در حالی که ویتامین B_{12} به فرم سیانوکوبالامین، به‌صورت صنعتی تولید می‌شود. میکروارگانیسم‌ها یکی از منابع تولید ویتامین B_{12} هستند که آن را به‌صورت ۵- دی‌اکسی‌آدنوزیل‌کوبالامین تولید می‌کنند و فرم سیانیددار آن، یعنی سیانوکوبالامین، در نتیجه فرایند استخراج و خالص‌سازی توسط ترکیبات سیانیددار مثل سیانید پتاسیم تولید می‌شود (۱). ویتامین B_{12} در هر بافت حیوانی در غلظت‌های خیلی کم مثلاً ppm ۱ در کبد موجود است. نیاز حیوانات به ویتامین B_{12} ، از طریق جذب مواد غذایی یا جذب ویتامین B_{12} تولیدی توسط میکروارگانیسم‌های روده‌ای برطرف می‌شود. با این وجود انسان‌ها ویتامین B_{12} را فقط از مواد غذایی به‌دست می‌آورند زیرا ویتامین سنتزشده توسط میکروارگانیسم‌ها در ناحیه روده بزرگ جذب نمی‌شوند. غلظت‌هایی از ویتامین B_{12} که در بافت‌های حیوانی وجود دارند، برای استفاده در سطح تولید تجاری بسیار کم هستند. لجن فعال‌شدهٔ حاصل از تصفیه فاضلاب،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]

حاوی ۴ تا ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B_{12} در هر کیلوگرم است. جداسازی ویتامین از این منبع به لحاظ مشکل بودن جداسازی آنالوگ‌های مختلف B_{12} گران است. سنتز شیمیایی نیز به لحاظ این که به هفتاد مرحله واکنش نیاز دارد غیرکاربردی است (۳، ۲).

اولین بار ویتامین B_{12} به‌صورت تجاری به‌عنوان محصول جانبی تخمیرهای استرپتومیست با عملکردی حدود ۱ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. با افزایش تقاضا برای این ویتامین، فرایندهای تخمیری با سویه‌های پربازده‌تر، توسعه پیدا کرد (۲).

به‌کارگیری علم بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک سبب شد که میزان تولید محصول مورد نظر افزایش یابد. برای این منظور عموماً از سه روش استفاده می‌شود:

۱- تغییر ترکیب محیط کشت در جهت تولید محصول دلخواه، از این روش برای تولید بیشتر ویتامین B_{12} در اثر اضافه کردن بتائین به محیط تخمیر استفاده می‌شود.

۲- ایجاد جهش مورد نظر و تبدیل آن به ژنومی که تولید محصول دلخواه را افزایش دهد، برای این منظور از روش‌های فیزیکی و مواد جهش‌زای شیمیایی استفاده می‌شود.

۳- استفاده از DNA نوترکیب، در این روش ژنی که سبب تولید محصول مورد نظر می‌شود، وارد ژنوم باکتری خاص شده و جزء ساختار ژنتیکی آن می‌گردد و تولید آن با شدت بیشتری انجام می‌شود. تکنیک PCR از روش‌های مهم به‌کاررفته در جهت تشدید تولید ژنوم تولیدکننده محصول مورد نظر است (۴).

در حال حاضر تولید تجاری ویتامین B_{12} از طریق تخمیر انجام می‌شود و میزان تولید سالانه آن در حدود ۱۰۰۰۰ کیلوگرم تخمین زده می‌شود. تقریباً ۳۵۰۰ کیلوگرم سیانوکوبالامین، ۲۰۰۰ کیلوگرم هیدروکسی‌کوبالامین، ۱۰۰۰ کیلوگرم کوآنزیم و مقدار کمی متیل‌کوبالامین برای صنعت داروسازی و تهیه مکمل‌های غذایی استفاده می‌شود و بقیه آن به صنعت تولید خوراک دام اختصاص می‌یابد. برای خوراک طیور و خوک ۱۰ تا ۱۵ میلی‌گرم ویتامین B_{12} به هر تن خوراک افزوده می‌شود. چنانچه پروتئین‌های گیاهی با ویتامین B_{12} غنی شوند، می‌توانند جایگزین پروتئین‌های حیوانی که گران‌قیمت‌تر هستند شوند (۵).

به خاطر گران بودن و پیچیده بودن تولید شیمیایی ویتامین B_{12}، امروزه صنعت تولید آن توسط فرایند تخمیر و به‌وسیله میکروارگانیسم‌هایی مانند *پروپیونی باکتریوم شرمانی*، *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* و *سودوموناس دنیتریفیکانس* صورت می‌گیرد (۱).

بتائین به کمک خاصیت متیل‌دهندگی و شرکت در سنتز ترکیبات مهمی نظیر پروتئین و DNA/RNA، تولید ویتامین را افزایش می‌دهد. اسیدآمینهٔ متیونین، به‌لحاظ دارا بودن گروه متیل، می‌تواند به‌عنوان یک متیل دهنده عمل نماید و از این رو ممکن است مقداری از این اسیدآمینهٔ ضروری که در محیط کشت وجود دارد، وارد واکنش متیلاسیون شود. با حضور بتائین در محیط کشت و تأمین گروه‌های متیل مورد نیاز بدن توسط بتائین، متیونین بیشتری برای سنتز پروتئین و در نتیجه رشد سلول در دسترس قرار می‌گیرد. علاوه بر این در نتیجه متابولیسم بتائین (تری‌متیل‌گلیسین) در سلول، اسیدآمینهٔ گلیسین تولید می‌شود که از جمله اسیدآمینه‌های مهم در سنتز پروتئین و رشد سلول باکتری است (۷، ۶). در گزارشاتی به تأثیر مثبت بتائین در افزایش تولید B_{12} اشاره شده است (۸، ۱). هدف این تحقیق بررسی اثر غلظت‌های مختلف بتائین در تولید ویتامین B_{12} توسط باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* است که برای این منظور از محیط تخمیر، شامل ذرت خیسانده‌شده برای تولید ویتامین استفاده شد.

• مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم به‌کار برده‌شده در جهت تولید: *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* (PTCC 1874).

محیط کشت فعال‌سازی: سدیم لاکتات ۱٪، عصاره مخمر ۱٪ و trypticase soy broth ۱ ٪

محیط پیش‌کشت ۱: آب گوجه‌فرنگی فیلترشده ۲۰۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم در لیتر، تریپتون ۱۰ گرم در لیتر

محیط پیش‌کشت ۲: ۲۰ گرم در لیتر ذرت خیسانده‌شده فیلترشده و ۹۰ گرم در لیتر گلوکز

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]

محیط کشت تخمیر: ذرت خیسانده شده فیلترشده ۴۰ گرم در لیتر (نسبت ذرت به آب داغ ۲ به v/v۱ ، مدت زمان خیساندن ۹۰ دقیقه)، گلوکز ۱۰۰ گرم در لیتر، Na_2HPO_4 ۲/۷ گرم در لیتر، و کلرید کبالت ۰/۰۲ گرم در لیتر.

مکمل‌های محیط کشت تخمیر: بتائین در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر، کلرید کبالت و دی‌متیل‌بنزایمیدازول.

آماده‌سازی میکروارگانیسم و محیط کشت تخمیر: باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* از خانواده پروپیونی باکتریاسه است. این باکتری گرم مثبت، غیرهوازی، غیراسپورزا و غیرمتحرک است که به‌صورت لیوفیلیزه‌شده از PTCC خریداری شد. باکتری در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۰°C بر روی محیط کشت سدیم لاکتات برای مدت ۳ روز گرمخانه‌گذاری شد. بعد از فعال‌سازی باکتری در شرایط ذکرشده، باکتری مذکور در محیط پیش‌کشت ۱ (seed culture)، به‌مدت ۲ روز و در دمای ۳۰°C، بدون اعمال سیستم هوادهی نگهداری شد. سپس باکتری مورد نظر به محیط پیش‌کشت ۲ منتقل شد تا به این ترتیب میزان تولید باکتری افزایش یابد. محیط پیش‌کشت ۲ حاوی ۲۰ گرم در لیتر ذرت خیسانده‌شده فیلترشده و ۹۰ گرم در لیتر گلوکز (pH، ۶/۵) بود که پس از تلقیح باکتری به ارلن مایر شامل این محیط کشت، ظروف حاوی محیط پیش‌کشت در دمای ۳۰ °C و به‌مدت ۲۴ ساعت و بدون انجام فرایند هوادهی گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان گرمخانه‌گذاری، محتویات ارلن‌ها به یک ارلن مایر استریل منتقل شد. فرایند تلقیح محیط تخمیر توسط باکتری‌های محیط پیش‌کشت، به نسبت ۱:۱۰ حجم محیط تخمیر صورت گرفت. محیط تخمیر حاوی ذرت خیسانده‌شده فیلتر شده، به‌میزان ۴۰ گرم در لیتر، گلوکز ۱۰۰ گرم در لیتر و کلرید کبالت ۶ آبه ۰/۰۲ گرم در لیتر بود. محیط مذکور به مدت ۸۰ ساعت در دمای ۳۰°C و در شرایط بی‌هوازی (استفاده از گاز پک A و محفظه بی‌هوازی آزمایشگاهی) گرمخانه‌گذاری شد (۹). با استفاده از pH متر، pH محیط تخمیر به کمک سود ۰/۱ نرمال در حدود ۷ تنظیم شد. در مرحله بعد که تحت شرایط بی‌هوازی بود، بتائین در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر به ارلن‌های تخمیر اضافه شد و ارلن‌های حاوی محیط تخمیر، به‌مدت ۴ روز در دمای ۳۰°C نگهداری شدند (۷، ۳).

جداسازی و خالص‌سازی ویتامین B_{12} : مرحله خالص‌سازی به این صورت بود که ابتدا دما ۱۲۰°C به‌مدت ۱۰ دقیقه در pH، ۶/۵ اعمال شد تا سلول‌های باکتری از بین بروند. پس از آن عصاره خارج شده، تحت فرایند حرارتی مذکور، در سیانید پتاسیم حل شد که تحت این شرایط کوبالامین تبدیل به سیانوکوبالامین می‌شود. سپس محلول از ستون HPLC که فاز ثابت آن آلومینا و فاز متحرک آن آب و فنول بود عبور داده شد (۱۰، ۷، ۳). شکل ۱ مراحل تولید تخمیری ویتامین B_{12} را توسط باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* نشان می‌دهد.

اندازه‌گیری وزن خشک سلول: برای این منظور ارلن‌های حاوی محیط کشت که تحت شرایط بی‌هوازی تحت اثر غلظت‌های مختلف بتائین قرار گرفته بودند، در ظروف مخصوص سانتریفیوژ قرار داده شدند و با دور ۵۰۰۰ rmp برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دو بار شستشوی رسوب‌ها با آب مقطر، رسوب‌های به‌دست آمده که همان سلول‌های باکتریایی بودند در دستگاه آون و تحت دمای ۷۰°C تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند و وزن نهایی آن توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ تعیین شد.

تعیین مقدار ویتامین B_{12} : میزان ویتامین تولیدی به‌وسیله دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. از ویتامینB_{12} خریداری‌شده از شرکت مرک، به‌عنوان استاندارد خارجی، جهت مطابقت با پیک نمونه که توسط دستگاه HPLC به‌دست آمد استفاده شد. به عصاره حاوی ویتامین B_{12} تولید شده توسط باکتری که مطابق با روش ذکر شده در قسمت جداسازی و خالص‌سازی تهیه شد، ۲/۵ میلی‌لیتر نیترات‌سدیم و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد. سپس عصاره فیلتر شده و ۲۰ میکرولیتر از سیانیدسدیم ۱۰ درصد به آن اضافه گردید و قبل از تزریق به‌دستگاه، توسط فیلتر میلی‌پور (Millipore) با مش سایز ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد (۱). اندازه‌گیری ویتامین B_{12} از طریق فاز معکوس و به‌صورت ایزوکراتیک صورت گرفت. دستگاه HPLC شامل یک پمپ از نوع Beckman مدل B110،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]

یک ستون C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۶/۴ میلی‌متر و سیستم تزریق حلقه‌ای با حجم ۲۰ میکرولیتر، آشکارساز (detector) دوشعاعی با تک‌رنگ کننده مدل فیلتری بوده و آشکارسازی در طول موج ۲۵۴ نانومتر انجام شد. خروجی آشکارساز به انتگراتور (integrator) نوع Spectra Physics 4290 وصل شد و کلیه اندازه‌گیری‌ها از طریق روش استاندارد خارجی انجام گرفت. بهترین فاز متحرک برای تشخیص و تعیین میزان ویتامین‌های محلول در آب، مانند ویتامین B_{12}، بافر فسفات همراه با ۱۰ درصد استونیتریل به‌عنوان اصلاح‌کننده است که مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). آب مورد استفاده پس از تقطیر و عبور از معاوضه‌کننده کاتیونی (Catex) و آنیونی (Anex) دوباره تبخیر شد تا به درجه خلوص مورد نیاز جهت آنالیز با HPLC برسد. EC برای آب تهیه‌شده ۰/۸ میکروزیمنس بود.

ارزیابی آماری: در این پژوهش از طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده شد. اثر فاکتور بتائین بر میزان تولید ویتامین B_{12} و وزن خشک سلولی با استفاده از جدول تجزیه واریانس (ANOVA) گزارش شد. آزمایشات در سه تکرار انجام پذیرفت. برای مقایسه میانگین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد، از نرم‌افزار $SPSS_{13}$ و تست دانکن استفاده شد. برای رسم نمودارها نرم افزار اکسل ۲۰۰۷ به‌کار گرفته شد.

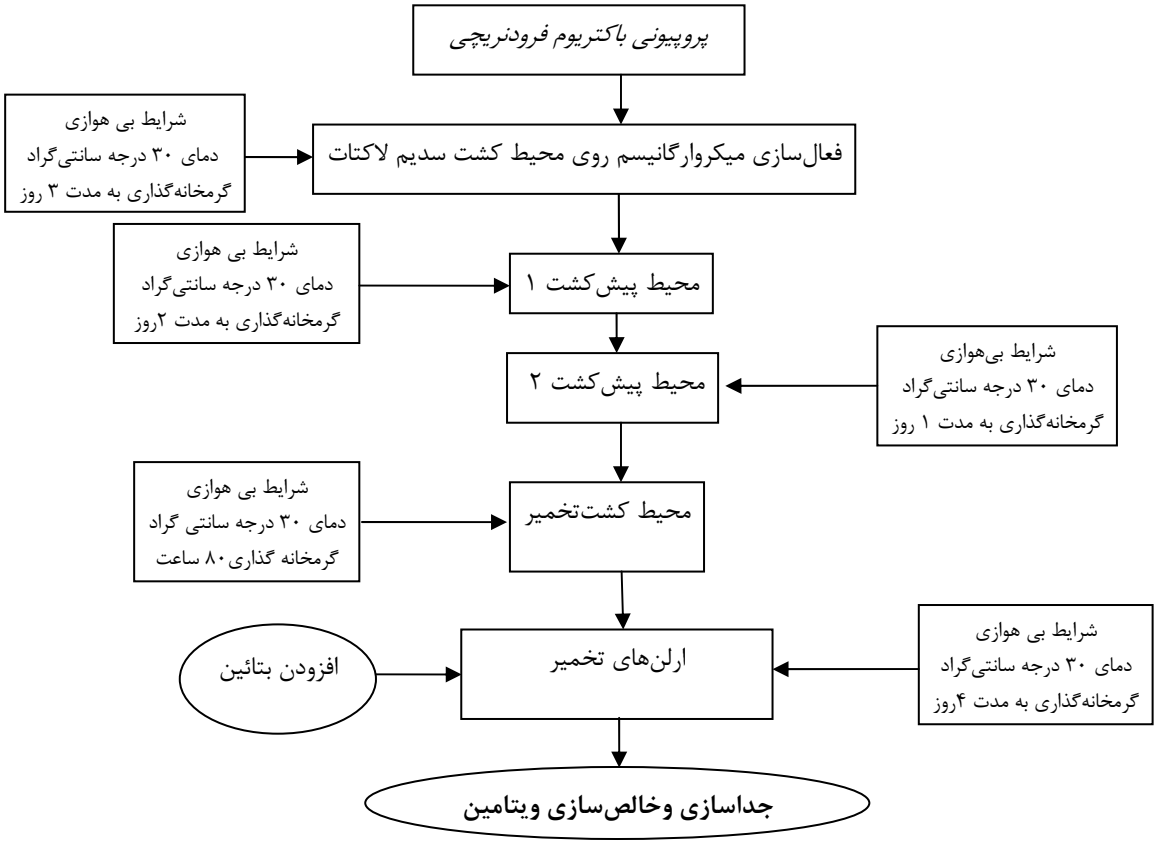
• یافته‌ها

اثر بتائین بر سنتز ویتامین B_{12}: شکل ۲ نشان می‌دهد که بیشترین مقدار ویتامین B_{12} (۳۱۸/۳۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر) در اثر اضافه کردن ۱۰ گرم در لیتر از بتائین به محیط تخمیر به‌دست آمد. در شکل ۳ مشخص است که با افزایش میزان بتائین در محیط کشت تخمیر، وزن خشک سلول کاهش پیدا کرد که حاکی از تأثیر منفی بتائین بر رشد سلول‌ها است. همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد، میزان تولید ویتامین B_{12} در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ گرم در لیتر بتائین کاهش می‌یابد که علت این مسئله می‌تواند اختلال در مسیر سنتز ویتامین B_{12} باشد.

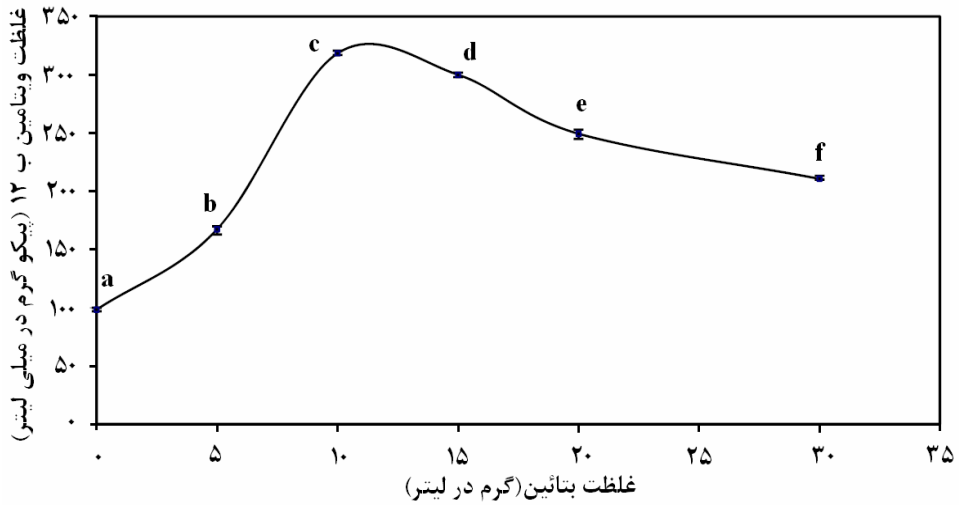
شکل‌های ۲ و ۳ آنالیز میانگین داده‌های مربوط به میزان تولید ویتامین B_{12} و نیز تغییرات وزن خشک سلولی در اثر اضافه کردن غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر بتائین را نشان می‌دهند. این آنالیز توسط تست دانکن و در سطح ۵٪ انجام شد و همان طور که دیده می‌شود، غلظت‌های ۵ و ۱۰ گرم در لیتر بتائین اثر معنی‌داری در جهت تولید بیشتر ویتامین B_{12} را نشان داد، درحالی که غلظت‌های ۱۵، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر بتائین اثر معنی‌داری را در جهت کاهش این ویتامین نسبت به میزان اپتیمم نشان داد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف بتائین بر میزان تولید ویتامین B_{12} ، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار صورت پذیرفت. جدول تجزیه واریانس این آزمایش، در مورد اختلاف تیمارها کاملاً معنی‌دار بود ($p< ۰/۰۰۱$). شکل ۴ کروماتوگرام HPLC را نشان می‌دهد که با توجه به آن بیشترین غلظت به‌دست آمده از ویتامین B_{12} (۳۱۸/۳۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر) می‌باشد. همچنین صحت پیک دریافتی توسط نمونه استاندارد ویتامین B_{12} مشخص شد که هر دو زمان خروج برابر ۸ دقیقه را نشان دادند. لازم به ذکر است که اگر چه اندازه‌گیری ویتامین از طریق HPLC بیشتر از طریق گرادیان شویشی انجام می‌شود، اما در این تحقیق به‌دلیل محدودیت دستگاه از روش ایزوکراتیک استفاده شد که این خود تا اندازه کمی در امر جداسازی HPLC موجب کاهش قدرت تفکیک می‌شود.

اثر بتائین بر روی رشد سلول‌ها: همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد، بیشترین میزان وزن خشک سلول (DCW) ۲۹/۳۴ گرم در لیتر بود و زمانی مشاهده شد که غلظت بتائین صفر و بتائین در محیط کشت تخمیر وجود نداشت. تاکنون علت تاثیر منفی بتائین بر روی رشد سلول باکتری مشخص نشده است. شکل ۳ اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) کاهش میانگین رشد سلولی، به‌دلیل افزایش غلظت بتائین اضافه‌شده به محیط کشت تخمیر را در چهار سطح نشان می‌دهد. برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف بتائین بر میزان وزن خشک سلولی، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار صورت پذیرفت. جدول تجزیه واریانس این آزمایش در مورد اختلاف تیمارها کاملاً معنی‌دار بود ($p< ۰/۰۰۱$).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]

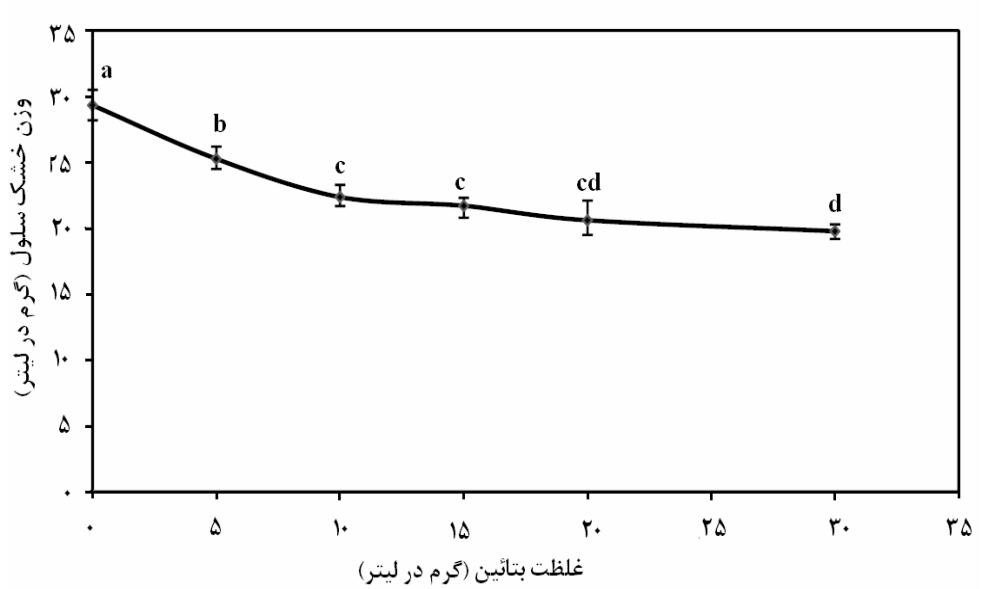


شکل ۱- مراحل فرایند تخمیر جهت تولید ویتامین B_{12} با استفاده از باکتری پروپیونی باکتریوم فرودنریچی

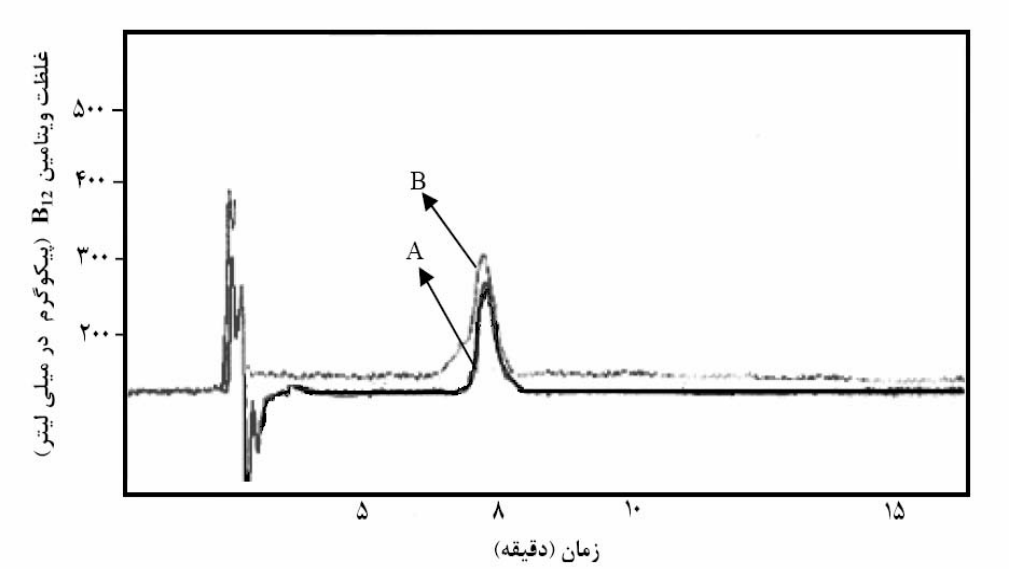


شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف بتائین بر میزان تولید ویتامین B_{12} (آنالیز میانگین داده‌ها در سطح ۵٪ و به‌وسیله تست دانکن انجام شد)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]



شکل ۳ - اثر غلظت‌های مختلف بتائین بر میزان وزن خشک سلول باکتری (آنالیز میانگین داده‌ها در سطح ۵٪ و به‌وسیله تست دانکن انجام شد)



شکل ۴- کروماتوگرام HPLC نمونه استاندارد ویتامین B_{12} تزریق شده (A) و نمونه حاوی ویتامین B_{12} تولیدی توسط باکتری (B). زمان خروج نمونه ۸ دقیقه بود که بر منحنی استاندارد منطبق است

• بحث

نتایج نشان داد که بتائین ترکیب ضروری برای سنتز ویتامین B_{12} به‌وسیله باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* است. اگر چه بیشترین رشد سلول در کمترین مقدار بتائین دیده شد ولی میزان تولید ویتامین B_{12} در این حالت در کمترین مقدار خود (۹۸/۳۳ پیکوگرم در میلی لیتر) بود و بیشترین میزان تولید ویتامین B_{12} در غلظت ۰/۱٪ (w/v) بتائین به‌دست آمد. این مطالعه نشان داد که بتائین تأثیر منفی بر میزان رشد و تأثیر مثبت بر مقدار تولید ویتامین

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]

B_{12} توسط باکتری پروپیونی باکتریوم دارد. در نتیجه با اضافه کردن بتائین در غلظت‌های مناسب به محیط کشت می‌توان تولید ویتامین B_{12} را افزایش داد.

Li و همکاران (۱) از بتائین، برای بهینه‌سازی شرایط تولید ویتامین B_{12} به‌وسیله باکتری *سودوموناس دنیتریفیکانس* استفاده کردند. آنها بتائین را در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر به محیط‌های کشت باکتری اضافه کردند و میزان ویتامین تولیدشده را توسط این باکتری گزارش نمودند. بیشترین میزان تولید ویتامین (۵۲/۱۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) در غلظت ۱۵ گرم در لیتر بتائین گزارش شد و نیز بیشترین وزن خشک سلول (۳۰/۵۱ گرم در لیتر) در حالتی روی داد که به محیط کشت بتائین اضافه نشده بود. این نتایج با نتایج به‌دست آمده درمطالعه حاضر مطابقت دارد.

Turlo و همکاران (۸) اثر گروه‌های متیل دهنده (بتائین، کولین و متیونین) را بر سنتز ویتامین B_{12} در یک نوع قارچ خوراکی (*Lentinula edodes*) مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش از ۴ محیط کشت مختلف که شامل ملاس چغندر، گلوکز، ذرت خیسانده، عصاره سویا و غیره بود استفاده شد. همچنین از گروه‌های متیل دهنده در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ گرم در لیتر استفاده شد. نتایج حاکی از این بود که تمام گروه‌های متیل دهنده در غلظت‌های مختلف، باعث افزایش تولید ویتامین B_{12} شدند. بتائین در غلظت ۳ گرم در لیتر، متیونین در غلظت ۱ گرم در لیتر و کولین در غلظت ۳ گرم در لیتر بر تولید ویتامین B_{12} مؤثر بودند. آنها اثر بتائین را روی افزایش سنتز ویتامین، خاصیت متیل‌دهندگی و متابولیسم متیونین گزارش کردند.

Fa و همکاران (۱۲) افزایش میزان تولید ویتامین B_{12} را در اثر اضافه کردن بتائین به محیط تخمیر باکتری *سودوموناس دنیتریفیکنس* گزارش کردند و سپس اثر متقابل تحریک‌کنندگی تولید این ویتامین توسط بتائین و بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین (rifampin)، کلرامفنیکول (chloramphenicol) و بنزیل‌پنی‌سلین (benzylpenicillin) را مطالعه کردند. نتایج نشان داد که توقف اثر تحریک‌کنندگی تولید این ویتامین توسط بتائین، در حضور ریفامپین و کلرامفنیکول صورت می‌گیرد، درحالی که بنزیل‌پنی‌سیلین اثر بازدارندگی روی عمل تحریک‌کنندگی بتائین ندارد.

Demain و همکاران (۵) اثر بتائین را روی باکتری سودوموناس بررسی کردند. آنها به محیط کشت میکروارگانیسم ۵ میلی گرم بتائین اضافه کردند و مشاهده نمودند که تولید ویتامین B_{12}، ۲۰ برابر شده است. نتایج مشابه Kacperzakو همکاران (۱۱)، Csaikl و همکاران (۱۳) و White و همکاران (۱۴) روی تاثیر مثبت بتائین در افزایش سنتز ویتامین B_{12} صحه گذاشتند.

هدف از این پژوهش، تولید بیوتکنولوژیکی ویتامین B_{12} توسط باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* و بررسی اثر بتائین بر میزان این تولید بود. این تحقیق برای نخستین بار در ایران انجام پذیرفته است و از آنجایی که از محیط تخمیر شامل ذرت خیسانده استفاده شد، نویدبخش استفاده از ضایعات کشاورزی در تولید محصول با ارزش افزوده ویتامین B_{12} در سطح وسیع است.

سپاسگزاری

از هسته کارآفرینی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز که حمایت مالی پروژه را برعهده داشته‌اند، صمیمانه قدردانی می‌شود. همچنین از جناب آقای حسینعلی شمس، کارشناس محترم آزمایشگاه مرکزی آنالیز دانشگاه شیراز و سرکار خانم محترم کشاورز، کارشناس آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر می‌شود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]

References

1. Li KT, Liu DH, Li YL. Improved large-scale production of vitamin B_{12} by *Pseudomonas denitrificants* with betaine feeding. Bioresour Technol 2008; 99:8516-8520.
2. Battersby AR, Leeper FJ. Biosynthesis of vitamin B_{12}. Top Curr Chem 1998; 195:143-193.
3. Demain AL, Daniels HH, Schnabel L, White RF. Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B_{12} Fermentation. Nature (London) 1968; 220:1324-1325.
4. Lee BH. Fundamentals of food biotechnology.VCH publisher 1996. p.47-128.
5. Demain A, White RF. Prophyrin over production by *Pseudomonas denitrificans*: essentiality of betaine and stimulation by ethionine. J Bacteriol 1971; 107:456-460.
6. Martens JH, Barg H, warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B_{12}. Appl Biotechnol 2002; 58: 275-285.
7. Horig J, Renz P. Biosynthesis of vitamin B_{12}. Formation of free 5, ß-dimethylbenzimidazol and alpha-ribazole from riboflavin by *Propionibacterium freudenreichii*. FEBS 1977; 80:337-339.
8. Turlo J, Gutkowska B, Herold F, Krzyczkowski W, Blazewicz A, Kocjan R. Optimizing vitamin B_{12} biosyntethesis by mycelial cultures of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. J Enzyme Microb Thechnol 2008; 43:367-374.
9. Ro SL, Wood burn M, Sandine WE.Vitamin B_{12} and ascorbic acid in kimchi inoculated with Propionibacterium freudenreichji ss. Shermanii. J. Food Sc. 2006; 44:873-877.
10. Hunik JH. Process for the production of vitamin B_{12}. US patent. 6492141. 12/10/2002.
11. Kacperzak MM, Lewadowska I, Matthews RG, Paszewski A. Transcriptional regulation of methionine synthase by homocysteine and choline in *Aspergillus nidulans*. Biochem 2003; 376:517-524.
12. Fa YH, Kusel JP, Demain AL. Dependence of Betaine Stimulation of Vitamin B_{12} Overproduction on Protein Synthesis. Appl Environ Microbiol 1984; 47: 1067-9.
13. Csaikl U, Csaikl F. Molecular cloning and characterization of MET6 gene of *Saccaromyces cerevisiae*. J Gene 1986; 46:207-214.
14. White RF, Demain AL. Catabolism of betaine and its relationship to cobalamin overproduction. J Biochem Biophys Acta 1971; 237:112-119.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]

The effects of betaine on vitamin B_{12} production by *Propionibacterium freudenreichii*

Moosavi-Nasab M[*1], *Alasvand-Zarasvand S*[2], *Yousefi AR*[2]

*1- *Corresponding author:Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Shiraz, Iran. Email: marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca*

2- M.Sc in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Shiraz, Iran.

Received 4 Apr, 2010 **Accepted 18 Aug, 2010**

Background and Objectives: Chemical production of vitamin B_{12} is a complicated process. The purpose of this study, done for the first time in Iran, was to produce vitamin B_{12} by *Propionibacterium freudenreichii* and investigate the effect of adding betaine on its yield.

Materials and Methods: *Propionibacterium freudenreichii* was added to a fermention culture medium containing filtrated soaked corn. This was followed by incubation at 30°C and, then, adding betaine at six concentrations (0, 5, 10, 15, 20 and 30 g/l). Separation and purification were done and the presence and the amount of vitamin B_{12} produced were determined by HPLC.

Results: The most effective concentration of betaine for vitamin B_{12} production (318.33 Pg/ml) was 10 g/l, which had a negative effect on dry weight of the cells (22.37 g/l). The results demonstrated that betaine could greatly stimulate vitamin B_{12} biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* and inhibit cell growth.

Conclusion: Based on the findings of this study, betaine added to the culture medium of *Propionibacterium freudenreichii* at a suitable concentration could increase the yield of vitamin B_{12}, paving the way to a commercial, more economic method for its production.

Keywords: Betaine, Fermentation, *Propionibacterium freudenreichii*, Vitamin B_{12}

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-07]