

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vitamín B₁₂ v potravinách

Lea Šarková

Bakalářská práce

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lea Šarková**
Osobní číslo: **C15101**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Vitamín B₁₂ v potravinách**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Pomocí zahraniční/české odborné literatury (periodika) zpracujte přehled o chemických vlastnostech vitamínu B₁₂, jeho biochemických vlastnostech a výskytu v potravinách.
2. Zaměřte se na vliv technologie zpracování/úpravy potravin na jeho stabilitu.
3. Na závěr doporučte, které technologie jsou k vitamínu B₁₂ šetrné a které nikoliv.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

20. února 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

4. července 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 14.6.2018

Lea Šarková

Děkuji doc. Ing. Liboru Červenkovi, PhD. za cenné rady při vypracování této bakalářské práce.

ANOTACE

Práce pojednává o vitamínu B₁₂, věnuje se doporučenému a skutečnému příjmu, problémům a příčinám při jeho nedostatku v lidském organismu a také jeho různorodým zdrojům v potravě. Práce se zabývá také výrobou a biosyntézou tohoto vitamínu. Zaměřuje se na jeho stabilitu při tepelném zpracování různými technologiemi.

KLÍČOVÁ SLOVA

vitamín B₁₂, potrava, propionové bakterie, kulinární úpravy

TITLE

Vitamin B₁₂ in food.

ANNOTATION

The thesis is about vitamin B₁₂. It focuses on the recommended and actual income. It deals with problems and its lack in human's organism and also with the variety of sources in food. The thesis also deals with the production and biosynthesis of this vitamin. It focuses on its stability in a heat treatment by various culinary technologies.

KEYWORDS

Vitamin B₁₂, food, propionic bacteria, culinary

OBSAH

Úvod.....	10
1 Vitamín B ₁₂	11
1.1 Struktura a vlastnosti.....	11
1.2 Biologická aktivita	12
2 Příjem vitamínu B ₁₂	14
2.1 Doporučené hodnoty	14
2.2 Skutečný příjem	16
3 Zdroje vitamínu B ₁₂	17
3.1 Živočišné zdroje	17
3.2 Rostlinné zdroje	19
3.3 Mikrobiální zdroje.....	19
3.4 Potravinové doplňky	19
4 Funkce a projevy nedostatku vitamínu B ₁₂ v lidském těle.....	20
4.1 Příčiny nedostatku	20
4.2 Projevy nedostatku	21
5 Výroba	25
5.1 Biosyntéza	26
5.2 Průmyslová výroba.....	27
5.3 Geneticky modifikované organismy pro výrobu vitamínu B ₁₂	29
5.4 Stanovení koncentrace vitamínu B ₁₂	31
5.4.1 Mikrobiologické stanovení vitamínu B ₁₂	31
6 Změny obsahu v důsledku tepelných úprav.....	32
6.1 Kulinární metoda sous-vide	32
6.2 Hovězí maso.....	33
6.3 Ryby a výrobky z nich	34
6.4 Masné výrobky.....	36
6.5 Mléko a mléčné výrobky.....	37
7 Závěr	38
8 Seznam použité literatury	39

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - struktura molekuly kobalaminu [14].....	12
Tabulka 1 - Doporučený příjem vitamínu B ₁₂ [2; 6].....	14
Tabulka 2 - Obsah korinoidů v některých potravinách [6].....	18
Tabulka 3 - Důsledky a příznaky nedostatku vitamínu B ₁₂ nebo stavu s jeho nízkým obsahem v těle.....	23
Tabulka 4 - Produkce vitamínu B ₁₂ vybranými kmeny rodu Propionibacterium [4]	29
Tabulka 5 - Naměřené hodnoty v hovězím mase [10].....	34
Tabulka 6 - Naměřené hodnoty v rybím mase.....	35
Tabulka 7 - Naměřené hodnoty v masných výrobcích [104].....	36

SEZNAM ZKRATEK

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
DMBI	5,6–dimethylbenzimidazol
GRAS	Generally Recognized As Safe
MMA	kyselina methylmalonová
SPE	extrakce pevnou fází
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHT	Ultra-High Temperature
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast záření

ÚVOD

Maso a živočišné produkty jsou důležitým zdrojem bílkovin, ale hlavně obsahují minerální látky a vitamíny. V masu se vyskytují vitamíny A, D, E, K, B₁, B₂, B₅, B₆ a B₁₂. Právě vitamín B₁₂ bývá často diskutovaným, a velice důležitým vitamínem pro lidský organismus. Jeho nedostatek může mít fatální následky na lidské zdraví a jedním z nejčastějších projevů nedostatku vitamínu B₁₂ je chudokrevnost. V posledních letech se intenzivně rozvinul trend vegetariánství a veganství, což má za následek snahu obohatit potraviny rostlinného původu o vitamíny, které se v nich běžně nevyskytují, jako je právě vitamín B₁₂.

Možným rizikem znehodnocení vitamínů u potravin živočišného původu je velmi často tepelná úprava před jejich konzumací pro zamezení mikrobiální kontaminace a zajištění lepší stravitelnosti. Otázkou je, jak moc tepelné zpracování ovlivňuje přítomné vitamíny a jejich obsah.

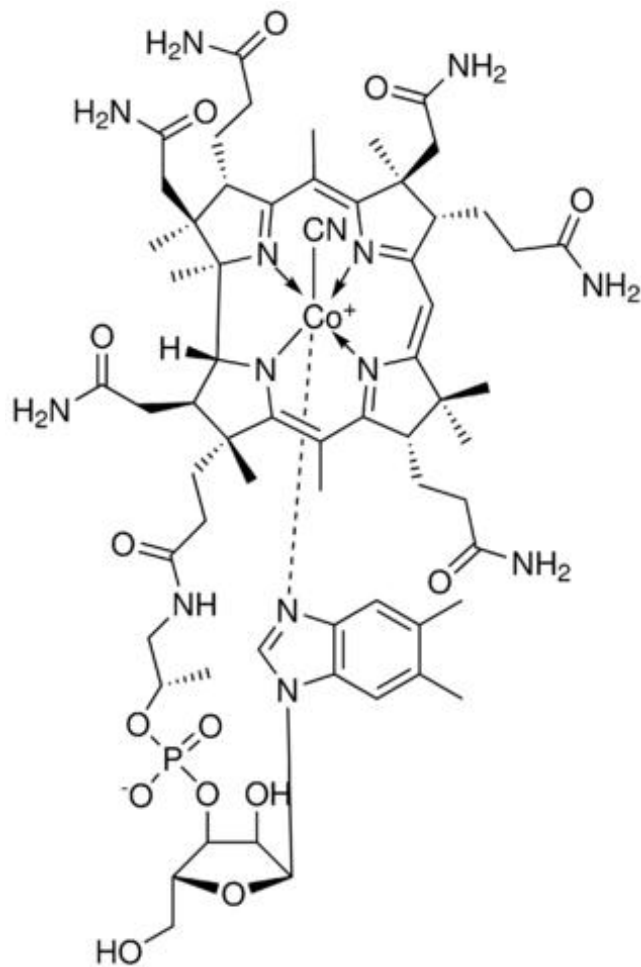
Při stanovení vlivu tepelných úprav na vitamíny B-skupiny se nejčastěji stanovují vitamíny B₁, B₂, B₆ a informace o vitamínu B₁₂ jsou méně časté. Důvodem je zřejmě obtížnější metoda stanovení. Z důvodu omezeného množství informací je náročné zjistit, která z metod tepelné úpravy masa je pro vitamín B₁₂ šetrnější.

1 VITAMÍN B₁₂

1.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI

Vitamín B₁₂ je jeden z osmi vitamínů patřících do B skupiny [1]. Jako vitamín B₁₂ je označován souhrn sloučenin, které mají v centru jádra podobného porfyriu jeden atom kobaltu [2-5]. Mají nejsložitější strukturu ze všech vitamínů a základem je korinový cyklus, což je částečně hydrogenovaná téměř planární pyrrolová struktura, která připomíná porfyrinový cyklus hemových barviv a chlorofylů, díky tomu se těmto sloučeninám přezdívá korinoidy [3; 4; 6-10]. Struktura molekuly kobalaminu je vyobrazena na Obrázku 1. Jeho molekulová hmotnost je 1355,4 g/mol, je stabilní ve vodném roztoku v rozmezí pH 4–7 až do teploty 120 °C bez významných ztrát [7; 11] a patří mezi vitamíny rozpustné ve vodě. Substituenty ve struktuře jsou většinou methylové skupiny a amidové zbytky (4 molekuly propionamidu a 3 molekuly acetamidu) [3; 6]. Propionamidové zbytky mají α -orientaci a acetamidové β -orientaci. Již zmíněný atom kobaltu tvoří až 6 koordinačních vazeb s ligandy. Je koordinován na všechny čtyři atomy dusíku pyrrolových jader, pátou koordinační vazbou je vázán na druhý atom dusíku 5,6-dimethylbenzimidazolu [4-7] v takzvané α -poloze, avšak ne u všech korinoidů je tato poloha obsazena. Právě 5,6-dimethylbenzimidazol je zodpovědný za pozitivní vliv na organismus člověka [4; 7; 12]. Pokud poloha obsazena je, jedná se o kobalaminy [4; 6]. Korinoidy nesoucí jinou bázi na páté poloze než 5,6-dimethylbenzimidazol jako nižší ligand se v přírodě také vyskytují a jsou syntetizovány primárně určitými bakteriemi [2; 6]. Šestou koordinační vazbou v β -poloze mohou být vázány různé skupiny či sloučeniny, nebo nemusí být poloha vůbec obsazena [4; 6]. Pokud je tato poloha obsazena jiným substituentem, jako například adeninem, jedná se o tzv. Pseudovitamín B₁₂, který je aktivní pouze u bakterií [4; 13]. Dalším ligandem může být hydroxylová skupina (vitamín B_{12a} neboli hydroxykobalamin) a voda (akvakobalamin).

Syntetický vitamín kobalamin, který se používá ve farmaceutických přípravcích, obsahuje jako ligand kyanidový anion. Kyanokobalamin může v organismu vznikat při otravě kyanidy. V závislosti na reakčních podmínkách se může vázat např. také siřičitanový anion v sulfitokobalaminu [6].



Obrázek 1 - struktura molekuly kobalaminu [14]

1.2 BIOLOGICKÁ AKTIVITA

Gastrointestinální absorpce vitamínu B₁₂ ze stravy je u člověka komplexní proces [7]. Po perorálním přijetí kobalaminu, který se uvolnil z bílkovin v potravíně, je vytvořen komplex s glykoproteinem zvaným haptokorrin, vzniklým v buňkách žaludeční sliznice. Po proteolýze vzniklého komplexu pankreatickými proteázami ve dvanáctníku se znovu uvolněný vitamín B₁₂ váže na vnitřní neboli gastrický faktor. Takto vytvořený komplex vnitřního faktoru a vitamínu může vstupovat do buněk sliznice tenkého střeva endocytózou, kterou zprostředkovávají receptory [2; 6; 7].

Kobalamin obsažený v potravinách, lécích či doplňcích stravy je v organismu dále přeměňován na aktivní koenzymové formy 5'-deoxyadenosylkobalamin a methylkobalamin [1; 6; 7; 10].

Tyto koenzymy zodpovídají jak za intramolekulární přeskupování alkylových skupin (adenosylkobalamin) při odbourávání mastných kyselin s lichým počtem uhlíků [2; 6; 7] a rozvětveným řetězcem, tak i za přenos methylových skupin (methylkobalamin) [2; 6]. Jednoduše řečeno, katalytická aktivita vitamínu souvisí s přenosem jednouhlíkatých zbytků, štěpením vazeb C-O a C-C. [6] Další dvě biologicky aktivní sloučeniny, jsou hydroxykobalamin a kyanokobalamin [10]. V potravinách se přirozeně vyskytují 5'-deoxyadenosylkobalamin, methylkobalamin a hydroxykobalamin [8-10].

Role vitamínu B₁₂ v buněčném metabolismu je úzce spjata s folátem, neboli kyselinou listovou [1; 15; 16]. Tyto dvě sloučeniny jsou důležité pro methionin syntázovou reakci, kdy se methylová skupina převádí z methyltetrahydrofolátu (také známý jako kyselina levomefolová) na homocystein, kdy methylkobalamin působí jako koenzym a vzniká methionin [1; 7; 15; 16]. Výsledný H₄-folát se poté zpřístupní tvorbě methylen-H₄-folátu, což je forma, potřebná pro syntézu thymidinu, který je dále důležitý při replikaci a opravě DNA [1; 15; 16].

Vitamín B₁₂ se podílí také na konverzi methylmalonyl-CoA (kyselina methylmalonová navázaná na koenzym A) na sukcinyl-CoA pomocí enzymu methylmalonyl-CoA mutasy, kdy adenosylkobalamin působí jako kofaktor. Sukcinyl-CoA je hlavním prostředkem cyklu trikarboxylové kyseliny. Při nedostatku vitamínu B₁₂ dochází k akumulaci substrátů obou reakcí, závislých na přísunu tohoto vitamínu. Tento stav vede ke zvýšení hladin methylmalonové kyseliny a homocysteinu v plazmě [1; 17; 18].

2 PŘÍJEM VITAMÍNU B₁₂

2.1 DOPORUČENÉ HODNOTY

Požadavky na příjem vitamínu B₁₂ se samozřejmě liší v závislosti na věku a fyziologickém stavu jako je například těhotenství [1; 2; 6], což je názorně vidět v Tabulce 1. Doporučená denní dávka vitamínu B₁₂ se posuzuje podle měření koncentrace vitamínu B₁₂ v plazmě a hematologických parametrů [2; 4; 6].

Tabulka 1 - Doporučený příjem vitamínu B₁₂ [2; 6]

Věk	Vitamín B ₁₂		
	μg/den	μg/MJ* (nutriční hustota)	
		muži	ženy
Kojenci			
0–3 měsíců**	0,4	0,2	0,21
4–11 měsíců	0,8	0,27	0,28
Děti			
1–3 roky	1	0,21	0,23
4–6 let	1,5	0,23	0,26
7–9 let	1,8	0,22	0,25
10–12 let	2	0,21	0,24
13–14 let	3	0,27	0,32
Dospívající a dospělí			
15–18 let	3	0,28	0,35
19–24 let	3	0,28	0,37
25–50 let	3	0,29	0,38
51–64 let	3	0,33	0,41
≥65 let	3	0,36	0,43
Těhotné***	3,5		0,38
Kojící****	4		0,37

*- Vypočtená hodnota pro dospívající a dospělé s převážně sedavou činností (hodnota PAL 1,4)

** - Odhadovaná hodnota

***- Důležité pro doplnění zásob a udržení nutriční denzity

****- Zvýšení asi o 0,13 µg vitamínu B₁₂ na 100 g mateřského mléka [2]

Lidé konzumující velké množství živočišných produktů nebo užívající doplňky stravy nemají problém splnit doporučenou denní dávku 3 µg [1; 2; 6], některé zdroje uvádějí 2–3 µg nebo i více, ale za obecnou hodnotu považujeme 2–3 µg denně [1].

V těhotenství a době kojení je důležité změnit přísun vitamínu B₁₂ tak, aby byl snadno dosažitelný také pro plod a kojence. Vzhledem k tomu, že během těhotenství dochází k hlubokým fyziologickým a anatomickým změnám, které se vyskytují prakticky ve všech orgánech, nelze používat referenční hodnoty stanovené u netěhotných žen [1; 19]. Změna stavu ženy se projeví poklesem obsahu biochemických markerů (holotranskobalamin, kyselina methylmalonová nebo homocystein). Celková hladina vitamínu B₁₂ během těhotenství klesá [1; 19; 20; 21], zatímco hodnota holotranskobalaminu zůstává relativně stabilní nebo jen lehce poklesne [1]. Co se týče homocysteinu nebo kyseliny methylmalonové, jejich hladina stoupá převážně během druhého trimestru [1].

Během těhotenství plod obdrží 0,1–0,2 µg denně, což je celkem zhruba 50 µg vitamínu B₁₂ za celou dobu těhotenství [4; 6]. U matky tedy dochází k poklesu koncentrace vitamínu B₁₂, proto je doporučována zvýšená dávka o 0,5 µg denně, avšak pouze jako preventivní opatření před nezjištěným snížením zásob vitamínu B₁₂ a také pro udržení vysoké nutriční hodnoty. To stejné platí v období laktace, kdy je doporučováno zvýšit dávku vitamínu B₁₂ o 1 µg denně [1; 4; 6; 15].

Doporučovaná dávka pro malé kojence je odhadována na 0,4 µg denně podle zaokrouhlené hodnoty vitamínu B₁₂ v mateřském mléce. Díky rozdělení příjmu potravy na 4–6 dávek denně je kojenec schopen dobře přijmout a vstřebat vitamín B₁₂, proto je také jeho denní dávka menší než u dospělých. U starších kojenců už se doporučovaná denní dávka zvyšuje s přihlédnutím ke zvyšování tělesné hmotnosti [2].

U dětí od 1 roku a dospívajících dochází k rychlému růstu a potřeba vitamínu B₁₂ je tak mnohem vyšší [1; 22; 23]. Nižší příjem vitamínu B₁₂ z mateřského mléka, prodloužené kojení a nedostatečný příjem živočišné stravy jsou rizikové faktory pro nedostatek tohoto vitamínu. Během prvních měsíců života se hladina vitamínu B₁₂ snižuje, zatímco homocystein a kyselina methylmalonová se zvyšují. Hlavní rozdíl těchto hladin byl zjištěn u kojených dětí ve věku

4 – 6 měsíců [1; 23; 24; 25]. Po 6. měsíci věku se hladiny B₁₂ zvyšují a maxima dosahují během 3. a 7. roku života, v období dospívání dochází opět k poklesu. Koncentrace homocysteinu v plazmě se snižuje na hodnotu <6 μmol/l, a to až do zmíněného věku 7 let, kdy se poté opět zvyšuje. Střední hladina kyseliny methylmalonové v plazmě se po 6. měsíci věku snižuje a zůstává po celou dobu dětství nízká, a to v koncentraci <0,26 μmol/l [1; 23]. Během prvních dvou let života můžeme podle hladiny homocysteinu usuzovat stav obsahu vitamínu B₁₂, u starších dětí a dospělých už to nelze, jelikož stav homocysteinu spíše odráží obsah folátu [1; 23].

U kojenců je hladina kyseliny methylmalonové nepřímo spojená s hladinou vitamínu B₁₂, ale koncentrace kyseliny methylmalonové je relativně vysoká po celou dobu distribuce vitamínu B₁₂, oproti starším dětem. Vyšší hladina kyseliny methylmalonové může být způsobena střevní absorpcí propionátu a dalších prekurzorů této kyseliny, které jsou produkovány intestinálními bakteriemi, nebo rozkladem mastných kyselin s lichým řetězcem, které jsou přijímány z mateřského mléka [1; 23; 26]. Hladina vitamínu B₁₂ u kojenců, dětí a dospívajících je silně závislá na původu jedince a jeho rodinných poměrech, zahrnujeme zde socioekonomické faktory, stravovací návyky, hygienu, náboženské a kulturní praktiky [1; 27].

2.2 SKUTEČNÝ PŘÍJEM

Denně je obvykle přijímáno 3-31 μg vitamínu B₁₂ a je absorbován z 20–70 %, deficiencie se tedy dá považovat za vzácnou vyjma striktních vegetariánů a veganů [1; 6; 7; 13; 15], jejichž denní příjem vitamínu B₁₂ je pouze 0–0,25 μg [1; 28], nebo lidí žijících v rozvojových zemích, kde je snížená konzumace živočišných výrobků nedobrovolná [1; 7; 13; 29], vzhledem ke kulturním, náboženským, osobním nebo finančním důvodům [1; 7; 30]. V rozvojových zemích bývají také problémem gastrointestinální infekce a nákazy [1; 31]. Za normálních podmínek se metabolickou dráhou v organismu přemění ze zásob (především v játrech) 2–5 mg vitamínu B₁₂ denně. Je důležité, aby si organismus vytvořil dostatečné zásoby vitamínu B₁₂, jelikož se jeho nedostatek nebo porucha vstřebávání projeví klinickými příznaky až po letech [2].

3 ZDROJE VITAMÍNU B₁₂

Více než dvě třetiny celkového příjmu vitamínu B₁₂ jsou přijaty během hlavního jídla, ze smíšené stravy se absorbuje průměrně 50 %, u starších lidí je toto číslo ještě menší. Proto je třeba přijmout celkovou doporučenou denní dávku, aby byla pokryta spotřeba včetně ztrát způsobených neabsorbovaným vitamínem B₁₂. Nadměrný příjem vitamínu B₁₂ tedy člověku neškodí [6].

Lidský organismus je plně závislý na příjmu vitamínu B₁₂ z potravy i přes to, že je tvořen střevními bakteriemi v tlustém střevu, a to ve velkém množství [1; 2].

3.1 ŽIVOČIŠNÉ ZDROJE

Nejvýznamnějším zdrojem vitamínu B₁₂ jsou játra, dále pak maso, ryby, vejce, sýry a mléko [1; 2; 4; 7; 13; 32]. Zvýšený výskyt je pak v mase přežvýkavců [2; 4]. Najít ho můžeme také v mořských řasách nebo korýších a měkkýších [4; 7; 32]. Mezi jedny z nejčastěji produkovaných řas a sinic potravinářskými a farmaceutickými podniky na světě pro výrobu potravinových doplňků obsahujících vitamín B₁₂ patří rody *Spirulina*, *Aphanizomenon* a *Nostoc* [7; 33]. Výzkumy ovšem prokázaly znatelnou přítomnost neaktivní formy vitamínu B₁₂ pomocí chemiluminiscenční metody (až 17%) a proto se tento druh potravinových doplňků nedoporučuje u rizikových skupin jako jediný nástroj pro doplnění tohoto vitamínu v těle, jedná se o vegetariány, vegany nebo starší lidi [7; 34]. U mořských korýšů a měkkýšů je tomu podobně, jako u mořských řas nebo sinic. Obsah vitamínu B₁₂ byl stanoven mikrobiologickou metodou u některých nejpopulárnějších živočichů jako jsou ústřice nebo slávky, tato metoda poskytuje hodnoty několikanásobně větší než chemiluminiscenční metoda, avšak ukazuje pouze celkovou hodnotu vitamínu B₁₂ bez rozdělení na účinnou a neúčinnou formu [7; 35]. Pomocí vícestupňové hmotnostní analýzy se však ukázalo, že vzorky obsahovaly podstatné množství neaktivní formy vitamínu B₁₂ [7; 36]. Proto nelze ani tento zdroj vitamínu B₁₂ považovat za adekvátní [7].

Biologická dostupnost z mléka je lepší než u jiných živočišných zdrojů [1; 22]. Při srovnání kravského a mateřského mléka je vitamín B₁₂ snadno dostupnější z mléka kravského, což může částečně souviset s tím, že je v kravském mléku koncentrace vitamínu B₁₂ vyšší [1; 37]. V mléku je hlavním vitamínem adenosylkobalamin a methylkobalamin [6]. Transkobalamin obsažený v kravském mléce, který je dále přeměňován na již zmíněný methylkobalamin

a adenosylkobalamin, podporuje intestinální buněčnou absorpci [1; 38]. Možnost, že transkobalamin nebo jiné faktory v mléce obsažené mohou zvýšit absorpci vitamínu B₁₂, by mohly mít důsledky jak pro prevenci, tak pro léčbu deficitu vitamínu B₁₂ [1]. Navíc pokud při výrobě zakysaných mléčných výrobků použijeme kulturu *Propionibacterium shermanii*, tak obsah vitamínu vzroste až třicetinásobně [6]. V sýrech a vaječném žloutku se vitamín B₁₂ vyskytuje ve formě methylkobalaminu [6].

Doporučený denní příjem pokrývá ze 70 % maso a výrobky z něj, dále také mléko a mléčné výrobky (20 %), vejce (9 %) a cereální výrobky (asi 2 % což je zanedbatelné množství) [6]. Do tkání býložravců se vitamín B₁₂ produkovaný intestinálními bakteriemi dostane absorpcí. U ostatních živočichů je tato absorpce nižší a vitamín se získává z potravy živočišného původu nebo z potravy kontaminované bakteriemi produkujícími tento vitamín [6].

Tabulka 2 - Obsah korinoidů v některých potravinách [6]

Potravina	µg/kg v jedlém podílu
Vepřové maso	6–10
Hovězí maso	20
Kuřecí maso	5
Vepřová játra	500–1220
Ryby	13–28 [6] nebo až 89 [7]
Mléko	3 [6] – 38 [6; 7]
Sýry	6–17
Vejce	7 [6] – 13 [7]
Mořští korýši	524 [7]
Sušené mořské řasy (Porphyra, Chlorella)	770 – 2000 [7]

Z Tabulky 2 je patrné, že maso obsahuje 5–20 µg/kg korinoidů zatímco játra obsahují vitamínu mnohonásobně více (ledviny obsahují >200 µg/kg) [6]. Mořští korýši a řasy mají hodnoty obsahu korinoidů nejvyšší, ale jak již bylo popsáno výše, nejedná se z velké většiny o aktivní formu vitamínu B₁₂.

3.2 ROSTLINNÉ ZDROJE

Potraviny rostlinného původu nejsou vhodným hlavním zdrojem vitamínu B₁₂ a obsahují jeho stopy, pokud byly zpracovány bakteriálním kvašením. Jedná se například o mléčné kvašení při výrobě kysaného zelí, kdy se používají buď propionové bakterie [7; 39], nebo kvasinky rodu *Candida subtilis* [2; 6; 13]. Malé množství vitamínu B₁₂ bylo nalezeno také v luštěninách [6]. Co se týče čerstvé zeleniny, stopové množství (<0,1 µg/100 g) se vyskytuje v brokolici, chřestu nebo mungo klíčcích [7]. Při šetrné přípravě je hodnota ztrát vitamínu B₁₂ cca 12 % [2].

3.3 MIKROBIÁLNÍ ZDROJE

Určité organismy v trávicím traktu jsou schopny vytvořit vitamín B₁₂ [2-4; 32]. Mikrobiální střevní mikroflóra je velice různorodá, rody jako *Klebsiella* nebo *Pseudomonas* jsou poskytovatelé vitamínu B₁₂, jiné druhy mikroorganismů mohou vitamín transformovat na jiné korinoidy, zatímco většina patří mezi jeho spotřebitele [1; 40].

3.4 POTRAVINOVÉ DOPLŇKY

Vitamín B₁₂ můžeme nalézt také v multivitaminových a minerálních doplňcích [7; 41], kde může degradovat vlivem přidaného většího množství vitamínu C a mědi [7; 42]. Samotný vitamín C ani měď nedegradují vitamín B₁₂, ale pouze jejich kombinace, což dokázal výzkum potvrzený tenkovrstvou chromatografií [7; 42]. Taktéž bylo dokázáno, že některé z produktů této degradace blokují metabolismus vitamínu B₁₂ v buňkách savců [7; 41]. Degradace vitamínu B₁₂ vlivem vitamínu C a mědi byla výrazně potlačena přidáním určitých antioxidantů, jako je karnosin nebo anserin [7; 42].

4 FUNKCE A PROJEVY NEDOSTATKU VITAMÍNU B₁₂ V LIDSKÉM TĚLE

Vitamín B₁₂ je pro tělo nezbytný pro správnou funkci tvorby červených krvinek v kostní dřeni, tento děj nazýváme erytropoéza [4].

4.1 PŘÍČINY NEDOSTATKU

K deficitu může docházet při snížené produkci vnitřního faktoru, potřebného k absorpci vitamínu B₁₂ (a který je známý také jako žaludeční intrinzní faktor) [1; 15]. Dochází k tomu po resekci žaludku nebo po chronickém zánětu žaludeční sliznice, kdy už se vnitřní faktor netvoří a onemocnění také způsobí poškození buněk, tvořících žaludeční kyseliny [1; 7; 43]. Problémem mohou být také těžké zánětlivé změny v distálním ileu, které zabrání resorpci komplexu vitamínu B₁₂ s vnitřním faktorem [1; 2; 6].

S nedostatkem vitamínu B₁₂ se spojuje také zhoršená degradace bílkovin. Rozštěpení bílkovin, pocházejících z potravy a haptokorinu, který pochází ze slin a žluči, je nezbytné pro přenos vitamínu B₁₂ do vnitřního faktoru ve dvanáctníku. Haptokorin je protein vázající B₁₂ a je přítomný v mnoha tělesných tekutinách a chrání ho při průchodu kyselým prostředím žaludku. Pokud dochází ke snížené sekreci žaludečních kyselin spojené s chronickou gastritidou, nebo pokud dlouhodobá léčba inhibitory protonové pumpy zhoršuje uvolňování vitamínu B₁₂ z potravy, může docházet k nedostatku i přes dostatečnou tvorbu vnitřního faktoru [1; 44-46].

Dalšími rizikovými faktory, které mohou způsobovat nedostatek vitamínu B₁₂ je infekce *Helicobacter pylori*, nadměrný růst střevních bakterií, zděděné narušení transportu vitamínu B₁₂ v krvi nebo intracelulárním metabolismu, špatná skladba stravy, která nezajišťuje dostatečný příjem všech živin, alkoholismus, kouření a dlouhodobé užívání léků [1]. Existuje více druhů léků, které ovlivňují stav vitamínu B₁₂ v lidském těle. Jsou to například léky ovlivňující sekreci žaludečních kyselin, nebo žaludeční pH (např. již zmíněné inhibitory protonové pumpy pro potlačení tvorby kyseliny chlorovodíkové v žaludku [47; 48]) nebo léky ovlivňující absorpci nebo metabolismus vitamínu B₁₂, kdy se snižuje hladina B₁₂ v krevním séru prostřednictvím známých mechanismů, mezi tyto léky patří například cholestyramin [1], který patří do skupiny adsorbentů žlučových kyselin [49], nebo např. metformin pro léčbu diabetu [1; 50; 51]. Celiakie nebo Crohnova choroba ovlivňuje lidské ileum, což vede ke

snížené absorpci vitamínu B₁₂ v důsledku poškozené sliznice [1; 15; 52]. Green a spol. ve svém článku uvádí, že obsah vitamínu B₁₂ se snižuje také v důsledku infekce virem HIV nebo anestézií provedenou oxidem dusným [1]. Oxid dusný obsažený v anestetickém plynu inaktivuje vitamín B₁₂ prostřednictvím ireverzibilní oxidace jeho koenzymové formy, methylkobalaminu, přímo v místě závislém na syntéze B₁₂ z methioninu [1; 53]. V závislosti na fyzickém stavu osoby a množství vitamínu B₁₂ v jeho těle, nebo také na četnosti a množství plynu, kterému byla osoba vystavena, se může hodnota vitamínu B₁₂ snižovat prudce nebo pozvolně [1; 54; 55].

U starších lidí může často docházet k atrofii sliznice žaludku, což vede k deficitu stejně tak jako strava chudá na vitamín B₁₂. Při vyvinutí atrofické gastritidy dochází k narušení absorpce a reabsorpce vitamínu B₁₂, což vede po delší době k nedostatečné saturaci vitamínem B₁₂, a to se poté projevuje jako porucha enzymatických pochodů. Proto se u starších lidí všeobecně doporučuje zvýšený příjem vitamínu B₁₂ v podobě suplementů [1; 6; 7; 15].

4.2 PROJEVY NEDOSTATKU

Od dostatku vitamínu B₁₂ ke klinické nedostatečnosti tělo prochází fází nedostatku, který se projevuje několika symptomy. Deficience adenosylkobalaminu se projeví akumulací kyseliny methylmalonové [1; 56] a nedostatek methylkobalaminu má za následek zvýšenou hladinu homocysteinu v krvi a tkáních, dochází ke zpomalení syntézy methioninu, jelikož je jeho koenzymem a díky tomu se zpomalí syntéza S-adenosylmethioninu, který je potřebný pro epigenetické reakce, včetně methylace DNA a RNA (spojování methylové skupiny s cytosinem), histonů a dalších regulátorů genové exprese, jelikož je donorem methylové skupiny. S-adenosylmethionin se také podílí na biosyntéze dopaminu a serotoninu. Při akumulaci homocysteinu může docházet k buněčnému stresu, apoptóze a homocysteinylaci funkčních proteinů v krvi a tkáních [1; 10; 56; 57]. Jako samozřejmost lze brát také klesající obsah komponentů vitamínu B₁₂, které jsou vázány na transkobalamin (známý také jako holotranskobalamin). Tato fáze nedostatku předchází jakýmkoli větším projevům klinické nedostatečnosti, bývá také označován jako subklinický [1; 56]. Subklinický stav pacienta je pro lékaře většinou obtížně řešitelný, jelikož nedokážou zjistit, zda bude postupovat ke klinické nedostatečnosti, nebo zůstane v chronickém, avšak stabilním stavu [1; 58; 59; 60]. V dnešní době je možno identifikovat také slabší stupeň nedostatku vitamínu B₁₂ díky zavedení testů na metabolity kyseliny methylmalonové (MMA) a homocysteinu v klinické praxi. Tímto

se značně rozšířilo podvědomí o tom, co vše můžeme připisovat nedostatku vitamínu B₁₂ [1; 61; 62].

Při pokročilém nedostatku vitamínu B₁₂ a vnitřnímu faktoru dochází k anémii s velkými červenými krvinkami, odborně nazváno megaloblastická anémie, v důsledku poruchy tvorby buněk v kostní dřeni, což způsobuje inhibice syntézy DNA [1; 2; 4] nebo ke zhoubné chudokrevnosti, kdy vlastní tělo bojuje proti buňkám tvořícím červené krvinky a hemoglobinu, toto onemocnění označujeme jako perniciózní anémie [1; 3; 6; 15; 63; 64], Fang a spol. ve svém článku uvádějí, že vitamín B₁₂ inhibuje vývoj perniciózní anémie u zvířat [3]. Perniciózní anémie představuje zdravotní riziko u lidí všech věkových kategorií, avšak se stoupajícím věkem její výskyt stoupá. Odhady říkají, že toto onemocnění postihuje pouze 2-3 % jedinců, jejichž věk je nižší, než 65 let [1; 52; 65].

Dalším projevem nedostatku vitamínu B₁₂ je degenerace některých oblastí míchy, což může mít za následek trvalé poškození nervového systému [1; 2; 4]. Onemocnění, které spojujeme s nedostatkem vitamínu B₁₂ jsou také ateroskleróza, srdeční choroby a neurologické choroby jako paralýza končetin nebo letargie [4]. S nedostatkem se spojuje také zvýšená náchylnost DNA ke změnám methylace a poškození molekuly [1; 4].

V Tabulce 3 jsou popsány další příznaky a projevy nedostatku u kojenců, příznaky nedostatku u starších dětí a důsledky nedostatku u dospělých.

Tabulka 3 - Důsledky a příznaky nedostatku vitamínu B₁₂ nebo stavu s jeho nízkým obsahem v těle

Příznaky nedostatku u kojenců	Důsledky u kojenců matek s nízkým stavem nebo nedostatkem vitamínu B₁₂	Příznaky nedostatku u starších dětí	Důsledky nedostatku nebo nízkého stavu vitamínu B₁₂ u dospělých
Odmítání stravy [1; 66]	Postižený vývoj dítěte [1; 66]	Horší školní výkon [1]	Megaloblastická anémie [1; 15; 52; 64; 67]
Zácpa [1; 66]	Příspěvek ke kardiovaskulárním onemocněním v dospělosti [1; 52]	Snížená hmotnost [1; 68]	Degenerace míchy [1; 64; 69]
Apatie [1; 66]	Příspěvek k psychiatrickým onemocněním v dospělosti [1; 52]	Malá výška a obvod hlavy [1; 68]	Zhoršená funkce senzoryckých a periferních nervů [1; 70]
Podrážděnost [1; 66]	Příspěvek k neurodegenerativním poruchám v dospělosti [1; 52]	Megaloblastická anémie [1; 68]	Kognitivní poruchy (demence, ztráty paměti) [1; 71-74]
Třes a myoklonické záchvaty [1; 66]	Příspěvek k rozvoji diabetes v dospělosti [1; 75]	Zhoršený duševní a sociální vývoj [1; 76; 77; 78]	Deprese [1; 79]
Pomalý růst, malý obvod hlavy a poškození mozku [1]		Krátkodobá paměť a pozornost [1; 76-78]	Onemocnění kostí [1; 80; 81]
Zpožděný vývoj včetně motoriky [1; 66]			Úbytek sluchu [1; 82]
Pancytopenie* [1]			Makulární degenerace** [1; 83]

*Současné snížení množství všech druhů krevních buněk, jedná se tedy o souhrnný název pro více krevních onemocnění jako například krevní anémie nebo leukopenie [84; 85].

****Závažné oční onemocnění postihující oční sítnici, přesněji její část, kterou nazýváme žlutá skvrna. Dochází ke ztrátě centrálního vidění nebo až k úplné ztrátě zraku.**

5 VÝROBA

Vzhledem ke zvyšujícímu se počtu vegetariánů a veganů po celém světě se zkoumá způsob, jak obohatit výrobky rostlinného původu o vitamín B₁₂ [7; 12; 13]. Účinným řešením se zdá být obohacování pomocí mikroorganismů, které produkují vitamín B₁₂ [12; 13; 86-88]. Jedná se o šetrný způsob bez zvyšování výrobních nákladů, a umožňuje zajistit lidem trpícím nedostatkem příjem vitamínu B₁₂, aniž by museli užívat vitamínové preparáty [12; 88]. Existují dva způsoby, jak syntetizovat vitamín B₁₂:

- použití bakteriálních kultur, které obohacují potraviny pomocí fermentace, při které se tvoří vitamín B₁₂ [4; 12; 86],
- chemická cesta, která je technologicky náročná a finančně nákladná vzhledem k rozsáhlé mikrobiální syntéze [4].

Bylo vynaloženo značné úsilí pro obohacení některých rostlinných potravin jako například tempehu nebo fermentované zeleniny [7; 13]. Obsah vitamínu B₁₂ je před obohacením velice nízký až nedetekovatelný [7], po obohacení pomocí fermentace jeho koncentrace značně kolísá, a to v rozmezí 0,7–8 µg/100 g [7; 89], nebo také 1,6–80 µg/l, v závislosti na použitých mikroorganismech a kultivačních podmínkách [13]. Například při fermentaci tempehu jsou za produkci vitamínu B₁₂ zodpovědné bakterie *Citrobacter freundii* a *Klebsiella pneumoniae* [13]. V sójovém jogurtu byla zjištěna koncentrace vitamínu B₁₂ 180 µg/l, ten byl fermentován bakteriemi *Lactobacillus reuteri* kmen ZJ03. Bylo prokázáno, že podávání tohoto jogurtu těhotným myším a jejich potomkům koriguje nedostatek vitamínu B₁₂. Problémem však je, že analýza vitamínu B₁₂ byla provedena mikrobiologicky, takže nelze rozlišit aktivní a neaktivní formy vitamínu. Charakterizace typu sloučeniny vitamínu B₁₂ ve fermentovaných produktech je samozřejmě stěžejní pro cílenou aplikaci fermentujících mikroorganismů do potravin. Například již zmíněný *Lactobacillus reuteri* produkuje pseudovitamín s adeninem jako nižším ligandem, který je pro člověka neaktivní [12; 13].

Dále jsou tento vitamín schopny vytvořit některé půdní mikroorganismy, archaebakterie a tvoří se také v odpadních vodách nebo přírodních hnojivech. Jedná se o důležité organismy pro budoucí technologie [4].

5.1 BIOSYNTÉZA

Proces syntézy vitamínu může probíhat dvěma alternativními pochody: aerobní [5] (studována u *Pseudomonas* [4] *denitrificans* [3; 90; 91]) nebo anaerobní cestou [5] (studována u *Salmonella* [4] *typhimurium* [3; 90; 91], *Bacillus* [4] *megaterium* [3; 90; 91] a *Propionibacterium shermanii* [3; 90; 91]). Některé kmeny mohou syntetizovat kobalamin absorpcí korinoidů pomocí záchranné cesty [3; 92]. Záchranná cesta je efektivní způsob pro bakterie a archea k získání kobalaminu, co se týče nákladů na energii [3; 93]. Biosyntéza všech tetrapyrrolových pyruvátů v rostlinách a většině bakterií začíná přidáním glutamátu k tRNA pomocí glutamyl-tRNAGlu syntetázy. K této reakci je potřeba hydrolyza jedné molekuly adenosintrifosfátu do adenosinmonofosfátu a fosfátu. Poté se tRNAGlu redukuje na glutamát-1-semialdehyd a tato reakce je katalyzována glutamyl-tRNA reduktázou. Vzniklý produkt se převede na 5-aminolevulinovou kyselinu pomocí glutamát-1-semialdehydaminotransferázou, což je první obecný prekursor všech známých tetrapyrrolů [4]. Tetrapyrrolové sloučeniny, včetně kobalaminu, hemu a bakteriochlorofylu, jsou odvozeny od δ -aminolevulinátu a mezi těmito tetrapyrrolovými sloučeninami v mnoha bakteriálních druzích existuje komplexní interdependentní a interakční vztah [3; 92]. Adenosylkobalamin je produkován z uroporfyrinogenu III, který pochází z osmi molekul kyseliny 5-aminolevulové. První části syntézy vitamínu B₁₂ se provádí za anaerobních podmínek [4; 91] a jsou katalyzovány enzymy kódovanými geny s hem předponou, jedná se o 5-dehydratáza kyseliny aminolevulové (hemB), porfobilinogen deaminázy (hemC) a uroporfyrinogen III (hemD). Nejprve se vytvoří dimer kyseliny 5-aminolevulové, což vede k tvorbě porfobilinogenu, ten se dále polymerizuje, kdy ze čtyř molekul vzniká preuroporfyrinogen. Tato sloučenina následně prochází inverzí a cyklizací, která generuje biologicky aktivní uroporfyrinogen III, což je prekursor korinové struktury [4]. Pomocí C-methyltransferázy dochází u uroporfyrinogenu III k methylaci na pozici C-2 a C-7, čímž vzniká prototyp kruhové formace [4; 91]. Hned poté kruhová sloučenina váže kobalt do své struktury, což je katalyzováno chelatázou, která není závislá na ATP (adenosintrifosfátu) [4]. Po navázání kobaltu se C-20 odštěpuje a oxiduje na acetaldehyd [4; 91], právě v důsledku přítomnosti kobaltu, který může mít různé oxidační stavy a to +I nebo +III. Následuje sled devíti reakcí [4], které katalyzují různé typy enzymů (mající předponu *cbi*) [4; 91]. Dochází v nich k methylacím uhlíků v příslušných polohách a korinový kruh se převede na kobinamid, čehož se dosáhne konjugací 2-aminopropanolu s částí kyseliny propionové,

dočasně připojené k bočnímu kruhovému D-řetězci. Další reakce už probíhají za aerobních podmínek, tudíž je k jejich uskutečnění potřebný kyslík [4]. Tyto reakce katalyzují enzymy s předponou *cob* [4; 91]. V důsledku toho je vytvořen nižší ligand a spolu s vyššími ligandy jsou připojeny ke kobinamidu. Vytvořený nukleotid přítomný v makrocyklické sloučenině je výsledkem přenosu fosforibosylové skupiny nikotinamidového mononukleotidu na 5,6 – dimethylbenzimidazol (DMBI) za vzniku α -rybazolu. [4] Poté je α -rybazol připojen v přítomnosti guanosindifosfátu na adenosylkobalamin, který produkuje guanosinmonofosfát. Všechny výše popsané reakce vedou k vytvoření kompletní molekuly adenosylkobalaminu [4].

Optimální a stabilní hladina vitamínu B₁₂, jeho biosyntéza a transport je regulován kobalaminovým riboswitchem v 5'netranslatovaných oblastech příslušných genů [3; 92]. Riboswitch je specifická trojrozměrná struktura na 5'konci mRNA, která je schopna rozpoznávat a vázat malé molekuly, vazba metabolitu tedy mění strukturu [3; 94].

5.2 PRŮMYSLOVÁ VÝROBA

K průmyslové výrobě dochází za pomoci mikroorganismů, jak už bylo v předchozích odstavcích naznačeno. Je důležité pochopit přesné mechanismy, které ovlivňují syntézy různých forem vitamínu B₁₂ pro správný výběr kmenů bakterií, a tudíž zvýšení jeho produkce [4]. Nejčastěji se pro masovou výrobu používá *Pseudomonas denitrificans* [4] a *freudenreichii* [12; 91; 94], *Propionibacterium shermanii* [91] nebo *Sinorhizobium meliloti*. Tyto kmeny však mají několik nedostatků, a to dlouhé fermentační cykly, náročnost na vlastnosti živné půdy a nedostatek vhodných genetických systémů pro kmenové inženýrství. Donedávna se velká část výzkumu o kmenech produkujících vitamín B₁₂ soustředila na tradiční strategie jako je náhodná mutageneze a fermentační proces optimalizace s omezeným výzkumem metabolického inženýrství. Není tomu tak dlouho, kdy vědci zaměřili pozornost na kmen *Escherichia coli* jako na platformu pro syntézu vitamínu B₁₂. *E. coli* lze považovat za dobře prostudovanou bakterii, která se používá pro výrobu různých chemikálií, jako jsou terpenoidy nebo syntetické alkoholy [3; 95-97].

Při výrobě je třeba rozlišovat aktivní vitamín B₁₂ a jeho velice podobný pseudovitamín. Aktivní vitamín B₁₂ se od pseudovitaminu liší přítomností DMBI na nižší pozici ligandu v makrocyklickém kruhu [4; 5; 7; 12]. Genom *Propionibacterium freudenreichii* produkuje fúzní enzym BluB/CobT2, který se podílí na tvorbě aktivní formy vitamínu B₁₂. Konkrétně

u něj se na biosyntéze vitamínu B₁₂ podílí 30 genů [4; 5; 12; 98]. V biosyntéze vitamínu B₁₂ lze enzymatický komplex BluB/CobT2 považovat za klíčový [4; 5; 12; 99-101]. Nejprve dojde k tvorbě DMBI redukcí flavinmononukleotidu katalyzovaného enzymem BluB za anaerobních podmínek [4; 5; 99-101]. Vytvořený DMBI se poté aktivuje pomocí enzymu CobT2 (který je zodpovědný za připojení DMBI ke kobinamidu) a vytvoří se α -ribazol fosfát, který se připojí k makrocyclickému kruhu, který vytváří kompletní molekulu aktivní formy kobalaminu [4; 91]. Existuje 7 typů enzymu CobT2, které pochází z různých mikroorganismů a všechny jsou charakterizovány afinitou k DMBI a nedostatečnou schopností využívat jiné substráty, což zabraňuje biosyntéze neúčinných sloučenin. Nedostatečná schopnost enzymatického komplexu využívat například adenin nám ukazuje, že *Propionibacterium freudenreichii* je schopna vysoké produkce aktivního vitamínu B₁₂. Všechny kmeny *Propionibacterium* jsou toho však schopny pouze za přítomnosti kyslíku. [4; 12]

Výroba vitamínu B₁₂ za použití kmenu *Propionibacterium* se rozděluje na dvě fáze. V první jsou bakteriální buňky kultivovány za anaerobních podmínek, kdy se generuje prekurzor vitamínu B₁₂ zvaný kobinamid. V druhé fázi se provádí jemné větrání kultury po dobu několika dnů, kdy se syntetizuje nižší ligand a dochází ke konjugaci s kobinamidem, vytvořeným při anaerobní kultivaci [4; 91]. Pro nejefektivnější výrobu je nutné udržovat správnou teplotu 30 °C a pH rovno 7 [4; 91]. Z tohoto důvodu se při výrobě odstraňuje kyselina propionová a octová, která vzniká během fermentace. Odstranění se provádí buď alkalizací média, použitím cross filtru nebo pročištěním na koloně s aktivním uhlím. Samozřejmostí je doplňování kultivačního média spolu s důležitými sloučeninami a prekurzory, jedná se například o ionty kobaltu, DMBI [4; 12], glycin, treonin, kyselinu 5-aminolevulovou, betain (přítomen v řepné melase) nebo cholin, bez ohledu na to, které kmeny k výrobě používáme [4]. Po dokončení biosyntézy se provede čiření, a to buď filtrací nebo úpravou hydroxidem zinečnatým. Následně se vitamín B₁₂ vysráží přidáním pomocných látek jako je kyselina taninová nebo krezol [91]. Poté se ještě vitamín B₁₂ čistí extrakcí za použití organických rozpouštědel, často doplněné o iontoměniče nebo aktivní uhlí. Nakonec se vitamín B₁₂ nechá vykristalizovat [91].

Bakterie rodu *Propionibacterium* jsou schopny tvořit také hodnotné metabolity jako třeba kyselinu propionovou, trehalózu a také vitamín B₁₂. Hlavní výhodou tohoto rodu je, že může růst na půdách vytvořených z průmyslových odpadů, což znamená efektivní využití odpadů a zvýšení biotechnologické ziskovosti. Bakterie rodu *Propionibacterium* a jejich metabolity

se běžně používají do kosmetických, farmaceutických a potravinářských výrobků. Najít je můžeme také jako přísadu v krmivech hospodářských zvířat [4].

Z průmyslového hlediska jsou nejdůležitější finální kroky syntézy a to výroba, aktivace a připojování nižšího ligandu, což určuje správnou syntézu fyziologicky aktivního vitamínu [4].

V Tabulce 4 jsou uvedeny vybrané kmeny rodu *Propionibacterium* a jejich schopnosti produkce vitamínu B₁₂ na různých typech médií.

Tabulka 4 - Produkce vitamínu B₁₂ vybranými kmeny rodu *Propionibacterium* [4]

Kmen	Zdroj uhlíku	Produkce
<i>P. acidipropionici</i> DSM 8250	Řepná melasa	34,8 mg/l
<i>P. acidipropionici</i> DSM 8250	Třtinová melasa	28,8 mg/l
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> OLP-5	Glukóza	31,7 mg/l
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> NCIB 1081	Glukóza	4,3 mg/l
<i>Propionibacterium shermanii</i> FRDC Pr1	Fermentační kapaliny (mléčné kvašení)	1,8 µg/l
<i>Propionibacterium germanii</i> PZ-3	Glukóza	52 mg/l
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> DSM 20270	Odpad z výroby tofu	10 mg/l
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> CICC 10019	Glukóza, kukuřičný extrakt	42,6 mg/l

5.3 GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY PRO VÝROBU VITAMÍNU B₁₂

Chemická syntéza vitamínu B₁₂ je složitá a zahrnuje přibližně 70 mezistupňů, s tím také úzce souvisí vysoké náklady a jeho průmyslová výroba se tedy omezuje pouze na fermentační procesy mikroorganismů (typická je *Propionibacterium denitrificans*) [4; 91]. V posledních letech došlo ke zvýšené produkci potravin, které jsou obohacené vitamínem B₁₂ pomocí

fermentace in situ, čili dochází k syntéze přímo v dané potravíně. [4] Jediným bezpečným organismem se statusem GRAS (Generally Recognized As Safe [102]), který je schopen biosyntézy aktivní formy vitamínu B₁₂ je *Propionibacterium freudenreichii*, což z něj činí jedinečný nástroj pro komerční produkci vitamínu B₁₂ v potravinách a krmivech [4; 13]. *Propionibacterium freudenreichii* navíc produkuje terapeuticky aktivní vitamín B₁₂ a zároveň i jeho neaktivní analog [4]. Samozřejmě známe i další druhy mikroorganismů, které dokážou syntetizovat vitamín B₁₂ a jsou označovány jako GRAS, ale z různých příčin jsou pro masovou výrobu méně atraktivní. Například bakterie rodu *Lactobacillus reuteri* neumí v dolní části kruhu vázat jiné ligandy než adenin. Tím se vytvořený vitamín B₁₂ stává biologicky neaktivním [4; 12; 13].

V roce 1995 byla vedoucí firmou průmyslové výroby vitamínu B₁₂ firma Aventis, která upřednostňovala bakterie rodu *Propionibacterium denitrificans*. *Propionibacterium denitrificans* [4] na rozdíl od *Propionibacterium freudenreichii* byla schopna syntetizovat vitamín B₁₂ za čistě aerobních podmínek, což je z hlediska technologie méně náročné [4; 12]. Kombinací genetického inženýrství a mutagenizačními postupy se vědcům z Rhône-Poulenc-Rorer podařilo získat kmen *Propionibacterium denitrificans*, který produkuje vitamín B₁₂ v koncentraci 300 mg/l, což znamená 30% nárůst. Tento geneticky modifikovaný kmen pokrýval v roce 2002 80 % celosvětové poptávky. Pro zvýšení účinnosti výroby byl geneticky modifikován také kmen *Propionibacterium freudenreichii*, kdy se výtěžek zvýšil 2,2× avšak s nízkou účinností ve srovnání s *Propionibacterium denitrificans* [4].

Používání geneticky modifikovaných mikroorganismů při syntéze metabolitů pro profylaxi lidského zdraví přináší jisté kontroverze. Mnoho studií se tedy věnuje optimalizaci produkce vitamínu B₁₂ za použití mikroorganismů, které nebyly geneticky modifikovány. Tyto studie jsou věnovány kmenům, pro které je charakteristická přirozeně vysoká produkce účinného vitamínu B₁₂. Byly učiněny pokusy o zlepšení efektivity biosyntézy optimalizací složení fermentačního média, výběrem nejvhodnějšího zdroje uhlíku, doplnění mikronutrientů do živné půdy [4] nebo iontů kobaltu [4; 12]. Výrazného zvýšení produkce se dosáhlo při obohacení kultivačního média prekurzory a analogy vitamínu B₁₂. Hlavním faktorem, který omezuje syntézu aktivní formy vitamínu B₁₂ u bakterií rodu *Propionibacterium* je tvorba metabolitů s nižším ligandem, tzv. DMBI [4; 12]. *Propionibacterium freudenreichii* dokáže aktivní vitamín B₁₂ dobře syntetizovat také v maticích na bázi obilovin [13].

5.4 STANOVENÍ KONCENTRACE VITAMÍNU B₁₂

Pro měření aktivní formy vitamínu B₁₂ v potravinářských materiálech je vhodné používat spíše kapalinovou chromatografii než provádět pokusy na zvířatech. Jedná se zejména o vzorky, které obsahují analogy vitamínu B₁₂, kde je mikrobiologická analýza nespolehlivá. Chamlagain a spol. ve svém článku uvádí, že vhodnou selektivní a citlivou metodou je použití ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) po přečištění vzorku na B₁₂-specifické-immunoafinitní koloně [13]. Nejčastěji se však používá nejcitlivější mikrobiologická metoda.

5.4.1 MIKROBIOLOGICKÉ STANOVENÍ VITAMÍNU B₁₂

Pro mikrobiologické stanovení vitamínu B₁₂ se používá tekuté peptonové kultivační médium upravené na pH 6,5–6,8 a kultura *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830 (American Type Culture Collection 7830). Inkubuje se 6–24 hodin při libovolně zvolené teplotě mezi 30–40 °C, avšak konstantní o $\pm 0,5$ °C. Nakonec se vzorek uchovává v temnu při 10 °C. Rozlišujeme několik metod:

- Titrační metoda pomocí standardní křivky vyjadřující závislost koncentrace/spotřeba při titraci 0,1 mol/l NaOH, pomocí indikátoru bromthymolové modři nebo do pH 6,8,
- Turbidimetrická metoda, kdy se po kultivaci buňky odstředí, promyjí roztokem NaCl a vysuší na vakuové odparce do konstantní hmotnosti. Po zjištění čisté váhy buněk se přidá opět roztok NaCl a proměří se % transmitance proti blanku. Získá se tak kompozitní křivka závislosti % T/mg buněk. [103]

6 ZMĚNY OBSAHU V DŮSLEDKU TEPELNÝCH ÚPRAV

Maso je skvělým zdrojem zdravých a kvalitních bílkovin a obsahuje také mnoho tělu prospěšných esenciálních prvků jako železo, zinek, vitamín E, vitamín A a také samozřejmě většinu z vitamínů B skupiny [104]. Při zpracování a kulinárních úpravách se dá vitamín B₁₂ považovat za velmi stabilní [6; 10], velké ztráty jsou samozřejmě hlavně na povrchu masa, kde je největší kontakt se zdrojem tepla [10; 105; 106], největším důvodem ztrát bývá také vyluhování. U masa jsou ztráty závislé na použité kulinární úpravě a bývají v rozmezí 55–70 % [6]. Studie naznačují, že velikost ztráty vitamínu B₁₂ závisí hlavně na teplotě a době tepelné úpravy, dále je také ovlivňují další složky potraviny [7; 32].

Řešením pro zachování vyššího obsahu vitamínu v masě se zdá být metoda vaření ve vakuu neboli „sous-vide“, není ovšem jasné, zda je konzervace vitamínu způsobena vakuovým obalem nebo nižší použitou teplotou [7; 107].

Pokud srovnáme konvenční ohřev s mikrovlnným, vede si mikrovlnný, co se týče zachování vitamínů, o dost lépe [7; 32; 108; 109]. Nicméně i tak dochází k výrazné ztrátě vitamínu B₁₂ v důsledku jeho degradace [7; 110], a to nejvýrazněji u hovězího masa, vepřového masa a mléka [32; 110].

6.1 KULINÁRNÍ METODA SOUS-VIDE

Metoda „sous-vide“ neboli vaření ve vakuu je poměrně moderní metoda kdy jsou suroviny vařeny uvnitř tepelně stabilních vakuovaných vacích v kontrolovaných teplotních podmínkách po určitý čas. Pro vaření ryb a masa se používají teploty kolem 70 °C. Množství vzduchu ve vakuovaném vaku závisí na typu suroviny, obvykle je zbytkový tlak uvnitř vaku 120 mbar. Materiál vaku musí splňovat několik podmínek: odolnost k vysokým teplotám, nízká propustnost plynů, mechanická pevnost a omezená migrace plastových složek (použitý materiál vaku musí být potravinářské kvality). Jedná se o ekonomické a šetrné vaření surovin, dochází ke konzervaci vitamínů, je potřeba méně zvýrazňovačů chuti a v pokrmu se zachovává většina šťávy [107]. U telecího, jehněčího, vepřového masa a masa sardinek [32] vařeného metodou ve vakuu byla úspěšnost zachování vitamínu B₁₂ 100 %. U lososa to pak bylo 92 %, u hovězího 87 %, a u tresky 72 % [7; 111].

6.2 HOVĚZÍ MASO

Značné ztráty vitamínu B₁₂ lze sledovat u vaření syrového hovězího masa [32]. O hovězím mase je známo, že je jedním z nejvíce konzumovaných a má nejvyšší obsah vitamínu B₁₂, protože skot má velké množství vitamínu B₁₂ syntetizujících mikroorganismů v bacheru, obsahuje také vysoké množství tělu prospěšných bílkovin a minerálních látek. Jedna porce hovězího masa denně může spolehlivě zajistit potřebnou denní dávku vitamínu B₁₂ [10; 112-114].

Ve výzkumu Czerwonky a spol., který zkoumal změny obsahu tohoto vitamínu v mase tura domácího, byl použit dlouhý sval zádový a krční odebraný ze 14 býků. Vzorek byl zchlazen na teplotu +2 °C na 10 dní. Poté bylo maso rozděleno na 2 cm plátky pro smažení a grilování a na porce pro pečení a porovnání syrového stavu. Tepelná úprava probíhala do té doby, dokud vzorky nedosáhly vnitřní teploty 70 °C. Poté byly ochlazeny, naváženy na 100 g, vakuově zabaleny a zamrazeny při teplotě -80 °C. Celkový obsah kobalaminu byl měřen metodou kapalinové chromatografie na nepolárních adsorbentech s SPE kolonkami (využívajícími extrakci tuhou fází) a jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem. Tato metoda je založena na extrakci vitamínu B₁₂ ze vzorku, transformaci všech biologicky aktivních forem kobalaminů na kyanokobalamin a poté vícestupňovém čištění a kondenzaci vzorku. Biologicky aktivní formy vitamínu B₁₂ ve vzorku byly stanoveny stejně jako celkový obsah s tím rozdílem, že byla vynechána transformace na kyanokobalamin. Dále musely být zachovány přísné podmínky analýzy jako ochrana expozicí světlem nebo kyslíkem [10]. Po provedení měření byly získány hodnoty uvedené v Tabulce 5.

Tabulka 5 - Naměřené hodnoty v hovězím maso [10]

Kulinární metoda	Zůstatek vitamínu B₁₂ [%]	Obsah vitamínu B₁₂ po úpravě [µg/100 g vzorku]	Podmínky úpravy
Syrové hovězí maso	100	1,75	-
Grilování	94	1,65	Elektrický kontaktní gril, 240 °C
Smažení	68	1,19	Elektrická pánev, 180 °C
Pečení	89	1,56	Horkovzdušná trouba, 180 °C

Z Tabulky 5 můžeme usuzovat, že nejšetnější metodou je v tomto případě grilování, což vede k zajímavému závěru, jelikož zde bylo maso vystaveno nejvyšší teplotě.

6.3 RYBY A VÝROBKY Z NICH

Ryby a měkkýši tvoří například pro Japonce až 84 % denního příjmu vitamínu B₁₂ [7; 32; 115]. Jak se ale změní jeho obsah v rybím maso při tepelné úpravě? Pokud rybí maso grilujeme, vaříme, smažíme, dusíme, nebo připravujeme v mikrovlnné troubě, jeho ztráty jsou až 62 % [7; 32].

Jeden z konkrétních výzkumů, který se zabýval změnami obsahu vitamínu B₁₂ vlivem kulinárních úprav v maso, sledoval konkrétně maso ryby *etrumea velkookého*, známého také jako sardinka. Koncentrace vitamínu B₁₂ v jeho syrovém maso je 122 ± 7 µg/kg a ve vnitřnostech 375 ± 34 µg/kg. Pro výzkum bylo použito testovací B₁₂ medium pro *Lactobacillus delbrueckii*, poddruh *lactis*. Pro měření zákalu přítomných *Lactobacillus delbrueckii* se používal ultrafialovo-viditelný (UV/VIS) spektrometr. Při přípravě vzorků masa byly odstraněny hlavy, kosti a vnitřnosti. Vitamín B₁₂ byl extrahován a testován mikrobiologickou metodou pomocí *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830. Vzorek masa byl nejprve zvážen, tepelně upraven, znovu zvážen a následně homogenizován pomocí kuchyňského robotu. Celkový vitamín B₁₂ byl extrahován varem s 0,005% KCN, při pH 4,5

pro docílení konverze všech sloučenin vitamínu B₁₂ včetně alkali-rezistentních sloučenin, včetně deoxyribózy a deoxyribonukleotidů. Část takto připraveného vzorku byla upravena na pH 11 a ošetřena v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Reálná hodnota vitamínu B₁₂ ve vzorku pak byla vypočítána odečtením hodnoty alkali-rezistentního faktoru od hodnot celkového množství vitamínu B₁₂. Syrové maso sardinek bylo připravováno různými kulinárními technikami:

- mikrovlnný ohřev při 500 W po dobu 1 minuty,
- grilování v konvenční plynové troubě při 180 °C po dobu 7,5 minuty,
- vaření v parním hrnci po dobu 4,5 a 9 minut za použití běžného rozsahu plynu,
- smažení ve stolním oleji,
- vaření ve vakuu (99%) pomocí speciálního ohříváče při 70 °C po dobu 30 minut, kdy vnitřní teplota v uzavřeném sáčku byla 75–76 °C [32].

Po tepelné úpravě se vzorky nechaly ihned chladnout, dokud nedosáhly vnitřní teploty 3 °C.

Po zhodnocení byly získány výsledky uvedené v Tabulce 6.

Tabulka 6 - Naměřené hodnoty v rybím maso

Kulinární metoda	Zůstatek vitamínu B₁₂ [%]	Podmínky úpravy
Vaření	47	Vroucí voda, 5 minut
Grilování	59	180 °C, 7,5 minuty
Vaření v páře	93	4,5 minuty
	41	9 minut
Smažení	62	180 °C, 2 minuty
	43	180 °C, 4 minuty
Mikrovlnný ohřev	59	500 W, 1 minuta
Vaření ve vakuu	100	70 °C, 30 minut

Z Tabulky 6 je zřejmé, že nejlépe si vede vaření ve vakuu, kdy je zachován 100% obsah vitamínu. Dále mu směle konkuruje vaření v páře a také smažení. Lze tedy usuzovat,

že vitamínu B₁₂ u rybího masa nejvíce škodí dlouhé louhování a vystavování vysokým teplotám [32].

6.4 MASNÉ VÝROBKY

Španělská studie, která se zabývala obsahem vitamínu B₁₂ ve vepřovém masu a masných výrobcích použila mikrobiologickou metodu stanovení, blíže nepopsanou. Vzorky masa byly složeny z vepřového dvojhlavého svalu stehenního, trojhlavého svalu pažního a dlouhého svalu zádového a krčního. Masné výrobky zastupovalo vždy několik vzorků choriza, dušené vepřové šunky, vídeňských párků, frankfurtských párků, vepřové a telecí sekané. Chorizo bylo vyrobeno ze směsi vepřového a hovězího masa a slaniny nebo tuku s přidavkem soli, papriky a dalších povolených přísad, dále naplněno do přírodních nebo umělých střívek a upraveno sušením s nebo bez podrobení uzení. Dušená šunka byla vyrobena běžným způsobem ve varné skříni až do dosažení teploty 72 °C uvnitř výrobku, tzn. denuraci bílkovin. Párky byly z tepelně opracovaného mletého masa a tuku, plněného do přírodních nebo umělých střívek. Složení a úprava sekaných výrobků nebyla blíže popsána. Při měření byly získány hodnoty uvedené v Tabulce 7.

Tabulka 7 - Naměřené hodnoty v masných výrobcích [104]

Druh vzorku	Obsah vitamínu B ₁₂ [µg/100 g vzorku]
Syrové vepřové maso	0,55*
Chorizo	1,12*
Dušená vepřová šunka	0,30*
Vídeňské párky	0,57*
Frankfurtské párky	0,60*
Vepřová sekaná	0,45
Telecí sekaná	0,68

*Získané hodnoty byly vypočteny jako aritmetický průměr všech vzorků téhož druhu.

Z výsledků této španělské studie můžeme vyvozovat, že nejlepší metodou pro zachování co největšího množství vitamínu B₁₂ je sušení spojené s uzením při výrobě choriza. Nejméně

vitamínu B₁₂ pak bylo nalezeno ve vařené šunce, kde je vysoká ztráta způsobena delší dobou louhování.

6.5 MLÉKO A MLÉČNÉ VÝROBKY

U pasterace mléka bývají ztráty kolem 10 %, v UHT mléce 10–20 %. V sýrech je zachováno cca 60–90 % původního obsahu [6]. Vitamín B₁₂ v mléce degraduje nejen působením tepla, ale také světelnou expozicí. Vzhledem k tomu, že se v mléce vyskytuje také vitamín B₂, který vlivem světelného záření degraduje a uvolňuje volné radikály, kterým je poté vystaven přítomný vitamín B₁₂, který vlivem jejich přítomnosti také degraduje. V jedné ze studií byly vzorky mléka vystaveny fluorescenčnímu záření po dobu 24 hodin při 4 °C [7]. Koncentrace vitamínu se snížila o 1–27 % v závislosti na typu testovaného mléka. Dlouhodobé skladování tak může způsobit ochuzení mléka o tento vitamín [7].

7 ZÁVĚR

Vitamín B₁₂ je velice důležitý pro správnou krevtvorbu, správně fungující nervový systém a vytváření molekul DNA v lidském organismu. Příjem tohoto vitamínu je pro dospělého jedince stanoven na 2–3 µg/den, v těhotenství a době kojení se poté dávka zvyšuje v souvislosti s poskytováním živin dítěti. Nejvhodnější je tento vitamín přijímat z masa a živočišných produktů jako jsou vejce, mléko nebo sýry. Mnohé další zdroje, jako například mořské řasy nebo korýši, sice obsahují velké množství korinoidů, avšak většina z nich je ve formě neaktivní formy vitamínu B₁₂. Rozvinutý průmysl genetického inženýrství umožňuje dostačujícím způsobem obohacovat o vitamín B₁₂ i potraviny rostlinného původu. K tomuto se nejčastěji využívá kmen *Propionibacterium*, jehož výhodou je schopnost využití odpadu průmyslových výrob.

Při tepelných úpravách masa jsou ztráty vitamínu B₁₂ různorodé, v závislosti na zvolené teplotě a délce tepelné úpravy. Nejšetrnější metodou se zdá být vaření ve vakuu neboli „sous–vide“, kdy je retence vitamínu až 100 %. Za další šetrné metody se dá považovat grilování, vaření v páře a sušení, kdy jsou hodnoty zbylého vitamínu většinou větší, než 50 %, jelikož se při nich maso nenachází v roztoku, do kterého by mohl vitamín B₁₂ přecházet. Z tohoto důvodu je nejméně vhodnou metodou pro zachování co nejvyššího obsahu vitamínu B₁₂ v mase vaření.

Ke stanovení koncentrace vitamínu B₁₂ se nejčastěji používá mikrobiologická metoda pomocí *Lactobacillus leichmannii* ATCC 7830, nebo poté méně často metoda kapalinové chromatografie ve spojení s dalšími instrumentálními technikami.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GREEN, Ralph, Lindsay ALLEN, Anne-Lise BJØRKE-MONSEN et al. Vitamin B12 deficiency. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017, **3**(17040), 1-19. DOI: 10.1038/nrdp.2017.40. ISSN 2056-676X. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrdp201740>
- [2] *Referenční hodnoty pro příjem živin*. V ČR 1. vyd. Praha: Společnost pro výživu, 2011. ISBN 978-80-254-6987-3.
- [3] FANG, Huan, Jie KANG a Dawei ZHANG. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microbial Cell Factories*. 2017, **16**(1), -. DOI: 10.1186/s12934-017-0631-y. ISSN 1475-2859. Dostupné také z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0631-y>
- [4] PIWOWAREK, Kamil, Edyta LIPIŃSKA, Elżbieta HAĆ-SZYMAŃCZUK, Marek KIELISZEK a Iwona ŚCIBISZ. Propionibacterium spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, **102**(2), 515-538. DOI: 10.1007/s00253-017-8616-7. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-017-8616-7>
- [5] HAZRA, Amrita, Andrew HAN, Angad MEHTA, Kenny MOK, Vadim OSADCHIY, Tadhg BEGLEY a Michiko TAGA. Anaerobic biosynthesis of the lower ligand of vitamin B 12. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, **112**(34), 10792-10797. DOI: 10.1073/pnas.1509132112. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1509132112>
- [6] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [7] WATANABE, Fumio, Yukinori YABUTA, Yuri TANIOKA a Tomohiro BITO. Biologically Active Vitamin B 12 Compounds in Foods for Preventing Deficiency among Vegetarians and Elderly Subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, **61**(28), 6769-6775. DOI: 10.1021/jf401545z. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf401545z>

- [8] BUTLER, Philip a Bernhard KRÄUTLER. Biological Organometallic Chemistry of B12. *Bioorganometallic Chemistry*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006, **2006**(17), 1-55. Topics in Organometallic Chemistry. DOI: 10.1007/3418_004. ISBN 3-540-33047-X. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/3418_004
- [9] WATANABE, Fumio. Vitamin B 12 Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*. 2016, **232**(10), 1266-1274. DOI: 10.3181/0703-MR-67. ISSN 1535-3702. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.3181/0703-MR-67>
- [10] CZERWONKA, Małgorzata, Arkadiusz SZTERK a Bożena WASZKIEWICZ-ROBAK. Vitamin B12 content in raw and cooked beef. *Meat Science*. 2014, **96**(3), 1371-1375. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.11.022. ISSN 03091740. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174013006402>
- [11] SHERMA, Joseph a Bernard FRIED. *Handbook of thin-layer chromatography*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2003, s. 589-605. Chromatographic science, v. 89. ISBN 0-8247-0895-4.
- [12] DEPTULA, Paulina, Bhawani CHAMLAGAIN, Minnamari EDELMANN, Panchanit SANGSUWAN, Tuula NYMAN, Kirsi SAVIJOKI, Vieno PIIRONEN a Pekka VARMANEN. Food-Like Growth Conditions Support Production of Active Vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* 2067 without DMBI, the Lower Ligand Base, or Cobalt Supplementation. *Frontiers in Microbiology*. 2017, **8**(368), -. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00368. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00368/full>
- [13] CHAMLAGAIN, Bhawani, Tessa SUGITO, Paulina DEPTULA, Minnamari EDELMANN, Susanna KARILUOTO, Pekka VARMANEN a Vieno PIIRONEN. In situ production of active vitamin B12 in cereal matrices using *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Science & Nutrition*. 2018, **6**(1), 67-76. DOI: 10.1002/fsn3.528. ISSN 20487177. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/fsn3.528>
- [14] Cyanocobalamin (B12). In: *SigmaAldrich* [online]. Darmstadt, Německo: Merck, b.r. [cit. 2018-04-26]. Dostupné z:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/cyanocobalaminb121355376819911?lang=en&ion=CZ>

- [15] GREEN, Ralph. Vitamin B 12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood*. 2017, **2017**(19), 2603-2611. DOI: 10.1182/blood-2016-10-569186. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2016-10-569186>
- [16] HERBERT, Victor a Ralph ZALUSKY. INTERRELATIONS OF VITAMIN B12 AND FOLIC ACID METABOLISM: FOLIC ACID CLEARANCE STUDIES. *Journal of Clinical Investigation*. 1962, **1962**(6), 1263-1276.
- [17] MILLER, Joshua, Marjorie GARROD, Lindsay ALLEN, Mary HAAN a Ralph GREEN. Metabolic evidence of vitamin B-12 deficiency, including high homocysteine and methylmalonic acid and low holotranscobalamin, is more pronounced in older adults with elevated plasma folate. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **90**(6), 1586-1592. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27514. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/90/6/1586/4598102>
- [18] SELHUB, J., M. MORRIS a P. JACQUES. In vitamin B12 deficiency, higher serum folate is associated with increased total homocysteine and methylmalonic acid concentrations. *PNAS*. 2007, **2007**(50), 19995-20000. DOI: 10.1073/pnas.0709487104. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709487104>
- [19] MURPHY, Michelle, Anne MOLLOY, Per UELAND, Joan FERNANDEZ-BALLART, Jörn SCHNEEDE, Victoria ARIJA a John SCOTT. Longitudinal Study of the Effect of Pregnancy on Maternal and Fetal Cobalamin Status in Healthy Women and Their Offspring. *The Journal of Nutrition*. 2007, **137**(8), 1863-1867. DOI: 10.1093/jn/137.8.1863. ISSN 0022-3166. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jn/article/137/8/1863/4664914>
- [20] GREIBE, Eva, Birgitte ANDREASEN, Dorte LILDBALLE, Anne MORKBAK, Anne-Mette HVAS a Ebba NEXO. Uptake of cobalamin and markers of cobalamin status: a longitudinal study of healthy pregnant women. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011, **49**(11), 1863-1867. DOI: 10.1515/cclm.2011.682. ISSN

1437-4331. Dostupné také z: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2011.49.issue-11/cclm.2011.682/cclm.2011.682.xml>

- [21] MILMAN, Nils, Keld-Erik BYG, Thomas BERGHOLT, Lisbeth ERIKSEN a Anne-Mette HVAS. Cobalamin status during normal pregnancy and postpartum: a longitudinal study comprising 406 Danish women. *European Journal of Haematology*. 2006, **76**(6), 521-525. DOI: 10.1111/j.0902-4441.2006.t01-1-EJH2550.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0902-4441.2006.t01-1-EJH2550.x>
- [22] TUCKER, Katherine, Sharron RICH, Irwin ROSENBERG, Paul JACQUES, Gerard DALLAL, Peter WILSON a Jacob SELHUB. Plasma vitamin B-12 concentrations relate to intake source in the Framingham Offspring Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2000, **71**(2), 514-522. DOI: 10.1093/ajcn/71.2.514. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/71/2/514/4729184>
- [23] MONSEN, A.-L. Cobalamin Status and Its Biochemical Markers Methylmalonic Acid and Homocysteine in Different Age Groups from 4 Days to 19 Years. *Clinical Chemistry*. 2003, **49**(12), 2067-2075. DOI: 10.1373/clinchem.2003.019869. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2003.019869>
- [24] FOKKEMA, MR, HA WOLTIL, CM BEUSEKOM, A SCHAAFSMA, DAJ DIJCK-BROUWER a FAJ MUSKIET. Plasma total homocysteine increases from day 20 to 40 in breastfed but not formula-fed low-birthweight infants. *Acta Paediatrica*. 2002, **91**(5), 507-511. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2002.tb03268.x. ISSN 08035253. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.2002.tb03268.x>
- [25] GREIBE, Eva, Dorte LILDBALLE, Súsanna STREYM, Peter VESTERGAARD, Lars REJNMARK, Leif MOSEKILDE a Ebba NEXO. Cobalamin and haptocorrin in human milk and cobalamin-related variables in mother and child: a 9-mo longitudinal study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013, **98**(2), 389-395. DOI: 10.3945/ajcn.113.058479. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/98/2/389/4577205>

- [26] MOLLOY, Anne, Peadar KIRKE, Lawrence BRODY, John SCOTT a James MILLS. Effects of Folate and Vitamin B 12 Deficiencies During Pregnancy on Fetal, Infant, and Child Development. *Food and Nutrition Bulletin*. 2008, **29**(21), 101-111. DOI: 10.1177/15648265080292S114. ISSN 0379-5721. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/15648265080292S114>
- [27] COBAYASHI, Fernanda, Luciana TOMITA, Rosangela AUGUSTO, Vania D'ALMEIDA a Marly CARDOSO. Genetic and environmental factors associated with vitamin B12 status in Amazonian children. *Public Health Nutrition*. 2015, **18**(12), 2202-2210. DOI: 10.1017/S1368980014003061. ISSN 1368-9800. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1368980014003061
- [28] ALLEN, Lindsay. Causes of Vitamin B 12 and Folate Deficiency. *Food and Nutrition Bulletin*. 2008, **29**(21), 20-34. DOI: 10.1177/15648265080292S105. ISSN 0379-5721. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/15648265080292S105>
- [29] THANKACHAN, Prashanth, Jee RAH, Tinku THOMAS, Sumithra SELVAM, Vani AMALRAJAN, Krishnamachari SRINIVASAN, Georg STEIGER a Anura KURPAD. Multiple Micronutrient-Fortified Rice Affects Physical Performance and Plasma Vitamin B-12 and Homocysteine Concentrations of Indian School Children. *The Journal of Nutrition*. 2012, **142**(5), 846-852. DOI: 10.3945/jn.111.149021. ISSN 0022-3166. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jn/article/142/5/846/4630769>
- [30] HOLMES, B, N KAFFA, K CAMPBELL a T SANDERS. The contribution of breakfast cereals to the nutritional intake of the materially deprived UK population. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2012, **66**(1), 10-17. DOI: 10.1038/ejcn.2011.143. ISSN 0954-3007. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ejcn2011143>
- [31] YAJNIK, C. Vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia in rural and urban Indians. *Japi*. 2006, **2006**(54), 775-782.
- [32] NISHIOKA, Michiko, Fuki KANOSUE, Yukinori YABUTA a Fumio WATANABE. Loss of Vitamin B12 in Fish (Round Herring) Meats during Various Cooking

- Treatments. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2011, **57**(6), 432-436. DOI: 10.3177/jnsv.57.432. ISSN 0301-4800. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jnsv/57.432?from=CrossRef>
- [33] PULZ, Otto a Wolfgang GROSS. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, **65**(6), 635-648. DOI: 10.1007/s00253-004-1647-x. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1647-x>
- [34] STUPPERICH, Erhard a Ebba NEXO. Effect of the cobalt-N coordination on the cobamide recognition by the human vitamin B12 binding proteins intrinsic factor, transcobalamin and haptocorrin. *European Journal of Biochemistry*. 1991, **199**(2), 299-303. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16124.x. ISSN 0014-2956. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16124.x>
- [35] WATANABE, ,, , KATSURA, , TAKENAKA, , ENOMOTO, , MIYAMOTO, , NAKATSUKA a Yoshihisa NAKANO. Characterization of vitamin B 12 compounds from edible shellfish, clam, oyster, and mussel. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009, **52**(3), 263-268. DOI: 10.1080/09637480020027000-3-6. ISSN 0963-7486. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637480020027000-3-6>
- [36] UETA, Kazumi, Yukio ISHIHARA, Yukinori YABUTA, Shinya MASUDA a Fumio WATANABE. TLC-ANALYSIS OF A CORRINOID COMPOUND FROM JAPANESE ROCK-OYSTER “IWA-GAKI” (CRASSOSTREA NIPPONA). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2011, **34**(10-11), 928-935. DOI: 10.1080/10826076.2011.571170. ISSN 1082-6076. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2011.571170>
- [37] HAY, Gry, Carole JOHNSTON, Andrew WHITELAW, Kerstin TRYGG a Helga REFSUM. Folate and cobalamin status in relation to breastfeeding and weaning in healthy infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, **88**(1), 105-114. DOI: 10.1093/ajcn/88.1.105. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/88/1/105/4648785>

- [38] HINE, Brad, Irina BOGGS, Ralph GREEN, Joshua MILLER, Russell HOVEY, Rex HUMPHREY a Thomas WHEELER. Transcobalamin derived from bovine milk stimulates apical uptake of vitamin B12 into human intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2014, **115**(11), 1948-1954. DOI: 10.1002/jcb.24866. ISSN 07302312. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24866>
- [39] BABUCHOWSKI, Andrzej, Lucja LANIEWSKA-MOROZ a Iwona WARMINSKA-RADYKO. Propionibacteria in fermented vegetables. *Le Lait*. 1999, **79**(1), 113-124. DOI: 10.1051/lait:199919. ISSN 0023-7302. Dostupné také z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:199919>
- [40] DEGNAN, Patrick H., Michiko E. TAGA a Andrew L. GOODMAN. Vitamin B 12 as a Modulator of Gut Microbial Ecology. *Cell Metabolism*. 2014, **20**(5), 769-778. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.10.002. ISSN 15504131. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413114004495>
- [41] KONDO, H, M BINDER, J KOLHOUSE, W SMYTHE, E PODELL a R ALLEN. Presence and formation of cobalamin analogues in multivitamin-mineral pills. *Journal of Clinical Investigation*. 1982, **70**(4), 889-898. DOI: 10.1172/JCI110685. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: <http://www.jci.org/articles/view/110685>
- [42] TAKENAKA, Shigeo, Sumi SUGIYAMA, Fumio WATANABE, Katsuo ABE, Yoshiyuki TAMURA a Yoshihisa NAKANO. Effects of Carnosine and Anserine on the Destruction of Vitamin B 12 with Vitamin C in the Presence of Copper. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, **61**(12), 2137-2139. DOI: 10.1271/bbb.61.2137. ISSN 0916-8451. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.61.2137>
- [43] PARK, Sohyun a Mary JOHNSON. What is an Adequate Dose of Oral Vitamin B 12 in Older People with Poor Vitamin B 12 Status?. *Nutrition Reviews*. 2006, **64**(8), 373-378. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2006.tb00222.x. ISSN 00296643. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.2006.tb00222.x>

- [44] DOSCHERHOLMEN, A, J MCMAHON a D RIPLEY. Vitamin B12 assimilation from chicken meat. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1978, **31**(5), 825-830. DOI: 10.1093/ajcn/31.5.825. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/31/5/825/4650235>
- [45] BELLOU, A., I. AIMONE-GASTIN, J-D. DE KORWIN, J-P. BRONOWICKI, A. MONERET-VAUTRIN, J-P. NICOLAS, M-A. BIGARD a J-L. GUEANT. Cobalamin deficiency with megaloblastic anaemia in one patient under long-term omeprazole therapy. *Journal of Internal Medicine*. 1996, **240**(3), 161-164. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1996.20846000.x. ISSN 0954-6820. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2796.1996.20846000.x>
- [46] LAM, Jameson, Jennifer SCHNEIDER, Wei ZHAO a Douglas CORLEY. Proton Pump Inhibitor and Histamine 2 Receptor Antagonist Use and Vitamin B 12 Deficiency. *JAMA*. 2013, **310**(22), 2435-2442. DOI: 10.1001/jama.2013.280490. ISSN 0098-7484. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2013.280490>
- [47] VON ERNST MUTSCHLER ... [ET AL.], . *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie*. 9., vollständig neu bearb. und erw. Aufl. Stuttgart: WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2008. ISBN 978-380-4719-521.
- [48] ČEŠKA, Richard, Vladimír TESAŘ, ed. a Petr DÍTĚ, ed., Tomáš ŠTULC, ed. *Interna*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2010. ISBN 978-80-7387-423-0.
- [49] MUDR. VOTAVA, Ph.D., a Ph.D., MUDR. SLÍVA. Hypolipidemika. In: *Medicabaze.cz: lékařské repetitorium online* [online]. Praha: Triton, 2007 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=3292&tname=Hypolipidemika

- [50] PREMKUMAR, M., N. GUPTA, T. SINGH a T. VELPANDIAN. Cobalamin and Folic Acid Status in Relation to the Etiopathogenesis of Pancytopenia in Adults at a Tertiary Care Centre in North India. *Anemia*. 2012, **2012**(2012), 1-12. DOI: 10.1155/2012/707402. ISSN 2090-1267. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/anemia/2012/707402/>
- [51] VILÍMOVSKÝ, Michal. Metformin na léčbu diabetu. In: *Medlicker* [online]. Londýn: Weblicker Ltd., 2014 [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: <https://cs.medlicker.com/696-metformin-na-lecbu-diabetu>
- [52] A comprehensive review of B12 biochemistry, nutrition and metabolism. *Handbook of vitamins*. Fifth edition. Hoboken: CRC Press, 2014, s. 447-489. ISBN 9781466515574.
- [53] Cobalamins and nitrous oxide: a review. *Journal of Clinical Pathology*. 1980, **33**(10), 909-916.
- [54] GREEN, R. a L. KINSELLA. Current concepts in the diagnosis of cobalamin deficiency. *Neurology*. 1995, **45**(8), 1435-1440. DOI: 10.1212/WNL.45.8.1435. ISSN 0028-3878. Dostupné také z: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.45.8.1435>
- [55] O'LEARY, Patrick, Michael COMBS a Robert SCHILLING. Synergistic deleterious effects of nitrous oxide exposure and vitamin B12 deficiency. *Department of Medicine*. 1985, **105**(4), 422-427.
- [56] CARMEL, Ralph. Subclinical cobalamin deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2012, **28**(2), 151-158. DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283505852. ISSN 0267-1379. Dostupné také z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00001574-201203000-00010>
- [57] SHARMA, Gurumayum, Tarun KUMAR, Laishram SINGH a Shantanu SENGUPTA. N-Homocysteinylation Induces Different Structural and Functional Consequences on Acidic and Basic Proteins. *PLoS ONE*. 2014, **9**(12), 116386-. DOI: 10.1371/journal.pone.0116386. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0116386>

- [58] CARMEL, R. Cobalamin, the stomach, and aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1997, **66**(4), 750-759. DOI: 10.1093/ajcn/66.4.750. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/66/4/750/4655894>
- [59] YUEN, Man-Fung a Ching-Lung LAI. Hbsag seroclearance in the natural history of chronic hepatitis b infection. *Current Hepatitis Reports*. 2006, **5**(1), 23-26. DOI: 10.1007/s11901-006-0019-7. ISSN 1540-3416. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11901-006-0019-7>
- [60] CARMEL, R. Update on Cobalamin, Folate, and Homocysteine. *Hematology*. 2003, **2003**(1), 62-81. DOI: 10.1182/asheducation-2003.1.62. ISSN 1520-4391. Dostupné také z: <http://www.asheducationbook.org/cgi/doi/10.1182/asheducation-2003.1.62>
- [61] CARMEL, Ralph. Subtle and atypical cobalamin deficiency states. *American Journal of Hematology*. 1990, **34**(2), 108-114. DOI: 10.1002/ajh.2830340206. ISSN 03618609. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.2830340206>
- [62] GREEN, Ralph. Screening for vitamin B₁₂ Deficiency: Caveat Emptor. *Annals of Internal Medicine*. 1996, **124**(5), 509-511. DOI: 10.7326/0003-4819-124-5-199603010-00009. ISSN 0003-4819. Dostupné také z: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-124-5-199603010-00009>
- [63] ZÁPALOVÁ, Tereza. Perniciózní anémie. In: *Medixa.org* [online]. Chomutov: Medixa s.r.o., 2012 [cit. 2018-04-26]. Dostupné z: <http://cs.medixa.org/nemoci/perniciozni-anemie>
- [64] STABLER, Sally. Vitamin B₁₂ Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2013, **368**(2), 149-160. DOI: 10.1056/NEJMcp1113996. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcp1113996>
- [65] CARMEL, Ralph. Prevalence of Undiagnosed Pernicious Anemia in the Elderly. *Archives of Internal Medicine*. 1996, **156**(10), 1097-1100. DOI: 10.1001/archinte.1996.00040041097008. ISSN 0003-9926. Dostupné také z: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.1996.00040041097008>

- [66] DROR, Daphna a Lindsay ALLEN. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutrition Reviews*. 2008, **66**(5), 250-255. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2008.00031.x. ISSN 00296643. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.2008.00031.x>
- [67] GREEN, Ralph a Denis DWYRE. Evaluation of Macrocytic Anemias. *Seminars in Hematology*. 2015, **52**(4), 279-286. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2015.06.001. ISSN 00371963. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0037196315000554>
- [68] STRAND, T., S. TANEJA, T. KUMAR, M. MANGER, H. REFSUM, C. YAJNIK a N. BHANDARI. Vitamin B-12, Folic Acid, and Growth in 6- to 30-Month-Old Children: A Randomized Controlled Trial. *PEDIATRICS*. 2015, **135**(4), 918-926. DOI: 10.1542/peds.2014-1848. ISSN 0031-4005. Dostupné také z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-1848>
- [69] LINDENBAUM, John, Edward HEALTON, David SAVAGE et al. Neuropsychiatric Disorders Caused by Cobalamin Deficiency in the Absence of Anemia or Macrocytosis. *New England Journal of Medicine*. 1988, **318**(26), 1720-1728. DOI: 10.1056/NEJM198806303182604. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198806303182604>
- [70] LEISHEAR, Kira, Robert BOUDREAU, Stephanie STUDENSKI et al. Relationship Between Vitamin B12 and Sensory and Motor Peripheral Nerve Function in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2012, **60**(6), 1057-1063. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2012.03998.x. ISSN 00028614. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1532-5415.2012.03998.x>
- [71] CLARKE, Robert, Jacqueline BIRKS, Ebba NEXO, Per UELAND, Joern SCHNEEDE, John SCOTT, Anne MOLLOY a John EVANS. Low vitamin B-12 status and risk of cognitive decline in older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, **86**(5), 1384-1391. DOI: 10.1093/ajcn/86.5.1384. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/86/5/1384/4650721>

- [72] VOGIATZOGLOU, Anna, A. SMITH, Eha NURK et al. Cognitive Function in an Elderly Population: Interaction Between Vitamin B12 Status, Depression, and Apolipoprotein E. *Psychosomatic Medicine*. 2013, **75**(1), 20-29. DOI: 10.1097/PSY.0b013e3182761b6c. ISSN 0033-3174.
- [73] LILDBALLE, D., S. FEDOSOV, P. SHERLIKER, H. HIN, R. CLARKE a E. NEXO. Association of Cognitive Impairment with Combinations of Vitamin B12-Related Parameters. *Clinical Chemistry*. 2011, **57**(10), 1436-1443. DOI: 10.1373/clinchem.2011.165944. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2011.165944>
- [74] SMITH, A a Helga REFSUM. Vitamin B-12 and cognition in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **89**(2), 707-711. DOI: 10.3945/ajcn.2008.26947D. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/89/2/707S/4596810>
- [75] YAJNIK, C., S. DESHPANDE, A. JACKSON et al. Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia*. 2007, **51**(1), 29-38. DOI: 10.1007/s00125-007-0793-y. ISSN 0012-186X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-007-0793-y>
- [76] BHATE, V., S. JOSHI, R. LADKAT, U. DESHMUKH, H. LUBREE a KATRE. Vitamin B12 and folate during pregnancy and offspring motor, mental and social development at 2 years of age. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2012, **3**(02), 123-130. DOI: 10.1017/S2040174411000778. ISSN 2040-1744.
- [77] BHATE, Vidya, Swapna DESHPANDE, Dattatray BHAT et al. Vitamin B 12 Status of Pregnant Indian Women and Cognitive Function in their 9-year-old Children. *Food and Nutrition Bulletin*. 2008, **29**(4), 249-254. DOI: 10.1177/156482650802900401. ISSN 0379-5721. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/156482650802900401>

- [78] STRAND, Tor, Sunita TANEJA, Per UELAND, Helga REFSUM, Rajiv BAHL, Joern SCHNEEDE, Halvor SOMMERFELT a Nita BHANDARI. Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12–18 mo of age. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013, **97**(2), 310-317. DOI: 10.3945/ajcn.111.032268. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/97/2/310/4577026>
- [79] BIEMANS, Elke, Huberta HART, Guy RUTTEN, Viviana CUELLAR RENTERIA, Antoinette KOOIJMAN-BUITING a Joline BEULENS. Cobalamin status and its relation with depression, cognition and neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus using metformin. *Acta Diabetologica*. 2015, **52**(2), 383-393. DOI: 10.1007/s00592-014-0661-4. ISSN 0940-5429. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00592-014-0661-4>
- [80] SATO, Yoshihiro, Yoshiaki HONDA, Jun IWAMOTO, Tomohiro KANOKO a Kei SATOH. Effect of Folate and Mecobalamin on Hip Fractures in Patients With Stroke. *JAMA*. 2005, **293**(9), 1082-1088. DOI: 10.1001/jama.293.9.1082. ISSN 0098-7484. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.293.9.1082>
- [81] MCLEAN, Robert, Paul JACQUES, Jacob SELHUB et al. Plasma B Vitamins, Homocysteine, and Their Relation with Bone Loss and Hip Fracture in Elderly Men and Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008, **93**(6), 2206-2212. DOI: 10.1210/jc.2007-2710. ISSN 0021-972X. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2007-2710>
- [82] PARK, Sohyun, Mary JOHNSON, Kelly SHEA-MILLER, Albert CHICCHIS, Robert ALLEN a Sally STABLER. Age-Related Hearing Loss, Methylmalonic Acid, and Vitamin B 12 Status in Older Adults. *Journal of Nutrition For the Elderly*. 2007, **25**(3-4), 105-120. DOI: 10.1300/J052v25n03_08. ISSN 0163-9366. Dostupné také z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J052v25n03_08
- [83] GOPINATH, Bamini, Victoria FLOOD, Elena ROCHTCHINA, Jie WANG a Paul MITCHELL. Homocysteine, folate, vitamin B-12, and 10-y incidence of age-related

- macular degeneration. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2013, **98**(1), 129-135. DOI: 10.3945/ajcn.112.057091. ISSN 0002-9165. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/98/1/129/4578313>
- [84] VOKURKA, Martin a JAN HUGO A KOLEKTIV. *Velký lékařský slovník*. 8., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2008. ISBN 978-807-3451-660.
- [85] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- [86] BURGESS, Catherine, Eddy SMID a Douwe VAN SINDEREN. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: An overview. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, **133**(1-2), 1-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.012. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160509002244>
- [87] LEBLANC, J.G., J.E. LAIÑO, M. DEL VALLE et al. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria - current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, **111**(6), 1297-1309. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x>
- [88] CAPOZZI, Vittorio, Pasquale RUSSO, María DUEÑAS, Paloma LÓPEZ a Giuseppe SPANO. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012, **96**(6), 1383-1394. DOI: 10.1007/s00253-012-4440-2. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4440-2>
- [89] NOUT, M.J.R. a F.M. ROMBOUTS. Recent developments in tempe research. *Journal of Applied Bacteriology*. 1990, **69**(5), 609-633. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01555.x. ISSN 00218847. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01555.x>
- [90] MOORE, Simon J. a Martin J. WARREN. The anaerobic biosynthesis of vitamin B 12. *Biochemical Society Transactions*. 2012, **2012**(40), 581-586. DOI:

10.1042/BST20120066. Dostupné také z:
<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST20120066>

- [91] MUROOKA, Yoshikatsu, Yongzhe PIAO, Pornpimon KIATPAPAN a Mitsuo YAMASHITA. Production of tetrapyrrole compounds and vitamin B12 using genetically engineering of *Propionibacterium freudenreichii*. An overview. *Le Lait*. 2005, **85**(1-2), 9-22. DOI: 10.1051/lait:2004035. ISSN 0023-7302. Dostupné také z: <http://www.edpsciences.org/10.1051/lait:2004035>
- [92] YIN, L. a C. BAUER. Controlling the delicate balance of tetrapyrrole biosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013, **368**(1622), 20120262-20120262. DOI: 10.1098/rstb.2012.0262. ISSN 0962-8436. Dostupné také z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2012.0262>
- [93] ESCALANTE-SEMERENA, J. Conversion of Cobinamide into Adenosylcobamide in Bacteria and Archaea. *Journal of Bacteriology*. 2007, **189**(13), 4555-4560. DOI: 10.1128/JB.00503-07. ISSN 0021-9193. Dostupné také z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00503-07>
- [94] MARTENS, H. Microbial production of vitamin B 12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, **2001**(58), 275-285. DOI: 10.1007/s00253-001-0902-7. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-001-0902-7>
- [95] MARTIN, Vincent, Douglas PITERA, Sydnor WITHERS, Jack NEWMAN a Jay KEASLING. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology*. 2003, **2003**(21), 796-802. DOI: 10.1038/nbt833. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nbt833>
- [96] ZHANG, K., M. SAWAYA, D. EISENBERG a J. LIAO. Expanding metabolism for biosynthesis of nonnatural alcohols. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(52), 20653-20658. DOI: 10.1073/pnas.0807157106. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0807157106>
- [97] CHOI, So, Si PARK, Won KIM, Jung YANG, Hyuk LEE, Jihoon SHIN a Sang LEE. One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in

- Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. 2016, **2016**(34). DOI: 10.1038/nbt.3485. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nbt.3485>
- [98] ROTH, JR, JG LAWRENCE a TA BOBIK. COBALAMIN (COENZYME B 12): Synthesis and Biological Significance. *Annual Review of Microbiology*. 1996, **50**(1), 137-181. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.137. ISSN 0066-4227. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.50.1.137>
- [99] CAMPBELL, G., M. TAGA, K. MISTRY, J. LLORET, P. ANDERSON, J. ROTH a G. WALKER. Sinorhizobium meliloti bluB is necessary for production of 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(12), 4634-4639. DOI: 10.1073/pnas.0509384103. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509384103>
- [100] COLLINS, Hannah, Rebekka BIEDENDIECK, Helen LEECH et al. Bacillus megaterium Has Both a Functional BluB Protein Required for DMB Synthesis and a Related Flavoprotein That Forms a Stable Radical Species. *PLoS ONE*. 2013, **8**(2), 55708-. DOI: 10.1371/journal.pone.0055708. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055708>
- [101] GRAY, M. a J. ESCALANTE-SEMERENA. Single-enzyme conversion of FMNH₂ to 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, **104**(8), 2921-2926. DOI: 10.1073/pnas.0609270104. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0609270104>
- [102] STAROSTKOVÁ, Pavlína. *Využití bakterií rodu Lactobacillus v genetickém inženýrství* [online]. Zlín, 2013 [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: <http://digilib.k.utb.cz/handle/10563/25215>. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [103] WILLIAM HORWITZ, editor a assistant GEORGE W. LATIMER. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18th ed., 2005. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2007. ISBN 09-355-8478-1.

- [104] ESTEVE, M.J, R FARRÉ, A FRÍGOLA a C PILAMUNGA. Contents of vitamins B1, B2, B6, and B12 in pork and meat products. *Meat Science*. 2002, **62**(1), 73-78. DOI: 10.1016/S0309-1740(01)00230-3. ISSN 03091740. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174001002303>
- [105] LEENHEER, A., Willy LAMBERT a Jan VAN BOCXLAER. *Modern chromatographic analysis of vitamins*. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 2000. Chromatographic science, v. 84. ISBN 08-247-0316-2.
- [106] ORTIGUES-MARTY, Isabelle, Emilie THOMAS, D.P. PRÉVÉRAUD, Christiane GIRARD, D. BAUCHART, D. DURAND a A. PEYRON. Influence of maturation and cooking treatments on the nutritional value of bovine meats: Water losses and vitamin B12. *Meat Science*. 2006, **73**(3), 451-458. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.01.003. ISSN 03091740. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174006000283>
- [107] SCHELLEKENS, Mia. New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science & Technology*. 1996, **7**(8), 256-262. DOI: 10.1016/0924-2244(96)10027-3. ISSN 09242244. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224496100273>
- [108] BENNINK, M. a K. ONO. Vitamin B 12 , E and D Content of Raw and Cooked Beef. *Journal of Food Science*. 1982, **47**(6), 1786-1792. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb12883.x. ISSN 0022-1147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.1982.tb12883.x>
- [109] CROSS, Gwendolyn, Daniel FUNG a Robert DECAREAU. The effect of microwaves on nutrient value of foods. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2009, **16**(4), 355-381. DOI: 10.1080/10408398209527340. ISSN 0099-0248. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398209527340>
- [110] WATANABE, Fumio, Katsuo ABE, Tomoyuki FUJITA, Mashahiro GOTO, Miki HIEMORI a Yoshihisa NAKANO. Effects of Microwave Heating on the Loss of Vitamin B 12 in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**(1), 206-

210. DOI: 10.1021/jf970670x. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970670x>
- [111] CREED, Philip. The sensory and nutritional quality of ‘sous vide’ foods. *Food Control*. 1995, **6**(1), 45-52. DOI: 10.1016/0956-7135(95)91453-R. ISSN 09567135. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/095671359591453R>
- [112] FORESTELL, Catherine, Andrea SPAETH a Stephanie KANE. To eat or not to eat red meat. A closer look at the relationship between restrained eating and vegetarianism in college females. *Appetite*. 2012, **58**(1), 319-325. DOI: 10.1016/j.appet.2011.10.015. ISSN 01956663. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195666311006271>
- [113] MCAFEE, Alison, Emeir MCSORLEY, Geraldine CUSKELLY, Bruce MOSS, Julie WALLACE, Maxine BONHAM a Anna FEARON. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science*. 2010, **84**(1), 1-13. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.08.029. ISSN 03091740. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174009002514>
- [114] MCNEILL, Shalene a Mary VAN ELSWYK. Red meat in global nutrition. *Meat Science*. 2012, **92**(3), 166-173. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.03.014. ISSN 03091740. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174012001088>
- [115] YOSHINO, Kaori, Mieko INAGAWA, Miyuki OSHIMA et al. Trends in Dietary Intake of Folate, Vitamins B6, and B12 among Japanese Adults in Two Rural Communities from 1974 through 2001. *Journal of Epidemiology*. 2005, **15**(2), 29-37. DOI: 10.2188/jea.15.29. ISSN 0917-5040. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jea/15.29?from=CrossRef>