مقاله تحقیقی

بررسی توانایی تولید ویتامین B_{12} توسط باسیلوس مگاتریوم PTCC1250 و بهینه‌سازی شرایط تولید

عباس اخوان سپهی [۱]، غزاله شجاعی باغینی [۲،*]، رمضانعلی خاوری نژاد [۲]، خسرو خواجه [۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
۳. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی، تهران، ایران

* **مسؤول مکاتبات:** غزاله شجاعی باغینی، تهران، خیابان شریعتی، خیابان خواجه عبدالله انصاری، خیابان ابوذر غفاری، کوچه کریمی یارندی، پلاک ۲، واحد ۴، تلفن همراه: ۰۹۱۲۳۸۶۴۵۳۷، پست الکترونیکی: ghazale.shojai@gmail.com

مکان انجام تحقیق: مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۲

چکیده

ویتامین B_{12} در پستانداران از عوامل خون‌ساز محسوب می‌شود و بر رشد میکروارگانیزم‌ها مؤثر است و برای درمان آنمی پرنیشیوز، عوارض عصبی و بیماری‌های مزمنی مانند آرتریت، پسوریازیس و نیز رفع خستگی و درد استفاده می‌شود. با توجه به اعمال بیولوژیک مهم این ویتامین، بهتر است تا کمبود آن از طریق غذا و دارو برای موجودات با عدم توانایی سنتز آن در بدن خود رفع گردد. هدف از این پژوهش تعیین توانایی *باسیلوس مگاتریوم* سویه PTCC1250 در تولید بیشتر ویتامین B_{12} به‌عنوان یک عامل پر اهمیت و ضروری با به‌کارگیری روش کروماتوگرافی و به‌دنبال آن بهینه‌سازی شرایط تولید این ویتامین توسط باکتری مذکور است. محیط سنتتیک تولید ویتامین حاوی گلوکز و شیرابه ذرت به‌عنوان منابع کربن و نیتروژن در جهت تولید ویتامین B_{12} مورد استفاده قرار گرفت و نیز استخراج این ویتامین توسط دو ماده به نام‌های بنزیل الکل و کلروفرم انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 توانایی تولید ویتامین B_{12} را داراست و حتی با تغییر منابع کربن و نیتروژن محیط‌های سنتتیک و دما، pH و دور شیکر مناسبی که جهت تولید ویتامین به‌کار می‌روند می‌توان میزان تولید را افزایش داد. بدین ترتیب که میزان تولید ویتامین B_{12} پس از تلقیح *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 در محیط حاوی ملاس، آب پنیر و شیره خرما به‌عنوان منابع کربن محیط سنتتیک، به‌ترتیب برابر با ۰/۲۰، ۰/۱۰۰، ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر و در محیط واجد اوره، عصاره مخمر و آمونیوم هپتامولیبدات به‌عنوان منابع نیتروژن مورد استفاده در محیط سنتتیک به‌ترتیب برابر با ۰/۲۲، ۰/۱۰۶، ۰/۱۶۲ میلی‌گرم در لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: ویتامین B_{12}، *باسیلوس مگاتریوم*، سیانوکوبالامین، استخراج، شرایط بهینه

مقدمه

با توجه به نخستین گزارش‌ها از سال ۱۹۴۸مبنی بر بدست آمدن ویتامین B_{12} از کبد، مایعات کشت میکروبی و نیز سنتز شیمیایی آن در سال ۱۹۷۳، امکان تهیه این ویتامین به روش‌های مختلفی فراهم شد (۱). پس از عصاره‌گیری ده‌ها کیلوگرم کبد و به‌کار بستن روش‌های پیچیده شیمیایی، تنها چند میلی‌گرم از این ویتامین حاصل شد و این خود، کاری بس پیچیده و پرهزینه بود. به لحاظ اقتصادی نیز به‌کارگیری روش‌های طولانی و پرهزینه شیمیایی، مقرون به‌صرفه نیست، لکن میکروارگانیزم‌های تولیدکننده این ویتامین به‌عنوان منبع مناسب در جهت تولید این ماده حیاتی به‌کار گرفته شد و به‌سرعت جایگزین کبد و سایر روش‌های پیچیده شیمیایی گردید (۲).

بررسی‌هایی که در واحدهای مختلف تحقیقاتی از سال ۱۹۴۸ روی میکروارگانیزم‌های تولیدکننده ویتامین B_{12} صورت گرفته است، جدایه‌هایی از جنس *سودوموناس و پروپیونی باکتریوم* و باکتری‌های دیگری نظیر *باسیلوس مگاتریوم، اکتینومایسس میکرومنوسپورا* برای تولید و تهیه این ویتامین معرفی کرده‌اند. B_{12} از حیاتی‌ترین مولکول‌های مطرح در علوم پایه و پزشکی است، توسط گیاهان و جانوران سنتز نمی‌شود (۳،۴،۵).

متیل‌کوبالامین و آدنوزیل‌کوبالامین، دو فرم اصلی کوآنزیم آن هستند (۶،۷).

پس از سال‌ها کار و تلاش، سرانجام پژوهشگران توانستند کلیه روش‌های شیمیایی تولید این ویتامین را که بالغ بر هفتاد مرحله بود، شناسایی کنند. از آنجایی‌که روش تولید شیمیایی، روش پیچیده و پرهزینه محسوب می‌گردد، به‌کارگیری روش‌های تخمیری و همچنین میکروارگانیزم‌ها در تولید این ویتامین، ارزش و اعتبار خاصی پیدا کرده است، طوری که سالانه مقدار زیادی از این ویتامین، توسط گونه‌های باکتریایی سنتز می‌شود. کمبود آن سبب کم‌خونی مگالوبلاستیک، گلوسیت، التهاب دهان، گیجی، زوال عقل، تپش قلب، توهم، اسهال و احساس لرزش دست و پا است، تحریک‌پذیری روده را کاهش می‌دهد و در کودکان، افزایش اشتها را به دنبال دارد و دستگاه عصبی را سالم نگه می‌دارد، به تنهایی قابلیت جذب ندارد و برای جذب، محتاج کلسیم است.

مهم‌ترین گونه‌های تولیدکننده این ویتامین را *Bacillus, Azotobacter, Propionibacterium* تشکیل می‌دهند. سنتزکوبالامین، به دو روش هوازی و بی‌هوازی می‌تواند انجام شود.

هدف اصلی در این پژوهش، بررسی توانایی تولید ویتامین B_{12} توسط باسیلوس مگاتریوم و تولید هر چه بیشتر این ویتامین با بهترکردن شرایط تولید به‌منظور به‌کارگیری در صنعت است.

مواد و روش‌ها

تهیه ویتامین B_{12}

ویتامین B_{12} (Art number: 24592) به‌صورت پودر قرمز رنگ در شیشه‌های ۱ گرمی پلمپ شده، از شرکت Merck خریداری شد. مقادیر متفاوتی از این ویتامین (0.001, 0.002, 0.1mg) در متانول خالص (Merck) حل شد و محلول‌های حاصل، به عنوان استاندارد جهت مقایسه با متابولیت ثانویه حاصل از باکتری فوق از طریق کروماتوگرافی مورد بررسی قرار گرفت (۸).

سویه باکتری مورد استفاده

باکتری مورد استفاده، *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 است که از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران دریافت شد. این باسیل به صورت آمپول لیوفیلیزه ارسال گردید. باکتری مذکور به محیط نوترین براث وارد شد و به

مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا احیا شود. سپس روی محیط LB، کشت خطی داده شد. قبل از انجام آزمایش ۱۲/۵ سی‌سی از سوسپانسیون باکتری *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 وارد محیط سنتتیک تولید ویتامین واجد گلوکز و شیرابه ذرت شد و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور شیکر ۲۰۰ rpm قرار گرفت (شایان ذکر است که محیط-های ذکرشده غیر از محیط سنتتیک تولید، همگی محصول شرکت Merck هستند).

تهیه محیط کشت سنتتیک در جهت فراهم آوردن شرایط تولید ویتامین B_{12} توسط *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250

محیط سنتتیک واجد گلوکز دهیدراته به‌عنوان منبع کربن (80g)، شیرابه ذرت (Corn Steep Liquor) (100 g) به‌عنوان منبع نیتروژن، آب دیونیزه و موادی چون KH_2PO_4 (1g)، $(NH_4)2HPO_4$, (2g) $MgSO_4.7H_2O$ (10mg), $FeSO_4.7H_2O$ (5g), $MnSO_4$. H2O (2.5mg) $CaCl_2$. 6H2O, (10mg) NaCl, (mg) $CoCl_2$. 6H2O (10mg) است. بعد از تهیه محیط و قبل از انجام اتوکلاو، pH با محلول HCl در حدود ۶ تنظیم شد. پس از انجام اتوکلاو، ۳۰۰ میلی‌لیتر از محیط سنتتیک تولید ویتامین به عنوان حجم کارکردی انتخاب گردید. باکتری *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 در این محیط سنتتیک، تلقیح و به شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور 200rpm انتقال داده شد. محیط سنتتیک حاوی باسیل مذکور، ۷۲ ساعت تحت شرایط ذکرشده قرار گرفت (۹).

استخراج ویتامین B_{12} از محیط سنتتیک واجد *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250

۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط تولید ویتامین به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور 10000 rpm سانتریفیوژ گردید و سلول‌های حاصل که به‌صورت رسوب نمایان است، دو مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و هر بار عمل سانتریفیوژ، با شرایط ذکرشده، تکرار گردید. سپس سلول‌های حاصل از سانتریفیوژ، به ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به اندازه (W/V) ۰/۵درصد به آن سیانید پتاسیم (KCN) اضافه گردید. در این مرحله pH با محلول HCl به حدود ۶ رسانده شد و سپس سلول‌های معلق در آب برای مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از آن، نمونه‌های سردشده با همان شرایط مذکور، سانتریفیوژ گردید و pH سوپرناتانت حاصل را با NaOH به ۱۰ رساندیم. ۳۰ دقیقه نمونه‌های حاصل به همان حال رها شد تا کلیه واکنش‌های لازم انجام گیرد. پس از آن (W/V) ۲۰ درصد به سولفات‌سدیم جامد اضافه شد و در نمونه به‌طور کامل حل گردید. pH با NaOH (7M) در حدود ۱۱/۵-۱۱ تنظیم شد و محلول آبی، سه مرتبه توسط ۱/۱۰ حجم بنزیل الکل استخراج شد. با استفاده از قیف دکانتور در هر سه مرتبه بنزیل الکل جدا گردید و سپس به ۱/۲ حجم کلروفرم به آن اضافه شد. در نهایت، محلول حاصل سه مرتبه توسط ۱/۱۰ حجم آب استخراج شد. بدین ترتیب، نمونه حاصل از استخراج، جمع‌آوری و در شرایطی به دور از نور و حرارت نگهداری گردید (۹).

تعیین مقدار ویتامین B_{12} تولیدشده توسط *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 با استفاده از HPLC

مواد حاصل از استخراج برای بررسی جهت تولید ویتامین B_{12} و تعیین مقدار آن تحت آنالیز توسط دستگاه HPLC قرار گرفت. ستونی از کروماتوگرافی که مورد بررسی تولید ویتامین قرار گرفت، RP-18 Column بود و Detector آن UV (371nm) در نظر گرفته شد. حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه حاصل از استخراج به دستگاه داده شد و طول موج روی 371nm تنظیم گردید. فاز متحرک مورد استفاده در این آنالیز شامل ۲۲ درصد متانول و ۷۸

درصد آب دیونیزه بود و جریان ورودی روی 0.8 ml/min تنظیم گردید.

جهت رسم نمودار کالیبراسیون، از سه غلظت متفاوت استاندارد (0.001, 0.002, 0.1 mg) استفاده گردید. ویتامین B_{12} مورد استفاده به‌عنوان استاندارد، تهیه شده از شرکت Merck است.

بهینه‌سازی شرایط تولید ویتامین B_{12} با تغییر منابع کربن و ازت، دما و pH محیط سنتتیک جهت بررسی مقدار تولید توسط *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250

در این پژوهش، ملاس، شیره خرما و آب‌پنیر، به‌عنوان منابع کربن، جایگزین گلوکز در محیط سنتتیک جهت تولید ویتامین شد و اوره، مخمر و آمونیوم هپتامولیبدات نیز به‌عنوان منابع نیتروژن جایگزین شیرابه ذرت شدند و هر کدام از این ۶ محیط تولید جدید، جهت تلقیح *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 آماده شد و پس از گذشت مراحل استخراج، جهت آنالیز تحت HPLC قرار گرفتند.

برای تعیین بهترین pH جهت تولید ویتامین B_{12} توسط *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 بعد از استخراج در pH حدود ۶، یکبار pH در حدود ۷ و بار دیگر در حدود ۸ تنظیم شد و پس از تلقیح باکتری و استخراج، جهت آنالیز مجددا HPLC شدند. دما بین ۳۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر از rpm ۳۵۰-۲۰۰ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی توانایی *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 در تولید ویتامین B_{12} با HPLC استاندارد مقایسه گردید و تولید این ویتامین توسط باسیلوس مذکور مورد تأیید قرار گرفت. ابتدا تولید این ویتامین در محیط تولید واجد گلوکز و شیرابه ذرت، مورد امتحان قرار گرفت و پس از تأیید حضور B_{12} با تغییر منابع کربن و نیتروژن، تصمیم به دستیابی به غلظت‌های بالاتری از ویتامین B_{12} گرفته شد. بدین ترتیب برای رسم نمودار کالیبراسیون، سه غلظت متفاوت از استاندارد به دستگاه داده شد. نتیجه کار، داشتن سه پیک در Retention Time: 14.00 شد. با رسم نمودار، معادله خطی به‌دست آمد که با استفاده از آن غلظت‌های ویتامین تولیدشده با توجه به هر یک از منابع تعیین گردید. بدین ترتیب در محیط سنتتیک واجد ملاس، آب‌پنیر و شیره خرما، غلظت تولید ویتامین به‌ترتیب برابر با۰/۰۰۱،۰/100،0/20میلی‌گرم در لیتر و در محیط‌های حاوی اوره، عصاره مخمر و آمونیوم هپتامولیبدات به‌عنوان منبع نیتروژن محیط به‌ترتیب برابر با ۰/۲۲، ۰/۱۰۶، ۰/۱۶۲ میلی‌گرم در لیتر گزارش گردید. البته ناگفته نماند تغییر pH محیط سنتتیک هم با تغییر غلظت همراه بود. به‌طوری که غلظت در pH=7 برابر با ۰/۰۱۲ میلی‌گرم در لیتر و در pH=8 برابر ۰/۰۱۵ میلی‌گرم در لیتر بود (جدول ۱).

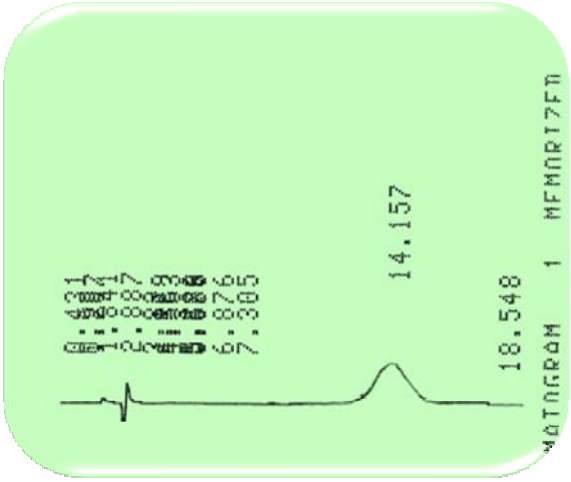
با مقایسه نتایج حاصل از پژوهش، می‌توان گفت که شرایط بهینه برای تولید هر چه بیشتر این ویتامین وقتی حاصل می‌شود که دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، دور شیکر 200 rev/min، pH در حدود ۶، ملاس به‌عنوان منبع کربن و اوره به‌عنوان منبع نیتروژن در نظر گرفته شود.

معادله خطی به‌دست آمد:

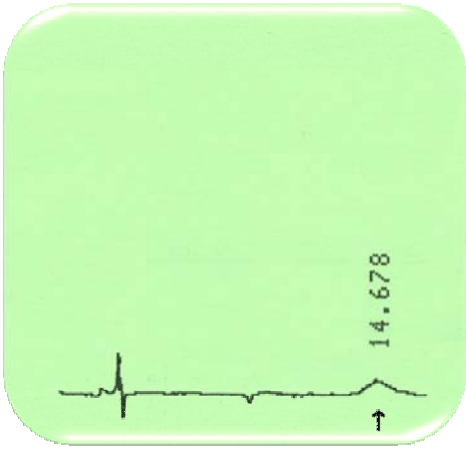
$$y = 2 \times 10^9 x + 3 \times 10^6$$

جدول۱ - غلظت‌های تولیدی ویتامین B_{12} با به‌کارگیری منابع مختلفی از کربن و نیتروژن توسط *باسیلوس مگاتریوم*.

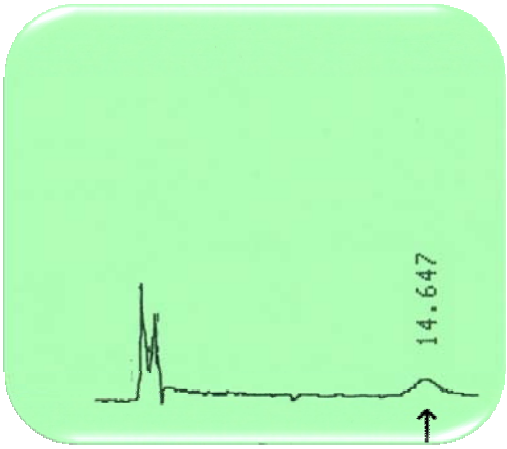
منابع متفاوت کربن	غلظت B_{12} تولیدی (mg)	منابع متفاوت نیتروژن	غلظت B_{12} تولیدی (mg)	تغییر pH	غلظت B_{12} تولیدی (mg)
ملاس	0/ 2۰	اوره	0/ 2۲	7	0/0۱۲
آب‌پنیر	0/۱۰۰	عصاره مخمر	0/۱۰۶	8	0/0۱۵
شیره خرما	0/00۱	آمونیوم هپتامولیبدات	0/۱۶۲	-------	--------



تصویر ۱- کروماتوگرام حاصل از HPLCاستاندارد.



B12 تولیدی



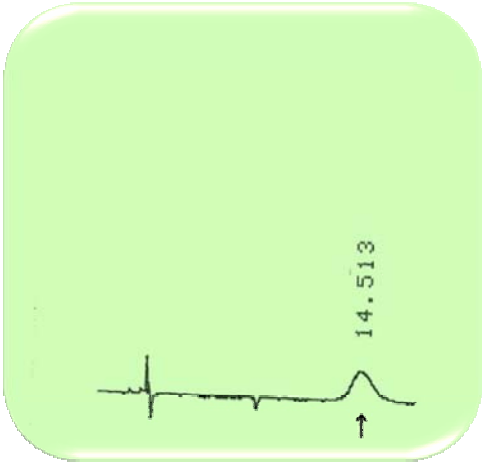
B12 تولیدی

تصویر ۲- کروماتوگرام حاصل از HPLC محیط واجد عصاره مخمر.

تصویر ۳- کروماتوگرام حاصل از HPLC محیط واجد آمونیوم هپتامولیبدات.

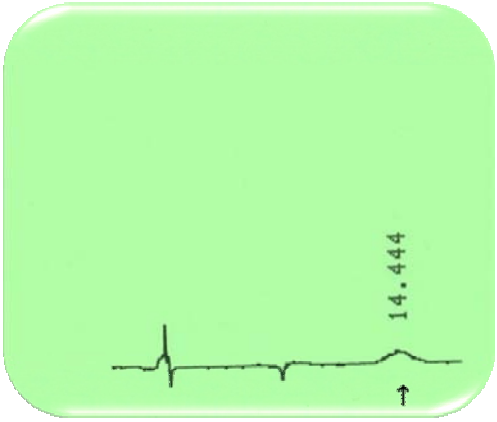
B12 تولیدی

تصویر ۴- کروماتوگرام حاصل از HPLCمحیط واجد ملاس.



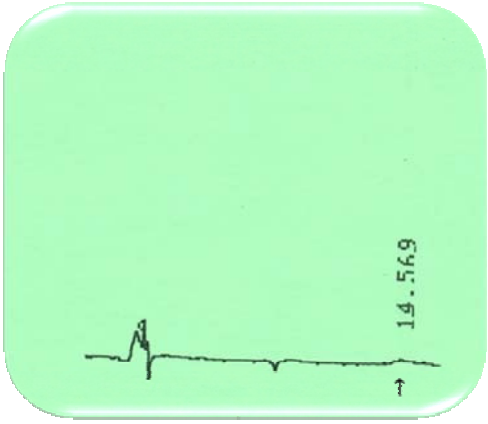
B12 تولیدی

تصویر ۵- کروماتوگرام حاصل از HPLC محیط واجد اوره.



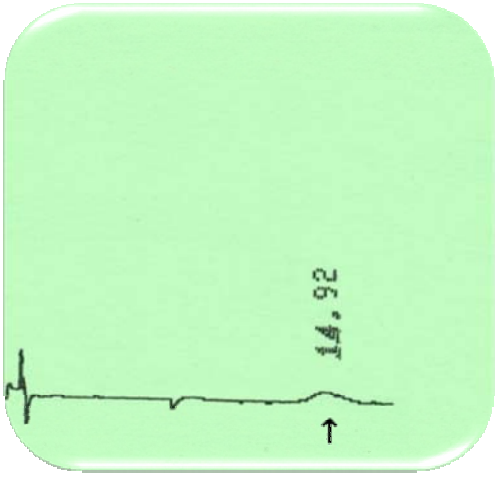
B12 تولیدی

تصویر ۶- کروماتوگرام حاصل از HPLCمحیط واجد آب پنیر.



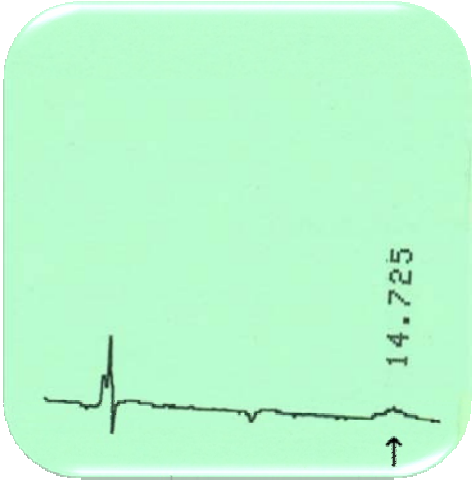
B12 تولیدی

تصویر ۷- کروماتوگرام حاصل از HPLCمحیط واجد شیره خرما.



B12 تولیدی

تصویر ۸- کروماتوگرام حاصل از HPLC محیط با pH:8.



B12 تولیدی

تصویر ۹- کروماتوگرام حاصل از HPLCمحیط با pH:7.

بحث

ویتامین B_{12} از ویتامین‌های مهم است و در ماهی، گوشت و لبنیات یافت شده و در حفظ سلامت، اهمیت بالایی دارد. این ویتامین که به «کوبالامین» نیز معروف است، از ویتامین‌های حل-شونده در آب است. ویتامین B_{12} از عوامل سازنده گلبول‌های قرمز و DNA است و در کارکرد سیستم عصبی نقش بسیار مهمی دارد (۱۰).

به‌نوعی می‌توان گفت که منبع واقعی ویتامین B_{12} میکروب‌ها بوده و حتی به‌نظر می‌رسد که تولید آن، صفت اختصاصی میکروارگانیزم‌ها است. به‌همین دلیل، کشت‌های میکروبی به‌عنوان منبعی برای تولید ویتامین B_{12}، محسوب و جایگزین عصاره کبد جهت مصارف درمانی گردیدند.

بررسی‌هایی که در واحدهای مختلف تحقیقاتی از سال‌های ۱۹۴۸ روی تولید میکروبی ویتامین B_{12} صورت گرفته است، همگی بر مناسب‌بودن کشت‌های میکروبی برای تهیه ویتامین B_{12} توافق نظر دارند و حتی به‌نظر می‌رسد تنها منبع عمده ویتامین B_{12} در طبیعت، فعالیت متابولیکی میکروارگانیزم‌ها بوده باشد .

در حالی که متجاوز از ۱۰۰ فرآیند تخمیری برای تولید ویتامین B_{12} شناخته شده است. در مقیاس تجارتی، تنها از چند فرآیند برای این منظور استفاده می‌شود که فرآیندهایی که در آن‌ها از جدایه‌های باسیلوس‌ها، سودوموناس و پروپیونی باکتریوم‌ها استفاده می‌شود، در اولویت است (۱۱).

در سال ۲۰۰۵، Gardner و همکارانش، تولید میکروبی کوبالامین‌ها با *Propionibacterium shermanii* را مورد بررسی قرار دادند و این تولید میکروبی با بررسی به‌عمل آمده در این پژوهش مطابقت می‌کند (۱۲).

شایان ذکر است که طی ۲۰ سال گذشته به‌دلیل پیچیدگی مراحل تخلیص، هزینه بالا و غلظت کم تولید فقط یک پروژه تحقیقاتی، آن هم در مقطع دکتری توسط حسن کاظمی‌فرد در ارتباط با این موضوع، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

در این پژوهش، *باسیلوس مگاتریوم* PTCC1250 به‌منظور بررسی توانایی‌اش در تولید ویتامین B_{12} مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی نتایج حاصل از این پروژه ثابت کرد که این باکتری توانایی تولید ویتامین مذکور را دارد، البته در بررسی انجام شده، مشخص گردید که این توان تولید حتی با به-

کار بردن منابع کربن و نیتروژن که به لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه است، پاسخ مناسب نشان می‌دهد.

این بررسی با نتایج بررسی‌های انجام‌شده در طی سال‌های اخیر روی سایر باکتری‌ها بویژه *باسیلوس‌ها* که برخی از آن‌ها توسط Gemaya و همکارانش ارزیابی شدند، همسویی دارد (۱۳).

این بررسی با پژوهشی که روی *Azotobacter* توسط Vandamme و همکارانش انجام شد و توانایی تولید ویتامین B_{12} اثبات گردید، همسویی دارد (۱۴).

بررسی‌های دیگری که Murooka و همکاران در مورد توانایی تولید ویتامین توسط *Propionibacterium freudenreichi* انجام دادند، نتایج این پروژه را تأیید می‌کند (۱۵).

در بررسی دیگری که روی *Pseudomonas denitrificans* صورت گرفت، مشخص شد که این باکتری نیز می‌تواند مقادیری از ویتامین مورد نظر را البته با به‌کارگیری روشی متفاوت تولید کند (۱۶).

در این بررسی جهت تأیید حضور ویتامین B_{12} از کروماتوگرافی مایع پیشرفته (HPLC) استفاده شد، زیرا بسیاری از روش‌هایی که برای بررسی حضور این ویتامین پیشنهاد شده بودند، به دلیل کمی غلظت ویتامین تولیدشده، قادر به تأیید حضور ویتامین نبودند و گاه حتی مقادیر کم تولید را نیز نشان نمی‌دادند. مثلاً یکی از روش‌های پیشنهادی استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) بود که نتیجه‌ای به‌همراه نداشت. کمی غلظت‌های تولیدی در حدی بود که حرکت لکه موردنظر در زیر نور UV مشاهده نمی‌شد و عدم حضور ویتامین گزارش شد و این در حالی بود که به‌کارگیری روش HPLC، حضور ویتامین را حتی در مقادیر بسیار کم مورد تأیید قرار داد .

در پژوهشی، Survase و همکارانش، به‌کارگیری روش‌های بیوتکنولوژی را در تولید ویتامین و تعیین مقدار آن، مفید و کارآمد دانستند و چنین کاربردی، با آنچه که در این پروژه تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفت، همسویی دارد (۱۷).

همان‌طور که در بخش نتایج مطرح شد، تغییر منابع کربن و نیتروژن مورد استفاده در محیط سنتتیک، در تولید ویتامین B_{12} توسط باکتری مذکور مؤثر است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان دریافت که با کاربرد ملاس به‌عنوان منبع کربن به جای گلوکز و کاربرد اوره به‌عنوان منبع نیتروژن به جای شیرابه ذرت تؤاما و تنظیم pH محیط سنتتیک قبل از تلقیح باکتری در حدود ۶، می‌توان درصد غلظت تولیدی این ویتامین را به مقدار قابل‌توجهی افزایش داد. باید توجه داشت که اصرار بر تغییر منابع کربن و نیتروژن و به‌کارگیری شرایط بهینه (pH، دما، دور شیکر) برای دست‌یابی به دو هدف صورت می‌گیرد:

۱. رسیدن به غلظت‌های بالاتری از ویتامین B_{12} حتی در مقادیر اندک.
۲. استفاده از منابعی که به لحاظ اقتصادی، مقرون به‌صرفه هستند و بتوان آن‌ها را جایگزین عوامل پرهزینه کرد و در صنعت به کار بست.

تقدیر و تشکر

از دست‌اندرکاران مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی و نیز دانشگاه تربیت مدرس جهت گردآوری این مکتوب نهایت سپاس را دارم.

منابع مورد استفاده

1. Eschenmoser, A., 1974. Organische Naturst of synthese heute, Vitamin B_{12} als Beispiel. Naturwissenschaften 61: 513–525.
2. Rickes, E. L., Brink, N. G., Koniuszy, F. R., Wood, T. R., Folkers, K., 1948. Comparative data on vitamin B_{12} from liver and from a new source. Science 108: 634–635.
3. Roth, J. R., Lawrence, J. G., Rubenfield, M., Dieffer-Higgins, S., Church, G. M., 1993. Characterization of the cobalamin (vitamin B_{12}) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium.* J Bacteriol 175: 3303–3316.
4. Florent, J., 1986. Vitamins. In: biotechnology, HJ Rehm and Reed, eds., 1st edition, vol. 4 pp. 119–158, Weinheim: VCH.
5. Ball, G. F. M., 1998. Vitamin B_{12} In: bioavailability and analysis of vitamins in Foods. London: Chapman & Hall, pp. 497–515.
6. Scheider, Z., Stroin˜ski, A., 1987. Biosynthesis of vitamin B_{12}. In: Schneider, Z., Stroinski, A., Eds. Comprehensive B12. Berlin: Walter de Gruyter, pp. 93–110.
7. Scott, J. M., Weir, D. G., 1994. Folate/vitamin B_{12} interrelationships. Essays in Biochemistry 28: 63–72.
8. Rudking, G. O., Taylor, R. J., 1952. Production of vitamin B_{12} in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii.* Anal Chem 24: 1155–1156.
9. Schmid-Meyer, C., Schroeder, G., Fuchter, A., Carvalho-Jona, F., Jonas, R., 1998. Production of *propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B_{12}. Biotechnology Techniques 12: 75–77.
10. Park, S., Johson, M. A., 2006. What is an adequate dose of oral vitamin B_{12} in older people with poor vitamin B_{12} status? Nutr Rev 64: 373–378.
11. Eggersdorfer, M., Elvers, B., Hawkinds, S., 1996. Vitamins. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Vol. 27, Weinheim, Germany, pp. 443–613.
12. Gardner, N., Champagne, C. P., 2005. Production of *propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B_{12}. Journal of Applied Microbiology 99: 1236–1245.
13. Gemaya, M., Burg, K., Perlman, D., 1977. Microbial production of vitamin B_{12} antimetabolites. III compound 102804 from *Bacillus Cereus.* The Journal of Antibiotics 12: 23-27.
14. Vandamme, J. E., 1992. Utilization of dairy waste for vitamin B_{12} fermentation. J Chem Tech Biotechnol 53: 313–327.
15. Murooka, Y., Piao, Y., Kiatpapanb, P., Yamashitaa, M., 2005. Production of vitamin B_{12} in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. Journal of Bioscience and Engineering 98: 167–173.
16. Martens, J. H., Barg, H., Warren, M. J., Jahn, D., 2002. Microbial production of vitamin B_{12}. Appl Microbiol Biotechnol 10: 275–285.
17. Survase, S. A. 2006. Production of vitamins. Biotechnol 44: 381–396.
18. Chanarin, I., 1979. The megaloblastic anaemias, 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
19. De Baets, S., Vandedrinck, S., Vandamme, E. J., 2000. Vitamins and related biofactors, microbial production. In: Lederberg J, ed. Encyclopedia of Microbiology, Vol 4, 2nd Ed. New York: Academic Press; 837-853.
20. Quesada-Chanto, A., Afschar, S., Wagner, F., 1994. Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. Appl Microbiol Biotechnol 42: 16–21.