J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 49, pp. 43-49, 2009

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۴۹، صفحات ۴۹-۴۳، ۱۳۸۸

تولید ویتامین $B_{۱۲}$ غیرنشان‌دار و نشان‌دار توسط باکتری استرپتومایسس گریزئوس

مریم مظاهری تهرانی*[۱]، سعید قربانزاده مشکانی[۱]، پریسا تاجرمحمدقزوینی[۲]، امین نظری[۱]، فریدون افلاکی[۳]

۱- آزمایشگاه بیوتکنولوژی هسته‌ای، پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران- ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهرا، تهران- ایران

۳- آزمایشگاه شیمی و محیط زیست، پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران- ایران

چکیده: در این کار تحقیقاتی، تولید ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار با استفاده از گونه‌ای از اکتینومیست در یک محیط کشت جدید به روش تخمیر ناپیوسته مورد بررسی قرار گرفته است. پس از تولید و آزادسازی ویتامین $B_{۱۲}$ از سلول‌های میکروبی، محلول حاوی ترکیبات کوبالامین روی ستونی از رزین XAD-4 تثبیت شده و ستون توسط محلول‌های مختلف شسته شد. مقدار ویتامین $B_{۱۲}$ موجود در محلول خروجی از ستون، به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد و جهت تأیید وجود ترکیبات کوبالامین در نمونه‌ها، از روش کروماتوگرافی لایه‌ی نازک استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان تولید ویتامین $B_{۱۲}$ توسط این میکروارگانیسم ۱۴۵۶ میکروگرم در لیتر است. اتانول و استون، به عنوان بهترین محلول‌های شستشوی ستون برای جداسازی ویتامین $B_{۱۲}$ تعیین شدند. اندازه‌گیری‌های کروماتوگرافی لایه‌ی نازک نشان داد که مقادیر R_f سیانوکوبالامین و متیل کوبالامین تولید شده توسط باکتری با مقادیر استاندارد مطابقت می‌کنند. فعالیت ویژه‌ی $B_{۱۲}$ نشان‌دار، پس از انجام مراحل واجذب آن با استفاده از عوامل مختلف استن، الکل خالص، الکل ۲۵٪ و آب، به ترتیب، برابر با ۸٫۵۵، ۶٫۹۰، ۰٫۷۹ و ۵٫۷۵ بکرل در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، محلولی از $B_{۱۲}$ نشان‌دار با فعالیت ویژه‌ی ۲۱٫۹۹ بکرل در میلی‌لیتر به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: ***تخمیر میکروبی، استرپتومایسس گریزئوس، ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار، کبالت-۵۷، ویتامین $B_{۱۲}$، طیف‌سنج گاما***

Production of Vitamin B_{12} and Labeled Vitamin B_{12} by *Streptomyces griseus*

M. Mazaheri Tehrani*[1], S. Ghorbanzadeh Mashkani[1], P. Tajer Mohammad Ghazvini[2], A. Nazari[1], F. Aflakee[3]

1- Nuclear Biotechnology Laboratory, Nuclear Science Research School, Nuclear Science and Tchnology Research Institute, P.O. Box: 11365-3486, Tehran - Iran

2- Department of Microbiology, Faculty of Science, Az- Zahra University, Tehran - Iran

3- Chemistry and Environment Laboratory, Nuclear Science Research School, Nuclear Science and Tchnology Research Institute, P.O. Box: 11365-3486, Tehran, Iran

Abstract: In this study, the production of labeled vitamin B_{12} with one strain of actinomycet in a novel synthetic medium by batch fermentation method was investigated. After releasing vitamin B_{12} from microbial cells, the solution containing cobalamin analogues was fixed on amberlite XAD-4 exchanger and eluted by various solutions. Vitamin B_{12} in the collected fractions were measured by HPLC method and also in order to confirm the existence of cobalamin compounds in the samples, TLC technique was used. In the optimal conditions, production of vitamin B_{12} by this microorganism was 1456µg/l. The best recoveries of vitamin B_{12} from the column were obtained when the column was eluted by ethanol followed by acetone. The R_f values for cyanocobalamin and methylcobalamin, produced by this microorganism were the same as the standard values of R_f. The desorption of labeled vitamine B_{12} was carried out by different eluants, including acetone, ethanol (absolute), ethanol 25% and deionized water. The activity of labeled vitamin B_{12} was 8.55, 6.90, 0.79, 5.75 Bq/ml, respectively. Therefore, the total specific activity of 21.99Bq/ml was obtained for labeled vitamin B_{12}.

Keywords: ***Microbial Fermentation, Strptomyces griseus, Labeled Vitamin B_{12}, Cobalt-57, Vitamin B_{12}, Gamma Spectroscopy***

*email: mmazaheri@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۱/۱۵

۱- مقدمه

ویتامین $B_{۱۲}$ یا سیانوکوبالامین[۱]، بزرگ‌ترین و پیچیده‌ترین ویتامین از گروه ویتامین‌های محلول در آب است و از نظر ساختمانی حاوی یک هسته‌ی کورین تشکیل شده از یک تتراپیرول حلقه مانند است که در مرکز آن یک یون کبالت قرار دارد. این یون کبالت می‌تواند به گروه‌های متیل، دزوکسی آدنوزیل، هیدروکسی و یا سیانو متصل شود [۱ و ۲]. سیانوکوبالامین شکل پایدار کوبالامین[۲] است که به روش صنعتی عمدتاً توسط میکروارگانیسم‌ها تولید، و در طبیعت به میزان ناچیزی در بافت‌های حیوانی و گیاهی یافت می‌شود [۲]. ویتامین $B_{۱۲}$ ترکیب مهمی است که برای درمان کم خونی و دردهای عصبی و هم‌چنین به عنوان مکمل غذایی در انسان و دام مورد استفاده است. با توجه به این‌که سنتز شیمیایی ویتامین $B_{۱۲}$ به بیش از ۷۰ مرحله‌ی سنتزی نیاز دارد، تولید صنعتی آن با این روش بسیار مشکل و پرهزینه خواهد بود. در نتیجه روش‌های تخمیر میکروبی برای تولید آن در مقیاس صنعتی از اهمیت زیادی برخوردارند [۳ و ۴]. ویتامین $B_{۱۲}$ به عنوان محصول اولیه‌ی تخمیر و یا به عنوان محصول جانبی تخمیر توسط باکتری‌های تولیدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها، شامل استرپتومایسین، نئومایسین، کلروتتراسیکلین تولید می‌شود. گروهی از میکروارگانیسم‌ها مانند پروپیونی باکتریم شرمانی[۳] و پسودوموناس دنیتریفیکنس[۴] به عنوان منبع بالقوه‌ی ویتامین $B_{۱۲}$ برای مصارف صنعتی آن در نظر گرفته شده‌اند [۲ و ۵]. ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار شده با رادیوایزوتوپ‌های کبالت مانند کبالت-۵۷ یکی از کیت‌های تشخیص کم‌خونی است. به عبارت دیگر، جذب ناکافی ویتامین $B_{۱۲}$ یکی از علل کم‌خونی در انسان است. یکی از روش‌های دقیق برای سنجش میزان جذب آن، استفاده از ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار شده با رادیوایزوتوپ‌های کبالت در آزمایش شیلینگ[۵] است [۶]. دیگر ترکیبات ساختگی کوبالامین که توسط رادیونوکلیدهایی مانند ^{۹۹m}Tc، ^{۱۵۳}Gd، ^{۱۱۱}In نشان‌دار می‌شوند، نیز کاربردهای بسیار مهمی در پزشکی هسته‌ای دارند. به نظر می‌رسد برخی از بافت‌های نئوپلاستیک[۶] شبیه منبع ویتامین $B_{۱۲}$ عمل کرده و آن را نسبت به سایر بافت‌های اطراف که با سرعت کم‌تری تقسیم می‌شوند، به میزان بیش‌تری متمرکز می‌سازند. در نتیجه، این ترکیبات و تجمع آن‌ها در بافت‌های آلوده می‌توانند در تصویربرداری از تومورها مورد بهره‌برداری قرار گیرند [۷].

در این کار پژوهشی به منظور تولید ویتامین $B_{۱۲}$ ابتدا یک محیط کشت جدید طراحی گردید و سپس به روش تخمیر ناپیوسته[۷]، تولید و جداسازی ویتامین $B_{۱۲}$ غیرنشان‌دار و ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار شده با رادیونوکلید ^{۵۷}Co، توسط گونه‌ای از اکتینومیست[۸] به نام استرپتومایسس گریزئوس[۹] مورد بررسی قرار گرفت.

۲- بخش تجربی

۲-۱ مواد و دستگاه‌ها

۲-۱-۱ مواد

گلوکز، عصاره‌ی مخمر، عصاره‌ی مالت، بتایین، کولین، ۵ و ۶ دی متیل بنزیمیدازول، کبالت‌کلرید، اتانول، استن، سیانوکوبالامین، متیل‌کوبالامین همگی با درجه‌ی خلوص ۹۹/۹٪، رزین آمبرلیت XAD-4 و کاغذ TLC همه از شرکت مرک یا سیگما بوده و رادیونوکلید کبالت-۵۷ توسط شتاب‌دهنده‌ی سیکلوترون ۳۰MeV کرج در سازمان انرژی اتمی تهیه شد.

۲-۱-۲ دستگاه‌ها

دستگاه pH متر 744 Metrhom، به‌هم‌زن دوار Hiedolph 4002، پمپ خلاء shimadzu، تکاننده- انکیباتور Infors، اتوکلاو برای انجام آزمایش‌ها و آشکارساز HPGe با بازده ۲۰٪ و قدرت تفکیک انرژی ۱/۹keV، دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای Waters 2487, dual absorbance detector با ستون NOVA PAK^{TM} C_{18} و فاز متحرک شامل حلال‌های

A:10g NaH_2PO_4+0.14g Pentane-1 Sulfonic Acid Sodium
B: 32% Solvent A + 68% Acetonitrile Solution

و آشکارساز نور فرابنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر با مشخصات برنامه‌ای زیر برای اندازه‌گیری مقدار ویتامین $B_{۱۲}$ و تأیید ترکیبات کوبالامین در نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

Gradiant program	min	A%	B%	Flow
	۰	۹۵	۵	۱
	۰-۱۰	۷۵	۲۵	۱
	۱۰-۱۱	۷۵	۲۵	۱
	۱۱-۱۲	۹۵	۵	۱
	۱۲-۱۲/۵	۹۵	۵	۱/۵
	۱۲/۵-۱۴/۵	۹۵	۵	۱/۵
	۱۴/۵-۱۵	۹۵	۵	۱

۲-۱-۳ میکروارگانیسم‌ها

باکتری استرپتومایسس گریزئوس DSMZ 40932 از بانک میکروبی آلمان بود. باکتری مورد آزمایش بر روی محیط کشت، Oat Meal Agar (OMA-QUELAB/UK)، در دمای ۲۸-۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ظرف ۵ روز رشد کرده و در یخچال نگه‌داری شد.

۲-۲ روش کار

۲-۲-۱ تهیه‌ی مایه تلقیح

باکتری مورد نظر به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تازه آماده شده‌ی محتوی ۱۷ گرم بر لیتر پپتون کازیین[۱۰]، ۳ گرم بر لیتر پپتون سویا، ۵ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر عصاره‌ی مخمر، ۱ گرم بر لیتر عصاره‌ی مالت، ۵ گرم بر لیتر سدیم کلرید ۲٫۵ گرم بر لیتر هیدروژن سدیم فسفات، ۴ میلی‌گرم بر لیتر کبالت کلرید، تلقیح و در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت و با سرعت به‌هم‌زنی ۱۵۰ دور در دقیقه گرمادهی شد.

۲-۲-۲ روش تخمیر

برای انجام آزمایش‌های تخمیر به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط تازه آماده شده‌ی بدون کبالت، ۲٫۵ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر عصاره‌ی مالت، ۱ گرم بر لیتر عصاره‌ی مخمر، ۰٫۵ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۰٫۲ گرم بر لیتر $MnCl_2.4H_2O$، ۰٫۲ گرم بر لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۰٫۲ گرم بر لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، ۰٫۰۴ گرم بر لیتر $CoCl_2.6H_2O$ اضافه گردید. مواد القاءکننده[۱۱] و پیش ماده‌ی[۱۲] بتایین، کولین و ۵ و ۶ دی‌متیل بنزیمیدازول، به ترتیب، به میزان ۴، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر مطابق جدول ۱ اضافه شدند.

جدول ۱- ترکیب محیط‌های تخمیر برای تولید ویتامین B_{12}.

محیط تخمیر	ترکیب محیط تخمیر
۱	محیط پایه+
۲	محیط پایه + القاکننده‌ی بتایین
۳	محیط پایه + القاکننده‌ی کولین
۴	محیط پایه + پیش‌ماده‌ی ۵ و ۶ دی متیل بنزیمیدازول

- ترکیب محیط پایه برحسب گرم بر لیتر: پپتون کازیین ۱۷، پپتون سویا ۳، گلوکز ۷٫۵، عصاره‌ی مخمر ۲، عصاره‌ی مالت ۲، سدیم کلرید ۵، فسفات هیدروژن سدیم ۲٫۵، $MgSO_4.7H_2O$ ۰٫۵، $MnCl_2.4H_2O$ ۰٫۲، $FeSO_4.7H_2O$ ۰٫۲، $ZnSO_4.7H_2O$ ۰٫۲، $CoCl_2.6H_2O$ ۰٫۰۴. غلظت بتایین، کولین و ۵ و ۶ دی متیل بنزیمیدازول، به ترتیب، ۴، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر بود.

پس از تهیه و آماده‌سازی محیط‌های تخمیر، ۵ درصد از مایه‌ی تلقیح به این محیط‌ها اضافه شده و به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی و با سرعت به هم‌زنی ۱۵۰ دور در دقیقه گرمادهی شدند.

۲-۲-۳ آماده‌سازی و آزادسازی ویتامین B_{12} تولید شده

۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استات (pH=۳٫۷) و ۲۲ میلی‌لیتر محلول سدیم سیانید (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به ۶٫۶ میلی‌لیتر از محیط‌های تخمیر تغلیظ شده در فشار منفی در دستگاه به‌هم‌زن دوار، اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و در فشار ۱ اتمسفر برای آزادسازی ویتامین و تبدیل آن به شکل پایدار، در اتوکلاو قرار داده شدند. سپس با سانتریفوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت هم‌زنی ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، توده‌ی سلولی از محلول بافر جدا گردید [۸].

۲-۲-۴ جداسازی ویتامین B_{12}

پس از تولید و آزادسازی ویتامین B_{12} از سلول‌های میکروبی، محلول حاوی ترکیبات کوبالامین روی ستونی از رزین XAD-4 تثبیت گردیده و ستون توسط محلول‌های مختلف شسته شد. برای این منظور ۱۲ گرم رزین آمبرلیت XAD-4 به محلول بافر حاوی ویتامین که توده‌ی سلولی از آن جدا شده بود، اضافه گردیده و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد هوادهی شد. رزین به وسیله‌ی کاغذ صافی از محلول جدا شده و در دمای ۵۰-۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی در داخل آون خشک شد. رزین خشک شده در ستونی به طول و قطر، به ترتیب، برابر با ۵۰ و ۰٫۵ سانتی‌متر وارد شد. ستون با حلال‌های مختلف-آب یونی‌زدایی شده، الکل خالص و استن- شسته شد. مقدار ویتامین B_{12} در محلول‌های خروجی، به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۱۳] با آشکارساز فرابنفش در طول موج ۲۵۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. در تمامی اندازه‌گیری‌های ویتامین B_{12}، نمونه‌های استاندارد سیانوکوبالامین و متیل کوبالامین به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. سپس جهت تأیید وجود ترکیبات ویتامین [۹، ۱۰ و ۱۱]، محلول‌های حاوی ویتامین B_{12} در دمای ۶۰-۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تبخیر شده و با استفاده از حلال‌های ۲-پروپانول/ آمونیم هیدروکسید (۲۵٪)/آب به نسبت حجمی (۷:۱:۲) و ۱-بوتانول/۲-پروپانول/آب به نسبت حجمی (۱۰:۷:۱۰) به عنوان فاز متحرک کروماتوگرافی لایه‌ی نازک[۱۴] مورد آزمایش قرار گرفتند [۹ و ۱۰].

۲-۲-۵ اندازه‌گیری ویتامین $B_{۱۲}$

برای اندازه‌گیری مقدار ویتامین $B_{۱۲}$ با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی لایه‌ی نازک، ابتدا استاندارد سیانوکوبالامین و متیل کوبالامین در غلظت‌های مختلف به دستگاه تزریق، و منحنی درجه‌بندی رسم گردید. سپس نمونه‌ی حاوی ترکیبات ویتامین $B_{۱۲}$ به دستگاه، تزریق و با استفاده از سطح زیر قله‌ی منحنی نظیر غلظت آن محاسبه گردید.

۲-۲-۶ تهیه‌ی ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار شده با کبالت-۵۷

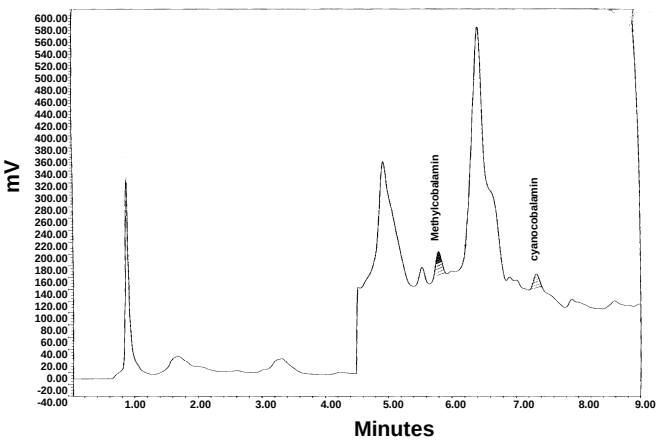
پس از استریل کردن محیط تخمیر فاقد کبالت (محیط تخمیر شماره ۱ جدول ۱) و محتوی ۰٫۰۰۵ گرم در لیتر از پیش‌ماده‌ی ۵ و ۶ دی‌متیل‌بنزیمیدازول، ۴ گرم از مواد القاکننده‌ی بتایین و کولین، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محلول کبالت-۵۷ با فعالیت ۴۰٫۴۲ میکروکوری، به یک لیتر از محیط تخمیر اضافه شد. سپس ۵٪ از مایه‌ی تلقیح باکتری به محیط تخمیر تلقیح گردید. محیط کشت در دمای ۲۸-۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت هم‌زنی ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲۰ ساعت در تاریکی گرمادهی شد [۱۲، ۱۳ و ۱۴]. سپس با استفاده از یک روش اندکی متفاوت از روش به کار رفته برای جداسازی ویتامین $B_{۱۲}$ غیرنشان‌دار، ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار از محیط تخمیر جداسازی شد. به این ترتیب که ۵ میلی‌لیتر محلول سدیم سیانید (۱ گرم در لیتر) و ۱۰ میلی‌لیتر استیک اسید غلیظ به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط تغلیظ شده اضافه گردیده و به مدت سه روز در تکاننده در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس محلول توسط کاغذ صافی، صاف شده و توده‌ی زیستی از محیط تخمیر جدا گردید. به محلول به دست آمده ۱۰ گرم رزین XAD-4 که قبلاً توسط متانول و آب یون‌زدایی شده شسته شده بود، اضافه گردیده و بر روی تکاننده با سرعت کم (۱۰۰ دور در دقیقه) و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه، رزین توسط کاغذ صافی جدا شده و بعد از خشک شدن در آون در دمای ۶۰-۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی، برای جداسازی و خالص‌سازی ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار، وارد ستون گردید. ستون با محلول‌های آب یون‌زدایی شده، الکل ۲۵٪، الکل خالص و استون شسته شد. اندازه‌گیری مقدار ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار در محلول‌های خروجی با استفاده از طیف‌سنج گاما انجام شد.

۳- نتیجه‌گیری و بحث

پس از انجام مراحل جداسازی نمونه‌ها، تجزیه‌ی محلول‌های حاوی ترکیبات ویتامین $B_{۱۲}$ (متیل کوبالامین و سیانوکوبالامین) به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که باکتری استرپتومایسس گریزئوس در محیط پایه قادر به تولید ترکیبات ویتامین $B_{۱۲}$ نمی‌باشد در صورتی که در محیط تخمیر حاوی بتایین و کولین به عنوان القاءکننده، میزان تولید ویتامین $B_{۱۲}$ به ترتیب ۲۳۵ و ۵۳۸ میکروگرم در لیتر بود (جدول ۲). نتایج جدول ۲ هم‌چنین نشان می‌دهد که بیشینه مقدار ویتامین $B_{۱۲}$ تولید شده در محیط تخمیر برابر ۱۴۵۶ میکروگرم در لیتر است که این در حضور ۵ میلی‌گرم در لیتر از پیش ماده‌ی ۵ و ۶ دی متیل بنزیمیدازول می‌باشد. کروماتوگرام HPLC ترکیبات ویتامین $B_{۱۲}$ (متیل کوبالامین و سیانوکوبالامین) تولید شده توسط باکتری در محیط پایه‌ی حاوی پیش ماده‌ی ۵ و ۶ دی متیل بنزیمیدازول به میزان ۵ میلی‌گرم در لیتر در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۲- میزان تولید ویتامین $B_{۱۲}$ توسط باکتری استرپتومایسس گریزئوس در محیط‌های تخمیر.

محیط تخمیر	مقدار کل متیل‌کوبالامین تولید شده (میکروگرم در لیتر)	مقدار کل سیانوکوبالامین تولید شده (میکروگرم در لیتر)	مقدار کل ویتامین $B_{۱۲}$ تولید شده (میکروگرم در لیتر)
محیط پایه	-	-	-
محیط پایه+ القاکننده‌ی بتایین	۱۴۹	۸۶	۲۳۵
محیط پایه+ القاکننده‌ی کولین	۴۵۲	۸۶	۵۳۸
محیط پایه+ پیش‌ماده‌ی ۵، ۶ دی‌متیل بنزیمیدازول	۱۰۶۷	۳۸۹	۱۴۵۶



شکل ۱- کروماتوگرام HPLC متیل کوبالامین و سیانوکوبالامین تولید شده توسط باکتری استرپتومایسس گریزئوس.

براساس اطلاعات جدول ۲، ترکیب محیط کشت در میزان تولید ویتامین $B_{۱۲}$ تأثیر به سزایی دارد به طوری که در شرایط هوازی، افزودن القاءکننده‌های بتایین و کولین، و پیش ماده‌ی ۵ و ۶ دی‌متیل بنزیمیدازول، هر کدام به طور جداگانه به محیط کشت، میزان تولید ویتامین $B_{۱۲}$ را نسبت به محیط پایه تا مقادیر، به ترتیب، تا ۲۳۵، ۵۳۸ و ۱۴۵۶ میکروگرم در لیتر افزایش می‌دهد. براساس اطلاعات جدول ۲، میزان تولید ویتامین $B_{۱۲}$ در محیط پایه به علاوه ۵ و ۶ متیل بنزیمیدازول به عنوان پیش ماده در مقایسه با محیط پایه به علاوه القاکننده‌ی بتایین یا کولین افزایش زیادی را نشان می‌دهد. لذا، در ادامه از محیط پایه به علاوه پیش‌ماده‌ی ۵ و ۶ دی‌متیل بنزیمیدازول برای تولید ویتامین استفاده شد. محیط کشت به کار رفته در این تحقیق در مقایسه با سایر محیط‌های تولید ویتامین $B_{۱۲}$ که توسط باکتری‌های اکتینومیست به کار رفته‌اند [۱۵ و ۱۶]، حاوی مواد آلی غنی و مواد معدنی مختلف بوده، و باکتری در این محیط رشد خوبی داشته است، در صورتی که باکتری در محیط‌های کشت ساده و حاوی منبع کربن گلوکز و سایر مواد معدنی [۱۵ و ۱۶] رشد مناسبی نداشته و توانایی تولید ویتامین $B_{۱۲}$ را ندارد. میزان تولید ویتامین $B_{۱۲}$ توسط گونه‌ی مورد نظر در محیط کشت به کار رفته (۱۴۵۶ میکروگرم در لیتر) در مقایسه با سایر باکتری‌های اکتینومیست تولید کننده‌ی ویتامین $B_{۱۲}$ در شرایط متفاوت، تقریباً یکسان می‌باشد [۱۵، ۱۶ و ۱۷].

براساس اطلاعات جدول ۳ بهترین محلول شستشوی ستون تثبیت ویتامین، به منظور واجذب آن به ترتیب اتانول و استن هستند و آب یون‌زدایی شده هیچ‌گونه تأثیری در واجذب ویتامین $B_{۱۲}$ ندارد.

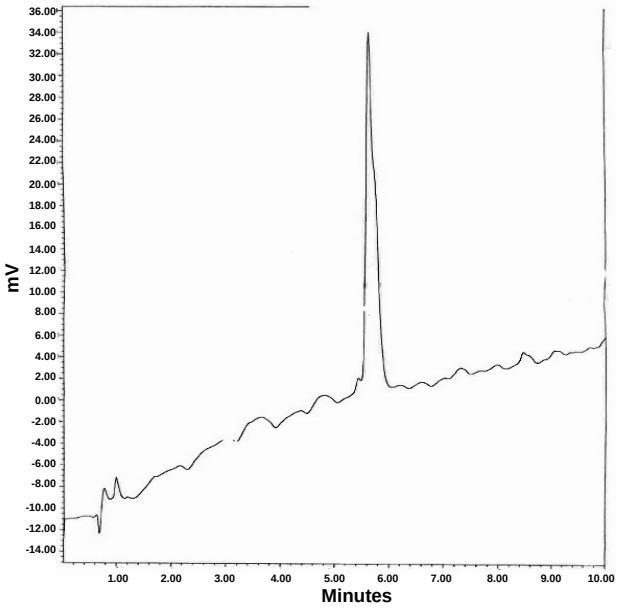
جدول ۳- واجذب متیل کوبالامین و سیانوکوبالامین از ستون محتوی رزین XAD-4 با استفاده از شوینده‌های مختلف.

محیط تخمیر	آب یون‌زدایی شده متیل-سیانو	اتانول متیل-سیانو	استن متیل-سیانو	مقدار کل متیل کوبالامین تولید شده (میکروگرم در لیتر)	مقدار کل سیانوکوبالامین تولید شده (میکروگرم در لیتر)
محیط پایه	- -	- -	- -	-	-
محیط پایه+ بتایین	- -	۱۴۹ ۸۶	- -	۱۴۹	۸۶
محیط پایه+ کولین	- -	۱۲۸ ۸۶	۳۲۴ -	۴۵۲	۸۶
محیط پایه+ ۵ و ۶ دی متیل‌بنزیمیدازول	- -	۴۶۹ ۲۱۶	۵۹۸ ۱۷۳	۱۰۶۷	۳۸۹

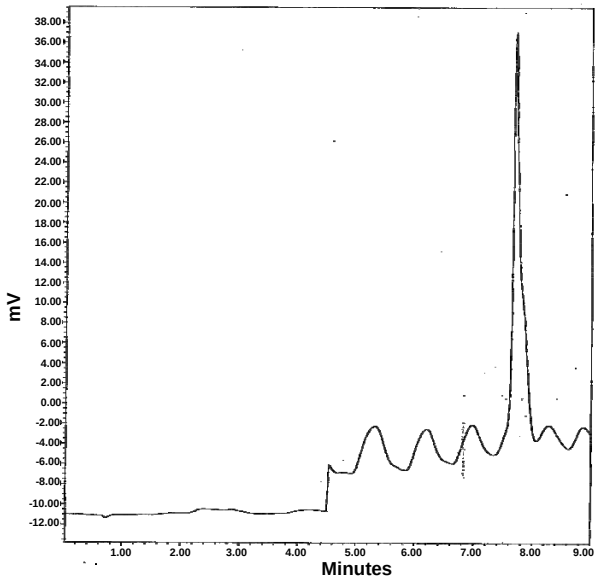
اندازه‌گیری‌های کروماتوگرافی لایه‌ی نازک با استفاده از حلال‌های مختلف-۲- پروپانول/ آمونیم هیدروکسید/آب به نسبت حجمی ۷:۱:۲ به عنوان حلال اول، ۱-بوتانول/۲- پروپانول/آب به نسبت حجمی ۱۰:۷:۱۰ به عنوان حلال دوم- انجام شد. براساس اطلاعات جدول ۴ مقادیر R_f برای سیانوکوبالامین و متیل کوبالامین تولید شده توسط باکتری مورد نظر در محیط تخمیر در شرایط بهینه با استفاده از حلال اول، به ترتیب، برابر با ۰٫۵۱ و ۰٫۵۳ است. این مقادیر در حلال دوم، به ترتیب، ۰٫۳۴ و ۰٫۴۷ می‌باشند. همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود نتایج به دست آمده، با نتایج نمونه‌های استاندارد متیل کوبالامین و سیانوکوبالامین در هر دو حلال به کار رفته یکسان هستند در صورتی که مقادیر R_f ترکیبات کاذب ویتامین $B_{۱۲}$ که در حلال اول و دوم، به ترتیب، ۰٫۱۴ و ۰٫۴۰ هستند با مقادیر R_f مربوط به ترکیبات استاندارد متیل کوبالامین و سیانوکوبالامین (در حلال اول و دوم، به ترتیب، برابر با ۰٫۵۳، ۰٫۴۷، ۰٫۵۱ و ۰٫۳۴) تفاوت دارند. در جدول ۴ زمان بازداری سیانوکوبالامین و متیل کوبالامین تولید شده توسط باکتری، با استفاده از دستگاه HPLC مشخص شده است. این مقادیر، به ترتیب، برابر با ۷٫۵ و ۵٫۸ دقیقه است که با مقادیر نمونه‌ی استاندارد مطابقت دارد. کروماتوگرام‌های HPLC متیل کوبالامین و سیانوکوبالامین استاندارد، به ترتیب، در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند.

جدول ۴- مقادیر R_f در TLC و R_t (زمان بازداری) در HPLC برای ترکیبات مختلف ویتامین $B_{۱۲}$.

	مقادیر R_f (TLC) حلال اول	مقادیر R_f (TLC) حلال دوم	زمان بازداری سیانوکوبالامین (دقیقه)	زمان بازداری متیل‌کوبالامین (دقیقه)	زمان بازداری ترکیبات کاذب ویتامین $B_{۱۲}$ (دقیقه)
متیل‌کوبالامین استاندارد	۰٫۵۳	۰٫۴۷	-	۵٫۸	-
سیانوکوبالامین استاندارد	۰٫۵۱	۰٫۳۴	۷٫۵	-	-
متیل‌کوبالامین جداسازی شده	۰٫۵۳	۰٫۴۷	-	۵٫۸	-
سیانوکوبالامین جداسازی شده	۰٫۵۱	۰٫۳۴	۷٫۵	-	-
ترکیبات کاذب ویتامین $B_{۱۲}$	۰٫۱۴	۰٫۴۰	-	-	۵٫۵



شکل ۲- کروماتوگرام HPLC نمونه‌ی استاندارد متیل کوبالامین.



شکل ۳- کروماتوگرام HPLC نمونه‌ی استاندارد سیانوکوبالامین.

پس از استخراج ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار شده با رادیوایزوتوپ کبالت-۵۷ و شستشوی ستون با حلال‌های مختلف آب، الکل (۲۵٪)، الکل و استن خالص و انجام اندازه‌گیری‌های طیف‌سنجی گاما مقایسه‌ای با محلول استاندارد ^{۱۵۲}Eu فعالیت ویتامین $B_{۱۲}$، به ترتیب، برابر ۵٫۷۵، ۰٫۷۹، ۶٫۹۰ و ۸٫۵۵ بکرل در میلی‌لیتر به دست آمد که با فعالیت ویژه‌ی کل ۲۱٫۹۹ بکرل در میلی‌لیتر مطابقت می‌کند. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد، که در صورت بهینه کردن محیط تخمیر و شرایط تولید ویتامین $B_{۱۲}$ و هم‌چنین استفاده از ایزوتوپ پرتوزای کبالت-۵۷ با فعالیت بالاتر به عنوان منبع کبالت در تولید ویتامین نشان‌دار می‌توان به مقادیر بیش‌تری از ویتامین $B_{۱۲}$ نشان‌دار دست یافت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری آقایان مهندس روزبهانی، روشن‌فرزاد و احمدی‌نیار تشکر و قدردانی می‌شود.

پی‌نوشت‌ها:

۱- Cyanocobalamin
۲- Cobalamin
۳- *Propionibacterium shermanii*
۴- *Pseudomonas denitrificans*
۵- Schilling
۶- Neoplastic
۷- Batch Fermentation
۸- Actinomycet
۹- *Streptomyces griseus*
۱۰- Casein Peptone
۱۱- Inducer
۱۲- Precursor
۱۳- High Performance Liquid Chromatography
۱۴- Thin Layer Chromatography

References:

1. E. Raux, H.L. Schubert, M.J. Warren, "Biosynthesis of cobalamin(vitamin B_{12}): a bacterial conundrum," Cell. Mol. Life Sci. 57, 1880-1893 (2000).

2. E.J. Vandamme, "Biotechnology of vitamins, pigments and growth factor," springer, 257-285 (1989).

3. Y. Piao, M. Yamashita, N. Kawaraichi, R. Asegawa, H. Ono, Y. Murooka, "Production of vitamin B_{12} in genetically engineered Propionibacterium freudenreichii," J. Biosci. Bioengin., Vol. 98, No. 3, 167-173 (2004).

4. J.H. Martens, H. Barg, M.J. Warren, "Microbial production of vitamin B_{12}," Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol. 58, No. 3, 275 (2001).

5. H.L. Bijil, "Production and use of compositions comprising high concentrations of vitamin B_{12} activity," U.S. patent, 6, 187-761, February 13 (2001).

6. E.H. Belcher, "Radioisotope in Medical diagnosis," Elsiver Press, 412-436 (1971).

7. D.A. Collins, H.P. Hogenkamp, "Radionuclide labeling of vitamin B_{12} and coenzymes thereof," U.S. patent, 5, 739-313 (1998).

8. I. Kojima, K. Komiya, H. Sato, Y. Oguchi, "Process for producing vitamin B_{12} by the fermentation technique and vitamin B_{12}-producing microorganism," U.S. patent, 4, 544-633 (1985).

9. F. Watanabe, S. Takenaka, H. Katsura, E. Miyamoto, K. Abe, Y. Tamura, T. Nakatsuka, Y. Nakano, "Characterization of a vitamin B_{12} compound in the edible purple laver porphyra yezoensis," Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 64, No. 12, 2712-2715 (2000).

10. S. Takenaka, et al, "Occurrence of coenzyme forms of vitamin B_{12} in a cultured purple laver (porphyra yezoensis)," Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 67, No. 11, 2480-2482 (2003).

11. H.M. Atta, "Production of vitamin B_{12} by Streptomyces fulvissimus," Egyptian J. Biomed. Sci. Vol. 23, 328 (2007).

12. L. Chaiet, C. Rosenblum, T.C. Woodbury, "Biosynthesis of radioactive vitamin B_{12} containing Cobalt^{60}," Sci.Vol. 111, 601 (1950).

13. J. Charlton, A.L. Hamilton, "Vitamin B_{12} cobalt-57 and process," U.S. patent, 4, 133-951 (1979).

14. E.L. Smith, D.J.D. Hockenhull, A.R.J. Quilter, "Biosynthesis of vitamin B_{12} labelled with ^{60}Co and ^{32}P," Biochem. J. 52(3), 384–387 (1952).

15. P.K. Maitra, S.C. ROY, "Trace elements and the synthesis of vitamin B_{12} by Streptomyces olivaceus," Biochem. J. 57-483 (1960).

16. H.H. Hall, R.G. Benedict, C.F. Wiesen, C.E. Smith, R.W. Jackson, "Studies on vitamin B_{12} production with Streptomyces olivaceus," Appl. Microbiol. 1(3): 124-9 (1953).

17. R. Qgultekin, M. Oner, "Production of vitamin B_{12} by fermentation," Mikrobiyol Bul, 19(4), 200-9 (1985).

18. M.D. Rockville, U.S. Phamacopeia/NF, Vol. 28-529 (2005).