สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้ง โรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองโดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii TISTR 446

นาย สุพจิต สุขกันตะ
นางสาว สุภี เผ่าสามมุข
นางสาว ปภาวณี ตรงสวัสดิ์

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2541

ปพ. ส826ก 2541
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33514
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Vitamin B_{12} from Waste Water Of Soybean Sauce Factory By Propionibacterium freudenreichii TISTR 446

Mr. Supajit Sukkunta
Miss Supee Phosammuk
Miss Paphawanee Trongsawat

A Special Project Submitted in Partial Fuifillment of the Requirement
For the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut ' s Institute of Technology Ladkrabang
1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii TISTR 446
โดย	นาย สุพจิต สุขก้นตะ
	นางสาว สุภี เผ่าสามเมฆ
	นางสาว ปภาวณี ตรงสวัสดิ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

(อ. กุลวดี ทองภูเบศร์) ประธานกรรมการ

(รศ. สุขใจ ชูจันทร์) กรรมการ

(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446

โดย นาย สุพจิต สุขกันตะ
นางสาว สุภี เผ่าสามมุข
นางสาว ปภาวณี ตรงสวัสดิ์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* พบว่าน้ำทิ้งของกระบวนการหมักซอสถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมทั้งแหล่งโปรตีนและคาร์บอน โดยจากการตรวจวิเคราะห์พบว่าโปรตีนในน้ำทิ้งเท่ากับ 0.68 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนในรูปน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 2.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าบีโอดีเท่ากับ 36,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าซีโอดีเท่ากับ 60,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าพีเอชของน้ำทิ้งเท่ากับ 4.1 จากการตรวจวิเคราะห์วิตามินบี 12 แบบวิธี Turbidimetric Method of Microbiological Assay โดยใช้เชื้อ *Lactobacilius leichmannii* เป็นตัวทดสอบพบว่า ผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ทั้งในถังหมักและ Stationary flask ขนาด 2 ลิตรเท่ากัน โดยใช้กลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 2.0 เปอร์เซ็นต์ และโคบอลต์ซัลเฟต ($CoSO_4$) 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเติมในน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหารดังกล่าวในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักในถังหมัก สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0044 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนใน Stationary flask สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุดเท่ากับ 0.0036 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตวิตามินบี 12 ใน Complete medium ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสที่ใช้เท่ากับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด0.5 เปอร์เซ็นต์ และโคบอลต์ซัลเฟต ($CoSO_4$) 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งสองแบบพบว่า ปริมาณวิตามินบี 12 ในภายในถังหมัก มีค่าเท่ากับ 0.0042 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และใน Stationary flask มีค่าเท่ากับ 0.0020 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าสามารถใช้น้ำทิ้งมาผลิตวิตามินบี 12 ได้ปริมาณที่สูงกว่าการใช้อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Complete medium จึงสามารถยืนยันได้ว่าสามารถใช้น้ำทิ้งจากโรงงาน อุตสาหกรรมอาหารมาใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ได้ดีกว่าใช้อาหาร Complete medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Production Production of Vitamin B_{12} from Waste Water of Soybean Sauce Factory by *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446
Name	Mr. Supajit Sukkunta Miss Supee Phosammuk Miss Paphawanee Trongsawat
Special Project Advisor	Associate Professor Sukjai Choojan
Department	Applied biology
Academic Year	1998

Abstract

Waste water from soybean sauce fermentation was found in this study as protein and carbon sources. Analyses of waste water showed that the protein content was 0.68 percent, carbon in reducing sugar form was 2.611 milligram per millilitre , BOD and COD were 36,000 and 60,000 milligram per litre , respectively; while the initial pH was 4.1 . Turbidimetric Method of Microbiological assay was used to detect vitamin B_{12} produced by *Lactobacillus leichmannii*_ . Productions of vitamin B_{12} were compared between in fermenter and in stationay flask of two litre , in both cases. Glucose yeast extract and $CoSO_4$ in the amounts of 0.5 percent , 2.0 percent and 2.0 milligram per millilitre , respectively , were added in the waste water . It was found that at the 96 hours incubation, the biggest velues of vitamin B_{12} were produced in fermenter and in stationary flask (0.0044 and 0.0036 microgram per gram cell dry weight , respectively). When comparing the two incubation condition in complete medium (1.0 percent glucose, 0.5 percentand yeast extract and 12.0 milligram per litre $CoSO_4$) , it was found that the amount of vitamin B_{12} produced in fermenter and in stationary flask were 0.0042 and 0.0020 microgram per gram cell dry weight ,respectively .The results of these experiments , therefore, indicates that waste water from soybean sauce fermentation is more suitable than complete

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

medium for vitamin B_{12} production . Therefore, waste water from food factories should be promoted for vitamin B_{12} production instead of using complete medium for the same purpose .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและช่วยเหลือของบุคคลดังต่อไปนี้

1. รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขเอกสารให้
2. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง
3. บริษัท ง่วนเชียงอุตสาหกรรมอาหาร จำกัดที่อนุเคราะห์น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง
4. เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และ เจ้าหน้าที่ธุรการภาคทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกต่างๆ

และขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษรวมถึงการจัดพิมพ์เอกสารจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
- ประวัติและสูตรโครงสร้างของวิตามินบี 12	3
- รูปแบบและการผลิตวิตามินบี 12 ภายในจุลินทรีย์	6
- ลักษณะ รูปร่าง และคุณสมบัติของเชื้อ Propionibacterium spp.	7
- ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.	13
- วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12	30
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	41
- การศึกษาการเจริญของเชื้อ เชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร complete medium ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะ Stationary flask	43
- การศึกษาน้ำหนักแห้งของเซลล์กับค่าความขุ่นของเชื้อที่ 660 นาโนเมตร	44
- การศึกษาผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium และน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหารใน Stationary flask และ ถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	45
- การศึกษาการคำนวณโดยใช้กราฟของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12	46
- การศึกษาปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหาร Complete medium กับน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหาร ใน Stationary flask และ ถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	47
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก : ตารางแสดงผลการทดลอง 49

ภาคผนวก ข : อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 55

ภาคผนวก ค : แผนภาพแสดงวิธีการวิเคราะห์ 59

ภาคผนวก ง : รูปประกอบการทดลอง 65

ภาคผนวก จ : แผนภาพกระบวนการผลิตซีอิ๊ว 69

เอกสารอ้างอิง 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	แสดงอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	10
ตารางที่ 2.2	แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนและปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	11
ตารางที่ 2.3	แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	11
ตารางที่ 2.4	แสดงอิทธิพลของสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	12
ตารางที่ 2.5	แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ATCC 13673	15
ตารางที่ 2.6	แสดงการผลิตวิตามินบี12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	18
ตารางที่ 2.7	แสดงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรม	18
ตารางที่ ก 1	แสดงผลการเจริญของ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน Stationary flask	49
ตารางที่ ก 2	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium กับน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหาร ระหว่าง Stationary flask และถังหมัก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	50
ตารางที่ ก 3	แสดงค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12	51
ตารางที่ ก 4	แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตโดย Propionibacterium freudenreichii ใน Complete medium ระหว่าง Stationary flask และ ถังหมัก	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ ก 6	แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามนบี 12 ที่ผลิตโดย Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองระหว่าง Stationary flask และ ถังหมัก	53
ตารางที่ ก 7	แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium และน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหารใน Stationary flask และ ถังหมัก	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1	แสดงโครงสร้างวิตามินบี 12 และสารประกอบที่เกี่ยวข้องที่เกี่ยวข้อง	5
รูปที่ 2.2	แสดงส่วนประกอบหลักของโครงสร้างโคบามีน	6
รูปที่ 2.3	แสดงการย่อยสลายของน้ำตาลกลูโคสโดย Propionic acid bacteria	8
รูปที่ 2.4	แสดงเส้นทางทั่วไปสำหรับชีวสังเคราะห์วิตามินบี 12	22
รูปที่ 2.5	แสดงโครงสร้างสารสำคัญในเส้นทางการสังเคราะห์วิตามินบี 12	23
รูปที่ 2.6	แสดงโครงสร้างเคมี พอร์ไฟรินส์ (Porphyrins)	25
รูปที่ 2.7	แสดงการปรับปรุงสายพันธุ์ของ Pseudomonas denitrificans สารกลายพันธุ์ได้แก่ 1. UV 2.Ethyleneimine 3. Nitrosomethyluretane 4 – 7. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine 8,10 UV-bromouracil 9 ,11 psoraiene near UV light	25
รูปที่ 2.8	กระบวนการแยกวิตามินบี 12 ให้บริสุทธิ์	27
รูปที่ 4.1	แสดงการเจริญของ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium ที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน Stationary flask	43
รูปที่ 4.2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) กับความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	44
รูปที่ 4.3	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium และน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหารใน Stationary flask และถังหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	45
รูปที่ 4.4	แสดงค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรและปริมาณวิตามนบี 12 ของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12	46
รูปที่ 4.5	แสดงปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหาร Complete medium และน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่ทำการเติมสารอาหารในStationary flask และถังหมัก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ ง 1	แสดงน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองก่อนเติมสารอาหาร และหลังเติมสารอาหาร	66
รูปที่ ง 2	แสดง Stock culture ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12	67
รูปที่ ง 3	แสดง Stock culture ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii ที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12	68
รูปที่ ง 4	แสดงถังหมักขนาด 2 ลิตร	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

วิตามิน B_{12} เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตที่จะขาดเสียไม่ได้ โดยเฉพาะในคน วิตามินนี้จะพบในตับซึ่งจะช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง คนต้องการวิตามินชนิดนี้น้อยแต่ถ้าขาดจะทำให้เป็นโรคโลหิตจาง

วิตามิน B_{12} มีสูตรโมเลกุลว่า $C_{63}H_{88}O_{14}PC_0$ เรียกสั้น ๆ ว่า Cyanocobalamin มีลักษณะเป็นผลึกสีแดงเข้มรูปเข็มหรือปริซึม วิตามินชนิดนี้มีความสำคัญหลายด้านทั้งทางแพทย์ เภสัชกรรม และทางการเกษตร โดยจะใช้เป็นตัวป้องกันโรคโลหิตจางยาบำรุง ส่วนประกอบต่าง ๆ ของยา และใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนในสัตว์และใช้วิตามินนี้เป็น Growth Factor ในการเลี้ยงจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Lactobacillus lactis ตลอดจนสาหร่ายชั้นต่ำ

ปัจจุบันการผลิตวิตามิน B_{12} ทางเคมีจะทำได้ยาก เนื่องจากมีปฏิกิริยาซับซ้อนจึงมีผู้นิยมที่จะผลิตจากจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีต้นทุนที่ต่ำและควบคุมได้ง่าย การสังเคราะห์ส่วนใหญ่จะได้มาจากแบคทีเรีย สำหรับสายพันธุ์ที่สามารถผลิตได้สูงได้แก่ Propionibacterium sp. Pseudomonas sp. ดังนั้นจึงใช้เชื้อ Propionibacterium sp. TISTR 446 ในการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการผลิตวิตามิน B_{12} ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร เปรียบเทียบกับ Stationary flask

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมที่จะผลิตวิตามิน B_{12} ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ระหว่าง Stationary flask กับ ถังหมัก
2. เพื่อศึกษาว่าเชื้อ Propionibacterium freudenreichii TISTR 446 สามารถผลิตวิตามิน B_{12} ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซอสถั่วเหลือง ในสภาวะถังหมักขนาด 2 ลิตรโดยดูจากปริมาณวิตามิน B_{12} ที่เกิดขึ้นว่าเหมาะสมสำหรับการขยายขนาด เพื่อผลิตเป็นอุตสาหกรรมต่อไป

ประโยชน์ที่จะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีการผลิตวิตามิน B_{12}
2. เพื่อใช้เป็นแนวทางหาความเป็นไปได้สำหรับการผลิตวิตามิน B_{12} ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป
3. เพื่อลดค่าใช้จ่ายสำหรับการที่จะสั่งซื้อวิตามิน B_{12} จากต่างประเทศ เนื่องจากสามารถผลิตใช้ได้เองภายในประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
การตรวจเอกสาร

วิตามิน บี 12
(Cyanocobalamin)

เป็นวิตามินตัวล่าสุดในกลุ่ม B complex ที่พบมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มหรือรูปปริซึม สีแดงเข้ม ละลายน้ำได้ มีความสำคัญทางการแพทย์ โภชนาการของมนุษย์และสัตว์ ทางการแพทย์ถ้าขาดจะทำให้เกิดโรคโลหิตจาง ใช้รักษาโรคโลหิตจางชนิด megaloblastic anemia macrocytic anemia และ pernicious anemia สำหรับ pernicious anemia ไม่ได้เกิดจากการขาดวิตามิน บี 12 แต่เกิดจากร่างกายดูดซึมวิตามินบี 12 ได้ไม่ดีเพราะเยื่อหุ้มกระเพาะไม่สามารถสังเคราะห์ mucopolysaccharide ชนิดหนึ่ง ดังนั้นต้องให้ในปริมาณที่มากเกินพอ ส่วนทางโภชนาการใช้เป็นอาหารเสริมวิตามินในสัตว์ สัตว์ปีก สุกรและคน เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์ในปัจจุบันใช้ถั่วเหลืองเป็นอาหารหลักของสัตว์ ถั่วเหลืองมีวิตามิน บี 12 ต่ำมาก น้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อกรัม จึงต้องเสริมโดยใช้วิตามิน บี 12 ร่วมกับยาปฏิชีวนะเช่น chlotetracyclin chloramphenical จะช่วยเพิ่มความต้านทานโรค ป้องกันโลหิตจาง เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและลดอัตราการเสียชีวิต วิตามิน บี 12 พบมากในเนื้อสัตว์ ปลา และผลิตภัณฑ์นม และมีน้อยมากในผักและธัญพืช ปัจจุบันมุ่งในด้านเป็นอาหารเสริมของสัตว์ เติมวิตามิน บี 12 ปริมาณ 10 - 15 มิลลิกรัมต่ออาหารหนึ่งตัน ร่างกายคนเราที่โตเจริญเต็มที่ต้องการวิตามิน บี 12 ปริมาณ 3 - 5 ไมโครกรัมต่อวัน วิตามิน บี 12 มีบทบาทเกี่ยวกับการเคลื่อนย้าย alkyl group ตัวอย่างเช่น ย้าย methyl malonyl CoA ไปเป็น succiyl CoA glutamic acid ไปเป็น β - methyl aspartic acid

สูตรโครงสร้าง

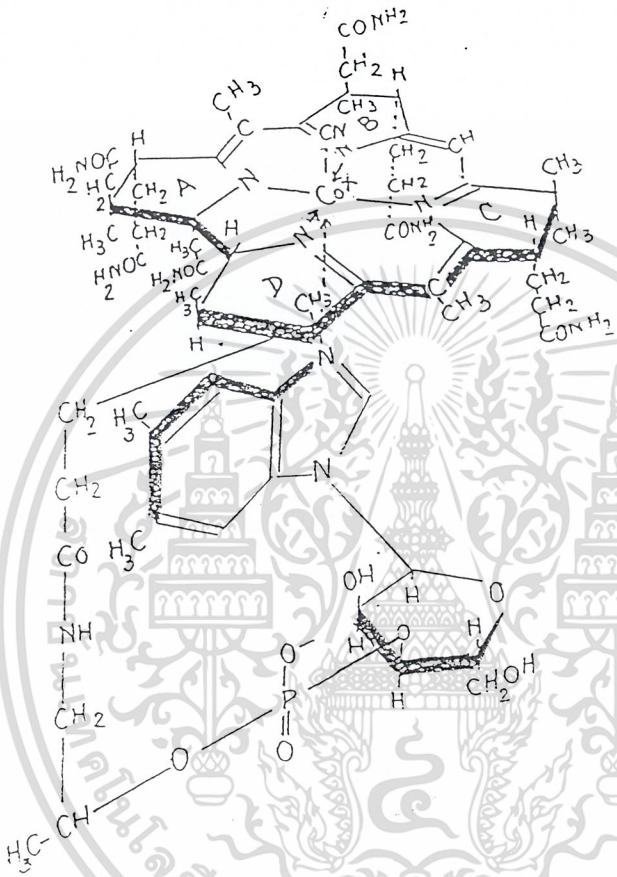
วิตามินบี 12 มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลซับซ้อนมากว่าวิตามินอื่น ๆ Hodgkin และคณะ ได้ศึกษาโครงสร้างวิตามินบี 12 จนเป็นผลสำเร็จโดยใช้ X - ray crystallographic analysis สูตรโครงสร้างของวิตามินบี 12 แสดงในรูปที่ 2.1 ส่วนสูตรทางเคมีคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$C_{63}H_{88}O_{14}N_{14}PCo$ มีชื่อทางเคมีว่า 5,6 - dimethylbenzimidazolyl cobamide cyanide หรือเรียกสั้น ๆ ว่า cyanocobalaminโมเลกุลของวิตามินบี 12 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ porphyrin like planar และ nucleotide side chain ส่วน porphyrin like planar group เป็นส่วนแกนกลางโครงสร้างที่เรียกว่า corrin ring หรือ corrinoid ซึ่งประกอบด้วย 4 pyrrole ring เชื่อมกัน โดยมีโคบอลท์เป็นแกนกลาง ส่วน nucleotide side chain คือ 5,6-dimethylbenzimidazol เชื่อมกับ corrin ring 2 ส่วนคือ phosphoric acid ของ nucleotide จะเชื่อมกับ propioramide group ของ ring D ด้วย aminopropanol bridge และ nitrogen ของ nucleotide จะ co-ordinate กับอะตอมโคบอลท์ในแนวเกือบตั้งฉากกับ corrin ring ซึ่งพันธะจะถูกทำลายได้ง่าย เช่นเมื่อเติม cyanide ลงไป จะได้สารประกอบที่เรียกว่า cyanocobaramin

ปกติวิตามินบี 12 ที่ผลิตขึ้นมานั้นจะผลิตในรูป cyanocobaramin ซึ่งมีคุณสมบัติค่อนข้างอยู่ตัวกว่า cobalamin ในรูปอื่น ๆ ดังนั้นวิตามินบี 12 ที่เรียกกันทั่วไปหมายถึง cyanocobaramin แต่อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติ การสังเคราะห์วิตามินบี12โดยจุลินทรีย์จะอยู่ในรูป coenzyme B_{12} (cobamide coenzyme) ซึ่งอาจมี 5'-deoxy adenosine หรือ methyl group แทนที่จะเป็น cyanide group นอกจากนี้อาจจะพบ cobalamin อยู่ในรูป hydroxocobalamin ซึ่งมี hydroxyl group แทนที่ cyanide หรือ nitrocobalamide ซึ่งมี nitrogen แทนที่ cyanide สำหรับส่วนของ 5,6-dimethylbenzimidazol อาจถูกแทนที่ได้โดย nitrogenus base อื่น ๆ เช่น adenine 2-methyl adenine หรือ guanine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างวิตามินบี 12 และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง

Trivial names and abbreviations are given in parentheses.

L = CN : 6 - (5,6-dimethylbenzimidazole) cobamide cyanide or cyanocobalamin (vitamin B_{12} : CNB_{12} ; cyano-B-12)

L = 5'deoxyadenosyl group : 6 - (5,6-dimethylbenzimidazolyl)- Co-5'-deoxyadenosylcobamide or5'-deoxyadenosylcobalam (vitamin B_{12} coenzyme; 5,6-dimethyl benzimidazolecobamide coenzyme, DBCC, 5'-deoxyadenosy-B_{12})

L = CH_3 : 6-(5,6-dimethylbenzimidazolyl) -Co-methylcobamide or methylcobalamin (CH_3B_{12}) ; methyl-B_{12})

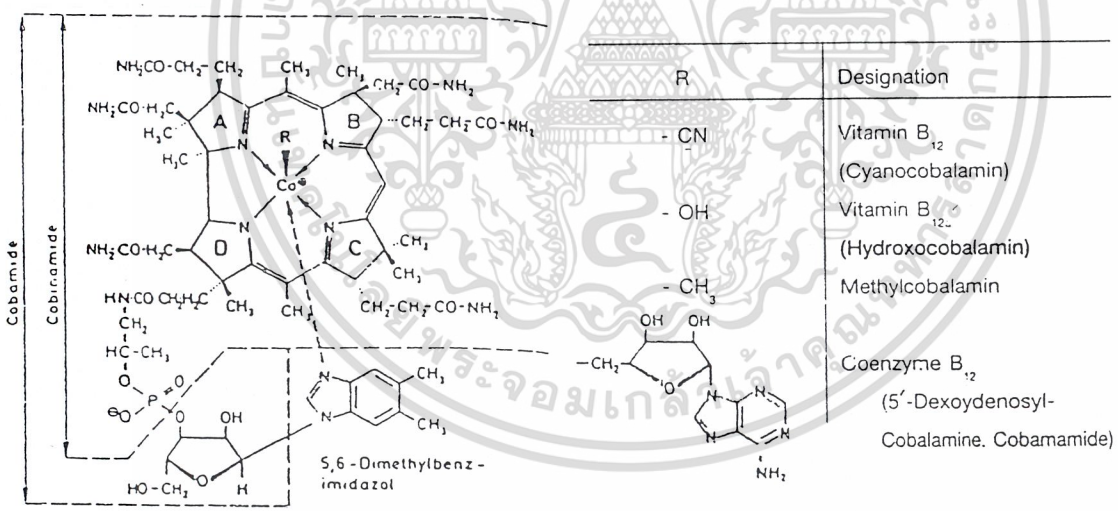
L = OH : 6 - (5,6-dimethy benzumidazolyl) hydroxocobamide or hydroxocobalamin (OH-B_{12} B_{12b})

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบของวิตามินบี 12 ที่สร้างโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สร้างวิตามินบี 12 รูปของโคเอนไซม์บี 12 (Sifa, 1964) หรือ 5′–deoxy-adenosyl cobalamine นอกจากนั้นก็ยังพบในรูปของเมทิลโคบาลามิน (methyl cobalamine) และในกรณีจุลินทรีย์ที่เป็นพวกต้องการอากาศอาจพบไฮดรอกโซโคบาลามิน (hydroxocobalamine) แต่วิตามินทั้ง 3 รูปนี้ไม่คงตัว

ส่วนวิตามินที่รับประทานในรูปของไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamine) เป็นการสกัดวิตามินบี 12 รูปต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นด้วยโพแทสเซียมไซยาไนด์ หรือโซเดียมไซยาไนด์ ให้โคเอนไซม์วิตามินบี 12 ที่เซลล์สร้างเปลี่ยนมาเป็นรูปไซยาโนโคบาลามินที่คงตัวและร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่ โครงสร้างของวิตามินบี 12 ในรูปต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นดูได้จากรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบหลักของโครงสร้างโคบาลามีน

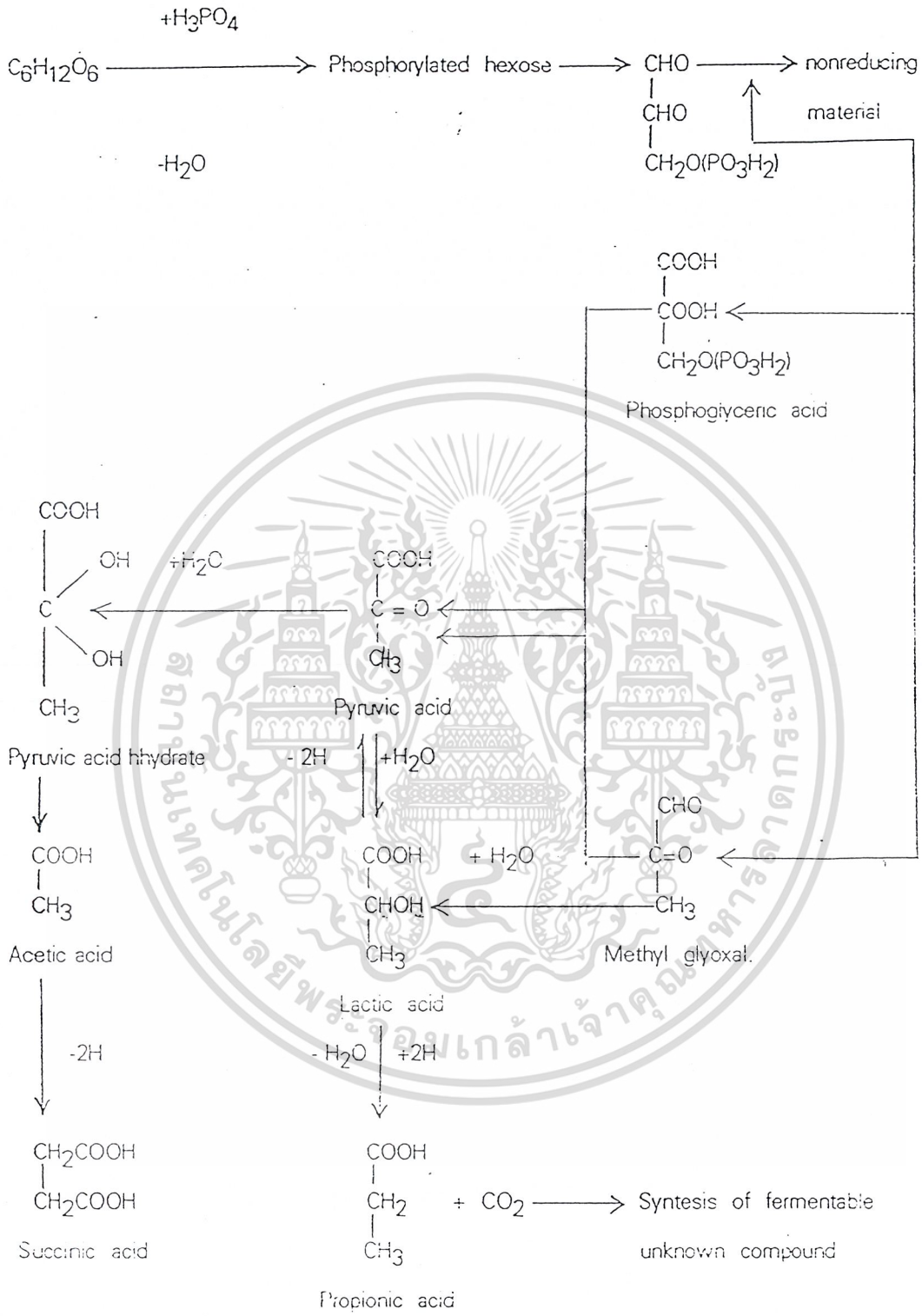
ที่มา : ดัดแปลงจาก Florent และ Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.

Propionibacterium freudenreichii (Buchananและคณะ.,1974) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จาก dairy product, นมดิบ และ swiss cheese เมื่อเชื้อเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic) จะมีรูปร่างกลม และขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอนมักอยู่เป็นคู่หรือสายสั้น ๆ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic) รูปร่างอาจเป็น club – shape และ branched หรือเป็นท่อนยาวที่ไม่เคลื่อนที่ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์และสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสให้ผลการย่อยสลายเป็นบวก เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (au-tolurent) แต่สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ สามารถหมักกรดแลคติก คาร์โบไฮเดรต และกรดไพรูวิกได้ กรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติก คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในที่ที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) หรือมีอากาศในปริมาณเล็กน้อยได้ (Microaerophillic condition) ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการพ่นอากาศลงไปในถังหมัก การเลือกใช้ Propionic acid bacteria ในกระบวนการหมักมีประโยชน์มาก เพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนกรด เนื่องจากมี propionic acid เกิดขึ้นทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อซึ่งมักเกิดกับการหมักธรรมดา การที่สามารถลดการปนเปื้อนได้นั้นเพราะว่าระหว่างการหมักในสภาพที่ไม่มีอากาศนั้นแคลเซียมโพรพิโอเนท จะทำหน้าที่เป็นตัวจำกัดการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา แต่ไม่เป็นพิษกับ Propionic acid bacteria (Noyes, 1969; Woodและคณะ., 1937) ได้แสดงการย่อยสลายของน้ำตาลกลูโคสโดย Propionic acid bacteria ตามแผนภาพรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงการย่อยสลาย (Dissimilation) ของน้ำตาลกลูโคสโดย Propionic acid bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hargrove และ Leviton (1951) ได้ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Propionic acid bacteria จาก Propionibacterium freudenreichii และ Propionibacterium shermanii ในอาหารเฉพาะปรากฏว่าให้วิตามินบี 12 จาก Propionibacterium freudenreichii 6 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่จาก Propionibacterium shermanii จะได้ปริมาณต่ำกว่ามาตราฐานทางอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าต่อไป เพื่อให้ผลิตวิตามินบี 12 ได้มากขึ้นโดยปรับความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและอื่น ๆ ดังนี้

1. เติม $CoCl_2.6H_2O$ 15 มิลลิกรัมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 12 วันได้ปริมาณวิตามินบี 12 จาก Propionibacterium freudenreichii และ Propionibacterium shermanii 100 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ
2. ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้กรดแลคติก 10 กรัมแทน แดรกซ์โทส 20 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วันได้ปริมาณวิตามินบี 12 จาก Propionibacterium freudenreichii และ Propionibacterium shermanii 100 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ

ศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติก โดยใช้ basal medium ที่ประกอบด้วย skim milk 1 ส่วน, whey solid 1ส่วน, น้ำ 2 ส่วน, และ $CoCl_2.6H_2O$ 15 มิลลิกรัม ต่อลิตร เติมเชื้อแล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.1

ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ การให้อาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ การให้สภาวะที่เหมาะสม เป็นผลให้การหมักเกิดได้เร็วและพบว่าในการทดลองนี้ใช้กรด แลคติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0.5 – 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 10 วัน พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 คือ 1.5 – 2 เปอร์เซ็นต์ซึ่งได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงถึง 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.2

ศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ basal medium แล้วทำการถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 8 วัน ปรับพีเอชทุกวัน ดังแสดงผลในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาอิทธิพลของสารประกอบไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันโดยใช้ ยีสต์สกัด และ เนื้อสกัด เป็นแหล่งไนโตรเจนและมีปัจจัยอื่น ๆ ที่จุลินทรีย์ต้องการถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5 วันได้ผลดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติก ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เชื้อเริ่มต้น	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	Propionibacterium shermanii	100
2	Propionibacterium shermanii + Lactobacillus bulgalicus	153
3	Propionibacterium shermanii + Stretomyces shermophilus	223
4	Hasen lactic starter	146
5	Propionibacterium freudenreichii	84
6	Propionibacterium freudenreichii +Lactobacillus bulgalicus	352
7	Propionibacterium freudenreichii + Streptomyces shermophilus	175
8	Propionibacterium shermanii + Hasen lactic starter	350

ที่มา : Perlman และคณะ., 1960

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	ปริมาณกรดแลคติค (เปอร์เซ็นต์)	เชื้อเริ่มต้น	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	0.5	Propionibacterium freudenreichii	84
2	1.0	Propionibacterium freudenreichii	84
3	1.5	Propionibacterium freudenreichii	84
4	2.0	Propionibacterium freudenreichii	84
5	0.5	Propionibacterium shermanii	100
6	1.0	Propionibacterium shermanii	100
7	1.5	Propionibacterium shermanii	100
8	2.0	Propionibacterium shermanii	100

ที่มา: Perlman และคณะ ., 1960

ตารางที่ 2.3 แสดงอิทธิพลของ ออกซิเจน ต่อกระบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	สภาวะ	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	Anarobic	560
2	Micro-aerophillic	800
3	Aerobic	23

ที่มา : Perlman และคณะ ., 1960

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แสดงอิทธิพลของสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เปอร์เซ็นต์วิตามินบี 12				ไมโครกรัม ต่อ3ลิตร
	Yeast Extract	Beef Extract	Sodium Lactate	N-Z amide	
1	0.4	-	1.0	-	300
2	0.4	-	1.0	0.51.0	330
3	0.4	-	1.0	1.0	430
4	-	0.3	1.0	1.0	390
5	-	0.6	1.0	1.0	440
6	-	1.0	1.0	1.0	460
7	-	-	1.0	1.0	80
8	0.5	-	1.0	1.0	440
9	1.0	-	1.0	1.0	450
10	1.5	-	1.0	1.0	460

ที่มา : (-) หมายถึง ไม่เติมสารนั้น

ที่มา : Perlman และคณะ ., 1960

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium spp.

1. อาหาร

แหล่งคาร์บอน มีหลายประเภทเช่น มอลโทส, โมลาส, กรดแลคติก, แดรกซ์โทส เป็นต้น โดยต้องใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณ 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ (Baker และ Rose., 1957)

จากการศึกษาพบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเหมาะสำหรับการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ (Osman และคณะ .,1968) ส่วน Hargrove และ Leviton (1951) ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งอาจได้จากการเติมลงไปในอาหารหรือในขบวนการหมักแลคโตสในนมของพวก Lactic acid bacteria แต่จากการศึกษาทั้งหมดพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลแลคโตสซึ่งจะใช้ประมาณ 8 – 10 เปอร์เซ็นต์

แหล่งไนโตรเจน มักเป็นพวกกรดอะมิโนหรือโปรตีนจากถั่วเหลืองและข้าวทั้งหลาย พวกเนื้อสัตว์, ยีสต์สกัด, tryptic digest of casein, pancreatic digest of casein, peptone

Osman (1968) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนจากเกลือแอมโมเนียม พบว่า ammoniumcitrate ammoniumphophate เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีเหมาะต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 และยังพบอีกว่า Methionine จะช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12

แร่ธาตุที่มีความสำคัญ (บุษบา.,2540)

โคบอลท์ ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้ามีโคบอลท์ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม เช่นมีสูงหรือต่ำไป จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อได้ โดยเชื้อจะสามารถใช้โคบอลท์ได้ในช่วยไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อเชื้อ โคบอลท์อาจเติมลงไปในรูปของเกลือต่าง ๆ เช่น cobalt chloride, cobalt sulfate

ไซยาไนด์ ช่วยเพิ่มผลผลิตโดยเติมลงไปในปริมาณไม่เกิน 0.1 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมลงไปในรูป ammonium cyanide, metal หรือในรูป sodium cyanide, potassium cyanide หรือในรูปของเหลวหรือก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12

สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของ propionic acid bacteria อยู่ระหว่าง 6.8 – 7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ 7.0 โดยต้องรักษาระดับของพีเอชให้อยู่ในช่วง 4- 9 เพราะถ้าสูงหรือต่ำกว่านี้ จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจากโคบาลามีนไม่คงตัว (Speedie และ Hall., 1960) อุณหภูมิโดยทั่วไปในการหมักประมาณ 30 องศาเซลเซียสจะเป็นสภาวะที่แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดและให้ผลผลิตมากที่สุด

การให้อากาศศึกษาโดย Grant (1960) ทดลองกับ Propionibacterium freudenreichii ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหาร ที่ช่วยส่งเสริมในการผลิตวิตามินบี 12 เมื่อถึงช่วงปลายของการหมัก อาจขาดคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนมีผลทำให้เชื้อหยุดการเจริญได้ ต้องมีการให้อากาศเพื่อให้เกิดฟองอากาศในอาหารช่วยในการเจริญอีกครั้ง

ลักษณะของการหมัก มี 2 แบบคือแบบครั้งคราวและแบบต่อเนื่อง แบบครั้งคราวการผลิตโคบาลามีนจะเริ่มโดยเชื้อ Propionibacterium ที่ผลิตวิตามินบี 12 ในสภาวะที่ไม่มีอากาศสามารถเก็บเกี่ยววิตามินบี 12 ได้จากอาหารที่ใช้เลี้ยง อัตราการเจริญของเชื้อจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะของการหมัก แบบต่อเนื่องสามารถแบ่งได้ 2 ขั้นตอนคือ 1 หมักในสภาพที่ไม่มีอากาศโดยเติมสารอาหารลงไป และในขั้นที่ 2 จะให้อาหารสัมผัสกับอากาศและเติมอาหารลงไปอีก โดยอัตราการเติมอาหารต้องเท่ากันทั้ง 2 ขั้นตอน ซึ่งการผลิตวิตามินบี 12 จะเกิดในขั้นตอนที่ 2

Baron (1962) พบว่าเมื่อเติม thickening agent ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะพบว่าเชื้อมีการเจริญได้โดยไม่ต้องมีการกวนมีประโยชน์มากในการเจริญของเชื้อ และนอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความความทนทานหรือสามารถปรับตัวให้ทนต่อสารพิษที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ดีกว่าสภาพธรรมดา

ข้อควรระวัง ในการเก็บเกี่ยววิตามินบี 12 ต้องทำการย่อยสลายเซลล์หรือทำให้เซลล์แตกเสียก่อนเพื่อทำการเก็บเกี่ยว แต่ถ้าเก็บช้าไปวิตามินที่แยกออกมาจะสลายตัวไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 จาก

Propionibacterium freudenreichii ATCC 13673

Medium	Riboflavin (µg/l)	Methionine (µg/l)	Cultivation time(hr)	Cell dry weight(g/l)	Vitamin B_{12} (µg/l)	Vitamin B_{12} (µg/ g cell)
Complete[a]	-	-	96	2.5	650	260
Complete[a]	-	-	48	2.9	1350	472
Soybean curd whey[a]	-	-	120	5.0	500	100
Soybean curd whey[a]	-	20	120	4.1	1000	244
Soybean curd whey[a]	100	-	120	5.0	500	100
Soybean curd whey[a]	100	20	120	4.1	900	220
Soybean curd whey[a]	50	-	120	5.0	2000	400
Soybean curd whey[b]	50	-	44	4.5	4000	891

Complete medium : glucose 1 %, acid hydrolysates of casein 0.1 %, pancreatic digests of casein 0.15 % ,yeast extract 0.5 % , NaH_2PO_4 0.16% , K_3PO_4 0.15 % , $MgCl_2$. $6H_2O$ 0.04% , biotin 0.3 mg/ l , pantothenic acid 0.4 mg/l , $FeSO_4$. $7H_2O$ 10 mg/l , $CoSO_4$.7 H_2O 12 mg/ l , pH 6.6 -6.8 , Soybean curd whey medium : glucose 1 % , yeast extract 1 % , $CoSO_4$. 7 H_2O 12 mg/ l , soybean curd whey 100 ml

[a] Flask culture under statical condition

[b] Batch fermentation

ที่มา :Yongsmith และ Apiraktivongse (1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12

วิตามินบี 12 สกัดได้ครั้งแรกจากตับ โดยตับจะมีวิตามินประมาณ 1 ppm การสกัดจากตับจึงไม่สามารถที่จะทำเป็นการค้าได้ วิตามินบี 12 มีสูตรโครงสร้างสลับซับซ้อนมากยากแก่การสกัดโดยวิธีทางเคมี อุตสาหกรรมการผลิตวิตามินบี 12 ปัจจุบันอาศัยจากการผลิตจากจุลินทรีย์เท่านั้น จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตวิตามิน บี 12 มีมากมายหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดให้วิตามินบี 12 ในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ปริมาณสูงสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม คือ Propioibacterium freudenreichii , Propioibacterium shermenii , Bacillus megaterium , Streptomyces olivaceus สัตว์และคนมีความต้องการวิตามินบี 12 มาก (โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคโลหิตจาง) จึงมีการผลิตในปริมาณ 9000-10000 กิโลกรัมต่อปี โดยนำมาใช้ทางการแพทย์ เภสัชกรรม เป็นยารักษาโรคยาบำรุง และส่วนประกอบของยาบางชนิด 3500 กิโลกรัม นอกนั้นใช้ทางด้านเคมีและอุตสาหกรรม

การผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรมระยะแรกเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตยาปฏิชีวนะของ Streptomyces sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสเตรปโตมัยซิน และผลพลอยได้จากอุสาหกรรมการผลิต acetone-butanol น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิต ต่าง ๆ เมื่อผ่านกระบวนการกำจัดแล้วจะมีวิตามิน บี 12 เพิ่มขึ้นในส่วนของตะกอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเติมเกลือโคบอลท์ ในระหว่างกระบวนการกำจัด Hargroveและคณะ.,1951 พบว่าในตะกอนน้ำทิ้ง มี วิตามินบี12 12.93 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง นอกจากตะกอนน้ำทิ้งแล้วตะกอนที่ย่อยสลายแล้ว สามารถใช้เป็นแหล่งของวิตามินบี 12 ได้ดีกว่าตะกอนน้ำทิ้ง โดยในตะกอนที่ย่อยสลายแล้ว มีวิตามินบี 12 ปริมาณ 22 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่ในตะกอนน้ำทิ้ง พบเพียง 11 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง แต่วิตามินบี 12 ที่สกัดได้จากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมสารปฏิชีวนะและตะกอนต่าง ๆ นั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการและมีรายงานว่าวิตามินบี 12 ที่พบใน ตะกอนน้ำทิ้ง ส่วนใหญ่อยู่ในรูปสารประกอบที่คล้ายวิตามินบี 12 ซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ไม่สามารถใช้ในคนและสัตว์ ในการดัดแปลงสารประกอบที่คล้ายวิตามินบี 12 ให้ได้เฉพาะ cyanocobaramin ใช้ต้นทุนสูง ทำให้วิตามินบี12 มีราคาแพง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตวิตามินบี 12 ได้ในปริมาณที่สูง ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์อาจทำได้โดยตรงจากแหล่งที่อยู่ หรืออาจทำได้จากการกลายพันธุ์ พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 มีทั้งแบคทีเรีย Actinomyces และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน แต่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมต้องสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ประมาณ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนใหญ่ที่ผลิตได้ในระดับนี้จะเป็นพวก Actinomycetes และแบคทีเรีย Propionibacterium พบว่าบางสายพันธุ์ของเชื้อนี้ผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงถึง 25000 ไมโครกรัมต่อลิตร ในตารางที่ 2.7 แสดงถึงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ในตารางที่ 2.7 โดยคัดเลือกโดยตรงจากแหล่งต่าง ๆ และทำให้เกิดการกลายพันธุ์หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เพราะว่าวิตามินบี 12 สังเคราะห์ภายในเซลล์ ถ้าเชื้อมีการเจริญมากการผลิตวิตามินบี 12 ย่อมมากตามไปด้วย โดยศึกษาตั้งแต่ส่วนประกอบของอาหาร พีเอช อุณหภูมิและอากาศ ปรับปรุงกระบวนการเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33514

สายพันธุ์	แหล่งอาหารคาร์บอน	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
Micromonospora sp.	Glucose	11.5
Nocardia rogusa	Glucose-cane molasses	14.0
Propionibacterium freudenreichii	Glucose	26.0
Propionibacterium shermanii	Glucose	23.0
Propionibacterium shermanii	Glucose	28.0
Propionibacterium shermanii	Glucose	39.0
Propionibacterium vannielli	Glucose	25.0
Pseudomonas denitrifiacns	Beet molasses	59.0
Streptomyces olivaceus	Glucose-lactose	8.5
Mix methanogenic bacteria	Methanol	35.0
Nocardia gardneri	Hexadecane	4.5

ตารางที่ 2.6 การผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Bacillus	megaterium ATCC 13639
Propionibacterium	freudenreichii ATCC 6207
Propionibacterium	shermannii
Streptomyces	griseus
Streptomyces	olivaceus
Streptomyces sp.	ATCC 11072
Pseudomas spp.	

ตารางที่ 2.7 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตวิตามิน บี 12 ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตวิตามินบี 12 โดย Propionibacterium sp.

เชื้อ Propionibacterium sp. ชนิดที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยหลายชนิดสามารถที่จะผลิตวิตามินบี 12 ได้โดยใช้อาหารที่มีการเติมโคบอลท์ลงไปด้วย และเลี้ยงในสภาพที่ไม่มีการหมุนเวียนของอากาศ การผลิตวิตามินบี 12 โดยเฉพาะ adenosyl cobalamin ขึ้นอยู่กับการเติม 5,6 – dimethylbenzimidazole (DBI) ลงในกระบวนการผลิต แต่มีบางชนิดสามารถสังเคราะห์ DBI ด้วยตัวมันเอง และการหมุนเวียนของอากาศเหมาะสมแก่การสังเคราะห์ DBI ด้วย คือเชื้อจะสังเคราะห์ DBI ในช่วงที่มีอากาศ ดังนั้นการที่จะผลิตวิตามินบี 12 ให้ได้มากกว่าควรผลิตแบบ 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกให้เชื้อเจริญในสภาพปราศจากอากาศ โดยใช้เวลา 2-4 วัน เชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสเกือบหมด ขั้นตอนที่ สองมีการให้อากาศเป็นเวลา 3-4 วัน ก็จะได้วิตามินบี 12 เป็นปริมาณมาก คาดคะเนว่าสาร cobinamide-5' - deoxyadenosine จะเกิดขึ้นในขั้นตอนแรก และสารนี้จะเปลี่ยนเป็น 5,6-dimethyl-α-benzimidazolylcobamide-5'-deoxyadenosine ในช่วงหลัง การเลี้ยงจุลินทรีย์อาจจะเลี้ยงเป็นครั้งคราวในถังหมักเดียวกัน หรือจะเลี้ยงแบบต่อเนื่องก็ได้ โดยทำให้เกิดสองสภาพดังกล่าว หรืออาจจะเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ เมื่อได้เซลล์ปริมาณมาก ๆ แล้ว จึงแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงนำเซลล์ไปเลี้ยงในสภาพมีอากาศ เพื่อผลิตวิตามินบี 12 หรือนำเซลล์ที่แยกออกไปเติม DBI และ ไซยาไนด์ หรืออาจจะเติม DBI (ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี) ในช่วงที่ไม่มีอากาศ เวลาในการเลี้ยงจะสั้นเข้า เพราะสามารถตัดช่วงที่ต้องการอากาศออกไป แต่ต่อมาพบว่าการเติม DBI ควรจะเติมในขั้นตอนที่สองเท่านั้น สำหรับสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ DBI ได้ เนื่องจากสารตัวนี้จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ corrinoid จึงไม่ควรจะมีการเติม DBI ในระหว่างการเลี้ยงขั้นแรกเลย

อาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อผลิตวิตามินบี 12 ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเป็นหลัก (10-100) กรัม ต่อลิตร มีเกลือแร่ Fe^{2+} , Mn^{2+} และ Mg^{2+} ในปริมาณเล็กน้อย พร้อมกับเติม โคบอลท์ (10 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) สารเคมีพวกบัฟเฟอร์ สารประกอบไนโตรเจนที่เตรียมจากยีสต์ ไฮโดรไลเซทของเคซีนหรือน้ำแช่ข้าวโพด (30 - 70 กรัมต่อลิตร) ก็นิยมใช้เพราะมีกรดแลคติคและ pantothenic ปนมาด้วยช่วยทำให้เชื้อเจริญได้ดีนอกจากนี้กรด pentothenic ยังกระตุ้นการสังเคราะห์ corrinoid ด้วยจึงนิยมเติมกรดชนิดนี้ลงไปด้วย อุณหภูมิทั่วไปที่ใช้ คือ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 - 7.0 และจากการศึกษากลไกการสังเคราะห์วิตามินบี 12 จึงมีการเติมน้ำตาลแลคโตส ไกลซิน และ α - aminolevulinic acid ลงในอาหารดังกล่าวอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อนี้สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ 25-40 มิลลิกรัมต่อลิตร และในอุตสาหกรรมคาดว่าสามารถผลิตได้มากกว่านี้ประมาณ 216 มิลลิกรัมต่อลิตร วิตามินบี 12 ที่สังเคราะห์ปกติจะอยู่ภายในเซลล์ จะถูกขับออกนอกเซลล์ได้จะต้องทำให้สารละลายเป็นกรดพีเอช 2-3 และเติมโพแทสเซียมไซยาไนด์ ลงไปด้วยระหว่างที่มีการสกัดโดยการให้ความร้อนก็จะได้วิตามินบี 12 ออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวสังเคราะห์วิตามินบี12

ชีวสังเคราะห์วิตามินบี12 ได้มีผู้ศึกษามากมายในเชื้อ Streptomyces olivaceus (Sato และคณะ, 1971,1977) Propionibacterium shermanii และ Pseudomonas denitrifican(Ansbacher และคณะ,1949 ; Bray และ Shemin,1963; Demain และคณะ, 1968; Demain และ White, 1971;Friedman และ Cagen, 1970; Miller และ Rosenbaum, 1960; Shemin และ Bray, 1964)

ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และ 2.5 จะเห็นว่าในขั้นตอนแรกเริ่มคือขั้นการสร้างวงแหวนคอร์ริน (corrin ring) จากสารเริ่มต้นซักซินิลโคเอ (succinylCoA) และไกลซีน (glycine) รวมกันได้กรดเดลตาอะมิโนลีวูลินิก (δ-aminolaevulivic acid) โดยมีการสร้างส่วนต่างๆ คือ A, B, C และ D โดยที่แต่ละส่วนนี้เรียกว่า พอร์ฟอบิลิโนเจน (porphobillinogen) ซึ่งจะมาจับกันโดยเอนไซม์ดีอามิเนส(deaminase) และไอโซเมอเรส (isomerase) ได้สารยูโรไฟริโนเจน III (urophyrinogen III) และเกิดปฏิกิริยาต่างๆ พอสรุปได้ว่า

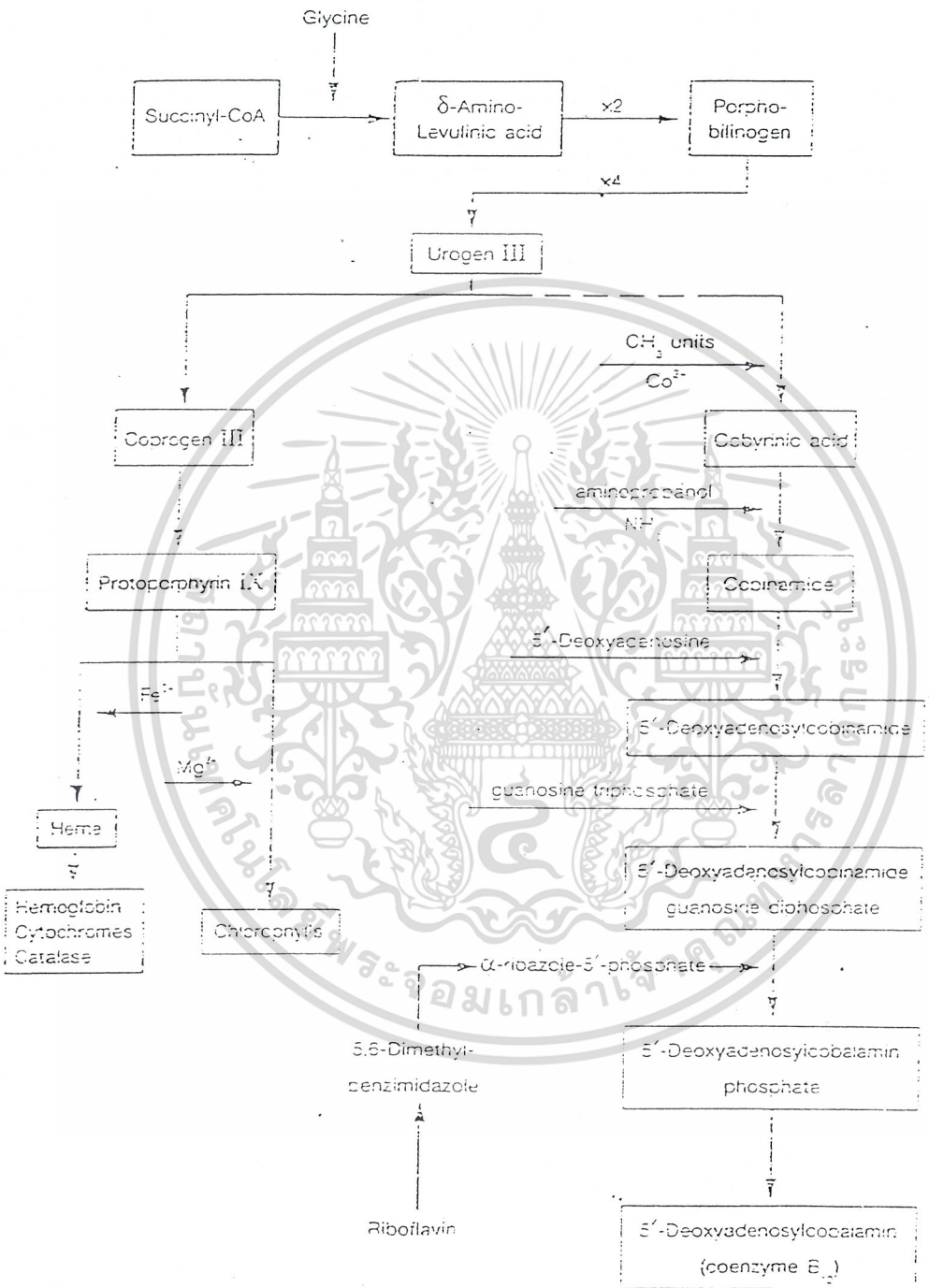
1. มีการเชื่อมต่อระหว่างวงแหวน (ring) โดยตรง ระหว่าง A และ D โดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) และ ไอโซเมอไรเซชัน (isomerization)
2. เกิดเมทิลเลชัน (methylation) โดยเมทิโอนีน (methionine) ในอาหารจะเติมหมู่ (CH_3) กับนิวเคลียสคอร์รีน 7 จุด สารที่ให้หมู่เมทิล (methyl donor) ดังกล่าวอาจเป็นเมทิโอนีน โคลีน (choline) หรือ เบทะอีน (betaine)
3. มีปฏิกิริยา decarboxylation ที่วงแหวน C เปลี่ยน A จาก $CH_2 - COOH$ เป็น CH_3 group
4. โคบอลท์จะเข้าไปรวมที่ศูนย์กลาง ถึงขั้นนิวเคลียสคลอรีนจะสมบูรณ์

ขั้นถัดไปเป็นการเชื่อมของส่วน upper ligand เช่น 5′ - deoxyadenosyl จะเข้าไปเป็น upper ligand ของโมเลกุลโดยต่อกับโคบอลท์

ขั้นสุดท้ายเป็นการเชื่อม lower ligand เข้าไปต่อกับโคบอลท์ที่ส่วนล่างโดยผ่านกระบวนการที่มีการสร้างสิ่งต่างๆ ดังนี้ การเชื่อมของ nucleotide residue การสร้าง 5,6 – dimethylbenzimidazoleriboside (DMR riboside) และการสร้างพิวรีน

Renz (1970) รายงานเป็นครั้งแรกว่าวิตามินบี 2 เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของ DBI (5,6-dimethylbenzimidazole) ซึ่งเป็นส่วน lower ligand ของโมเลกุลวิตามินบี 12

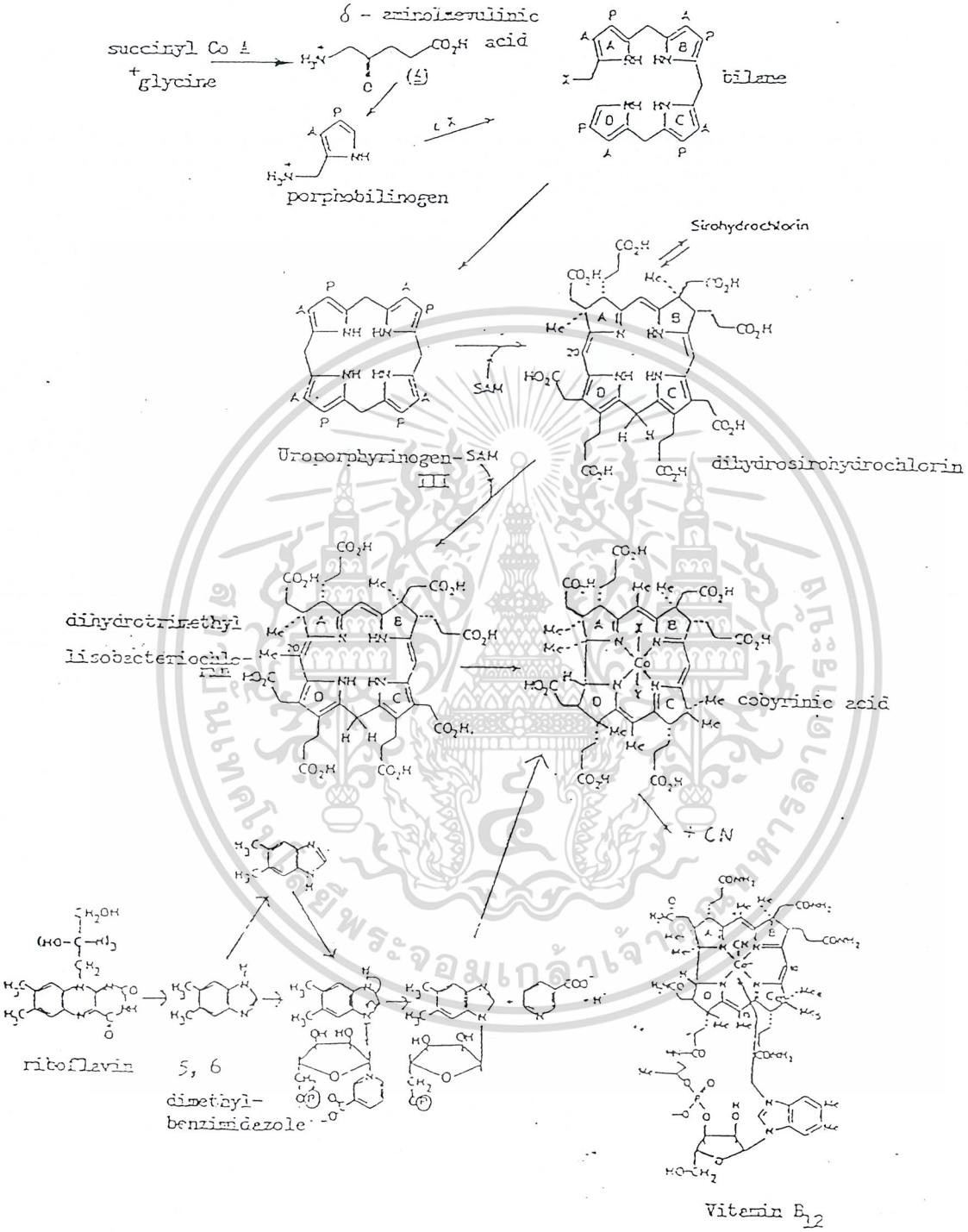
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงเส้นทางทั่วไปสำหรับชีวสังเคราะห์วิตามินบี 12

ที่มา : Florent และ Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างสารสำคัญในเส้นทางสังเคราะห์วิตามินบี 12 (Florent และ Ninet ., 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

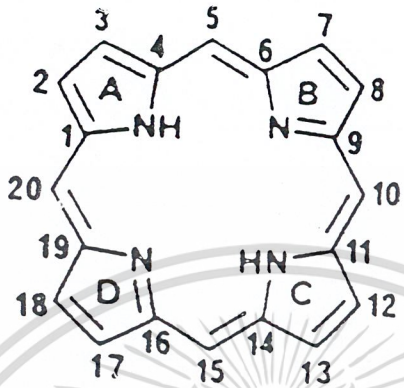
การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ผลิตวิตามินบี12

โดยทั่วไปการปรับปรุงจะมุ่งในประเด็นสำคัญต่างๆ ดังต่อไปนี้ มีวิตามินบี 12 สูงขึ้น เจริญได้เร็วขึ้น มีความคงทนด้านพันธุกรรม ต้านทานสารต่างๆ ที่ความเข้มข้นสูงในสูตรอาหารได้ ฯลฯ การคัดสายพันธุ์โดยตรงจากสายพันธุ์กลายทั่วไปมีโอกาสเพียง 10^{-5} จึงใช้เวลานานกว่าจะได้สายพันธุ์ที่ต้องการ แต่อย่างไรก็ตามมีผู้พยายามใช้ความรู้ที่ได้จากการรายงานเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์วิตามินบี 12 มาใช้ประโยชน์ต่อการคัดสายพันธุ์ผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงขึ้น ดังตัวอย่างต่อไปนี้ กรณีของ Nocardia rugosa ซึ่งสามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 หรือ พอร์ไฟรินส์ (porphyrins) ซึ่งโมเลกุลใกล้เคียงกัน (รูปที่ 2.4) ตรงที่มีโครงสร้าง tetrapyrrole ring ในช่วงชีวสังเคราะห์ขั้นต้น ฉะนั้น Di Marco และคณะ (1961) ใช้วิธีคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สร้างพอร์ไฟรินส์ได้น้อย (porphyrins-less mutant) ซึ่งอาจสร้างวิตามินบี 12 ได้สูงขึ้นโดยวิธีง่ายๆ จากการสังเกตจากสีแดงขุ่นของพอร์ไฟรินส์ที่จะถูกขับออกมาอยู่รอบเซลล์มิวแตนท์ มิวแตนท์ใดที่ไม่มี โซนสีแดงขุ่นรอบโคโลนีของตนเองก็จะถูกนำไปตรวจสอบต่อ วิธีนี้พบว่าในโคโลนีที่ไม่มีโซนแดงจำนวน 180 โคโลนีนั้นมีประมาณ 30 โคโลนีที่พบว่าไม่สามารถสร้างพอร์ไฟรินส์ได้จริงๆ และในจำนวนนี้มีอยู่ 2 โคโลนีเท่านั้นที่สามารถสร้างวิตามินบี 12ได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

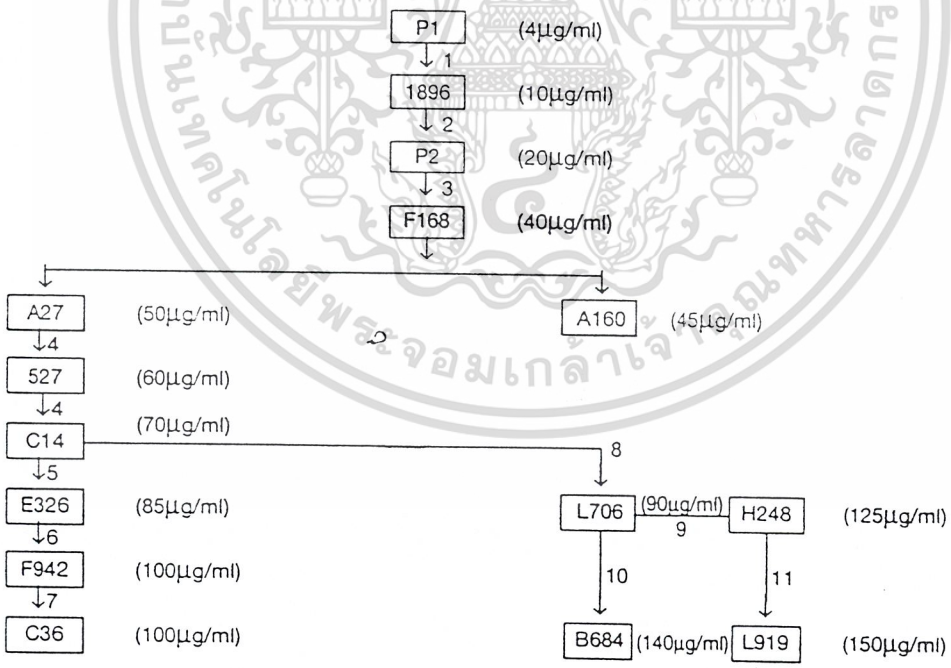
ในปี ค.ศ.1981 Barrere และคณะ ได้ใช้วิธีตรวจสอบคะตะเลส (catalase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างพอร์ไฟรินส์ ดังนั้นสายพันธุ์กลายที่ไม่สร้างพอร์ไฟรินส์ก็ไม่สร้างคะตะเลสการตรวจสายพันธุ์กลายที่ไม่สร้างคะตะเลสที่ทำได้ง่ายบนอาหารวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อเพียงแต่หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนี ซึ่งไม่เกิดฟองก๊าซออกซิเจนรอบโคโลนีนั้นๆก็นำไปตรวจสอบต่อดูการสร้างวิตามินบี 12 ที่สูงขึ้นได้ (Spalla และคณะ, 1989) หรืออาจใช้เทคนิคคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ทนต่อสารเริ่มต้นของวิตามินบี12 (Vitamin B_{12} precursor) เช่น สาร 5,6-dimethylbenzimidazole หรือทนต่อสาร antimetabolite ethionine หรืออื่นๆที่ความเข้มข้นสูง แต่วิธีการต่างๆเหล่านี้ควรทำเป็นทีละขั้น (stepwise process)

ขั้นตอนการปรับปรุงสายพันธุ์ Pseudomonas denitrificans โดยการกลายพันธุ์แสดงไว้ในรูปที่ 2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างเคมีสารพอร์ไฟรินส์(porphyrins)



รูปที่ 2.7 แสดงการปรับปรุงสายพันธุ์ของ Pseudomonas denitrificans สารกลายพันธุ์ได้แก่ 1. UV, 2. Ethyleneimine, 3. Nitrossomethyluretane, 4. –7. N-methyl- *N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, 8.,10. UV-bromouracil, 9.,11. Psoraiene near UV light

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากความพยายามปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำการกลายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ในระยะ 20 ปี (ค.ศ.1940-1960) จากที่ผลิตได้ในสายพันธุ์พ่อแม่เพียง 5 มิลลิกรัม เป็นสายพันธุ์กลายที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 120-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การวิจัยการผลิตวิตามินบี12

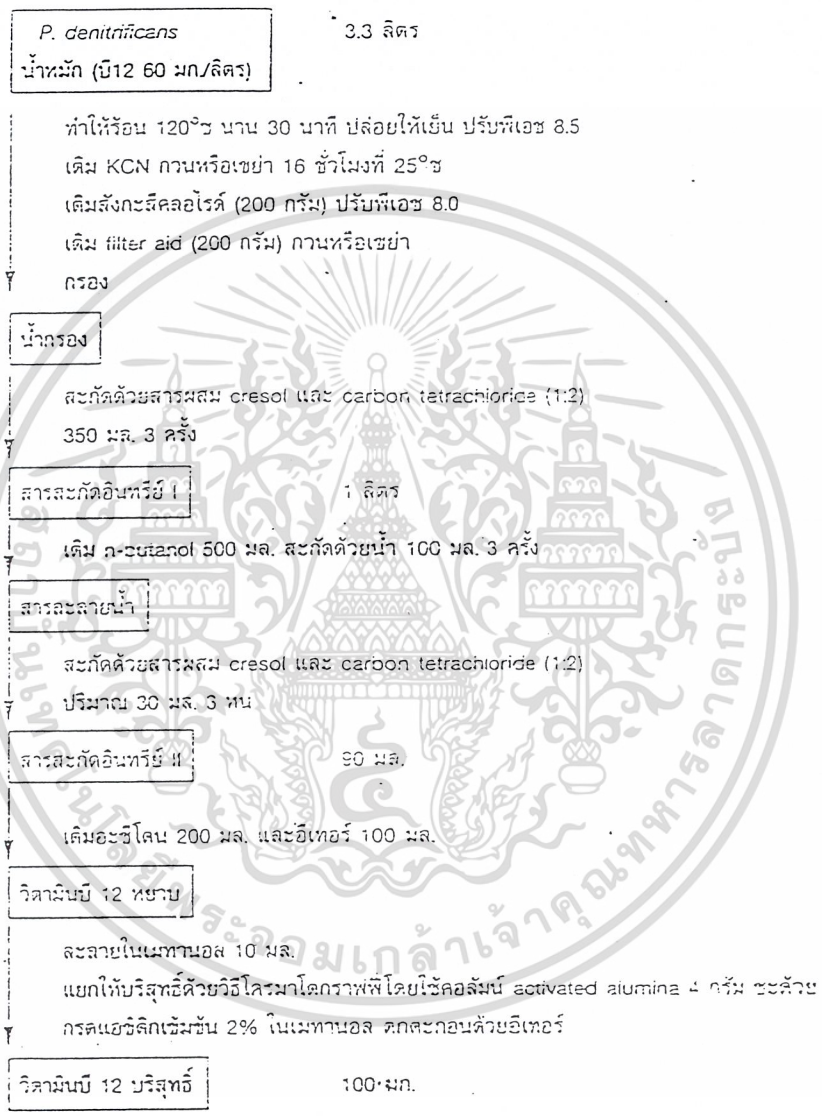
การวิจัยเกี่ยวกับการผลิตวิตามินบี 12 ได้กระทำกันมามากในช่วง 30 ปี (ค.ศ.1940-1970) โดยมีวัตถุประสงค์ตามที่ Florent และ Ninet (1979) เขียนไว้ คือ

1. ต้องการความรู้ที่ดีขึ้นในเส้นทางชีวสังเคราะห์เพื่อช่วยการศึกษาทางชีวเคมีและพันธุกรรม
2. เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ เช่น แบคทีเรียโพรพิโอนิก และ Pseudomonas
3. เพื่อหาแหล่งสารอาหารราคาถูก
4. เพื่อปรับปรุงการสกัดวิตามินบี 12 และการทำให้บริสุทธิ์

การเก็บเกี่ยววิตามินบี 12

การแยกวิตามินบี 12 จากเซลล์และอาหารหมักได้มีการปรับปรุงหลายครั้งหลายคราวในช่วง 30 ปี โดยทั่วไปมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้คือละลายโคบาลามีน แล้วเปลี่ยนรูปเป็นไซยาโนโคบาลามินโดยการเติมโพแทสเซียมหรือโซเดียมไซยาไนด์ จากนั้นแยกผลิตภัณฑ์หยาบที่มีความบริสุทธิ์ 80 เปอร์เซ็นต์ (นำไปใช้เป็นสารเสริมอาหารสัตว์โดยตรง) หลังจากนั้นขั้นต่อไปคือ การทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 95 –98 เปอร์เซ็นต์ (ใช้ในทางการแพทย์) เริ่มต้นการสกัดอาจใช้น้ำหมักที่มีเซลล์อยู่ด้วย หรือเฉพาะเซลล์ก็ได้นำมาผ่านความร้อนขนาด 80-120 องศาเซลเซียส นาน 10-30 นาทีที่พีเอช 4.6-6.0 โดยมีสารไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียมหรือกำมะถันอยู่ด้วย เพื่อให้วิตามินบี 12 ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์เปลี่ยนมาอยู่ในรูปโคบาลามินที่คงตัวกว่าให้หมด กระบวนการสกัดวิตามินบี 12 แสดงในรูปที่ 2.8 เป็นวิธีที่รับรองกันว่าดี มีประสิทธิภาพและราคาถูก (บุษบา,2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงกระบวนการแยกวิตามินบี 12 ให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตสารอนุพันธุ์ของวิตามินบี12

1.ไฮดรอกโซโคบาลามิน

สารนี้สร้างโดยแบคทีเรีย Streptomyces และ Propionibacterium shermanii ในระหว่างการสกัด ต้องมีการเปลี่ยนรูปของโคบาลามีนธรรมชาติ ให้อยู่ในรูปของ sulfate, nitrate และ chloride derivatives ตามลำดับก่อนไปผ่านขั้นแยกสลายโดยสาร amberlite IRA 400 (OH) เพื่อให้ได้ไฮดรอกโซโคบาลามิน (Kaczka และคณะ,1956 ; Pierrel, 1963) อาจมีการใช้วิธีสังเคราะห์ทางเคมี จากไซยาโนโคบาลามินทำได้โดยผ่าน sulfate และ nitrate derivatives (Pierrel, 1963b; Smith, 1965)

บางสายพันธุ์พิเศษอาจให้ไฮดรอกโซโคบาลามินได้โดยตรง เช่น Yongsmith และคณะ (1982) ได้รายงานการคัดเลือกแบคทีเรียโพรพิโอนกเพื่อผลิตวิตามินบี 12 พบว่าสายพันธุ์ Propionibacterium sp.KB1251 ซึ่งภายหลังพบว่าคือ Propionibacterium tecnicum สามารถสังเคราะห์ ไฮดรอกโซโคบาลามินและละลายอยู่ในน้ำอาหาร จึงได้นำมาผลิตวิตามินบี 12 โดยการตรึงเซลล์ ได้วิตามินบี 12 ในปริมาณที่สูงถึง 25 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.Deoxyadenosylcobalamin(Coenzyme B_{12})

โคเอนไซม์ บี 12 สกัดได้โดยตรงจาก Propionibacterium shermanii (Chinoin-Gyogyszer,1971) จากPropionibacterium freudenreichii (Sifa, 1964) จาก Nocardia rugosa (Farmaceutici Italia, 1971) มีถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของ native cobalamin ทั้งหมด

โคเอนไซม์ บี 12 สร้างภายในเซลล์เสมอ จึงปั่นเหวี่ยงเซลล์ และสกัดด้วยสารละลายอะซีโตนที่เย็นพอ สารละลายฟีนอลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หรือสารละลายเอทานอล อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส ในเวลาอันสั้น การสกัดเอาโคเอนไซม์ต้องทำในที่มืด และไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชทันทีทันใด ควรมีไซยาไนด์ด้วยเพื่อให้ได้ผลถึง 80-85 เปอร์เซ็นต์(Kaken,1965; Chinoin-Gyogyszer,1971)

การนำวิตามินบี12 ไปใช้ประโยชน์ (บุษบา., 2540)

1. **ทางการแพทย์** วิธีที่ดีที่สุดในการตรวจสอบการขาดวิตามินบี 12 ในคนคือการตรวจวิตามินบี 12 ในซีรัม ปกติระดับวิตามินบี 12 ในซีรัมของคนปกติอยู่ที่ 200-900 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร หากต่ำกว่า 200 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ถือว่าวิกฤติ โดยเฉพาะ 80-150 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร จัดเป็น clinical deficiency ในกรณีเช่นนี้ต้องให้วิตามินบี12 ในรูปของไฮดรอกโซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคบาลามิน 500-1000 ไมโครกรัม โดยการฉีด 3-4 ครั้งในช่วงเวลาที่เหมาะสมในระยะ 1 ปี ในกรณีคนเป็นโรค pernicious anemia เนื่องจากความบกพร่องของ IF intrinsic factors ซึ่งทำให้ร่างกายดูดซึมวิตามินบี 12 ได้ยากลำบาก ก็อาจต้องให้ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน 300 ไมโครกรัมทุกวันติดต่อกันระยะหนึ่ง ส่วนกรณีคนไข้มีปัญหาโรคประสาทเกิดจากการขาดวิตามินบี 12 ก็ต้องให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงถึง 100 ไมโครกรัมต่อวัน โดยการฉีดทุกวันตลอดสัปดาห์แรก ตามด้วยฉีด 2 ครั้งต่อสัปดาห์ติดต่อไปหลายเดือน

วิตามินบี 12 มีจำหน่ายในหลายรูปและระดับคุณภาพ ตลาดสหรัฐอเมริกาในรูปของไซยาโนโคบาลามีนเกือบทั้งหมด ตลาดโลกจึงมักอยู่ในรูปดังกล่าวเพราะสหรัฐอเมริกาเป็นแหล่งผลิตใหญ่ แต่ในตลาดยุโรป มีจำหน่ายในรูปของไฮดรอกโซโคบาลามินเพราะนิยมในแง่ที่ว่าดูดซึมง่ายในตับ ถูกขับออกทางปัสสาวะได้น้อย และคงอยู่ในซีรัมในระดับที่ดีกว่าไซยาโนโคบาลามีน และที่สำคัญไม่ต้องให้บ่อยเหมือนในรูปของไซยาโนโคบาลามีน

2. **ทางด้านเภสัชกรรม** ในสหรัฐอเมริกามีการนำมาใช้ด้านเภสัชกรรมหลายทาง เช่น ฉีดวิตามินบี12 เมื่อมีอาการเหนื่อยอ่อน หรือรักษาอาการเจ็บปวดที่ไม่ทราบสาเหตุในยุโรป เช่น ฝรั่งเศส, อิตาลี, สเปน ก็ใช้ในกรณีเดียวกัน ในตลาดอเมริกาเองซึ่งมีแหล่งผลิตที่สำคัญมีจำหน่ายในร้านเภสัชกรรมในรูปของยาเม็ดที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม มีการฉีดวิตามินบี 12 ให้กับม้าแข่งในสนามแข่ง เป็นต้น

3. **ทางด้านอาหารสัตว์** เนื่องจากมีการสังเกตและค้นพบมาตั้งแต่ ค.ศ. 1946 ว่าวิตามินบี 12 มีส่วนในการเร่งการเจริญเติบโตของลูกสัตว์เศรษฐกิจ เช่น ไก่และหมู มีผลต่อเศรษฐกิจการผลิตสัตว์ฉะนั้นในประเทศอเมริกา และยุโรปนิยมใช้วิตามินบี 12 10-30 มิลลิกรัมต่อตันอาหารสัตว์ เพื่อการเจริญของลูกไก่ ลูกหมู และวัวนม ตลาดของวิตามินบี 12 มีตัวเลขอยู่ที่ 3-10 ตันต่อปี ซึ่งมีราคาขายกรัมละ 3-4 เหรียญสหรัฐ ซึ่งก็ตกกิโลกรัมละ 1 แสนบาท ราคาตลาดโลกต่อปีมีมูลค่า 300-1000 ล้านบาทหลายบริษัทบริษัทที่ผลิตวิตามินบี 12 โดยการหมักเช่นบริษัท Merck, Upjohn, Vico, Glaxo, ประเทศสหรัฐอเมริกา, บริษัท Farmitalia, เมือง Naples, ประเทศอิตาลี และบริษัท Greensford, ประเทศอังกฤษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12

วิเคราะห์ได้หลายวิธีได้แก่ วิธีทางเคมีและฟิสิกส์ (Spalla และคณะ ,1989) และทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ละเอียดกว่า

Micrological assay เป็นเทคนิคทางจุลชีววิทยาที่ใช้จุลินทรีย์เป็นตัวทดสอบหารสารต่างๆ โดยมีหลักเกณฑ์ว่า จุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นตัวทดสอบนั้นจะต้องมีความต้องการจำเพาะต่อสารนั้นในการเจริญจริงๆ ถ้าหากไม่มีสารตัวนั้นแล้ว จุลินทรีย์นั้นจะไม่สามารถเจริญได้เลย หรือถึงได้ก็เจริญเติบโตได้น้อยมาก จนเห็นความแตกต่างได้อย่างแน่ชัด

การวัดผลการทดสอบ

แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. Tube method ใช้เลี้ยงเชื้อในหลอดทดสอบ อ่านผลจาก

1.1 Turbidimetric method อ่านผลจากความขุ่นของเซลล์ หากตัวทดสอบเจริญดีเพราะมีสารมาก ความขุ่นก็มากตาม ถ้าสารนั้นน้อยมากการเจริญก็ลดต่ำลง ความขุ่นของเซลล์ก็บางลง

1.2 Titration method อ่านผลจากปริมาณกรดที่จุลินทรีย์ทดสอบสร้างขึ้นมา ถ้ากรดมากก็แสดงว่ามีสารทดสอบมาก ถ้ากรดน้อยก็แสดงว่าจุลินทรีย์เจริญเติบโตต่ำสร้างกรดน้อย

2. Plate method หรือบางแห่งเรียกว่า Cup-plate method เลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อดูผลจาก Growth zone

ข้อแตกต่างบางประการของจุลินทรีย์ที่ตัวทดสอบหาวิตามินบี 12

1. Lactobacilli

นิยมใช้กันมากมี Lactobacillus lactis ใช้หาวิตามินบี 12 มาตั้งแต่ต้น ต่อมาพบ Lactobacillus leichmanii ซึ่งไวต่อการหาวิตามินบี 12มากกว่า Lactobacillus lactis มักใช้ในการวัดการเจริญเป็นความขุ่นของเซลล์แบบ Tube method โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง แต่ถ้าอ่านด้วยการไตเตรตต้องบ่มเชื้อไว้ 3 วัน

2. Escherichia coli(mutant type)

ปกติ Escherichia coli ไม่ต้องการวิตามินบี 12 ต่อมามีผู้ใช้แสง UV ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สายพันธุ์ Escherichia coli มีคุณสมบัติที่ B_{12} นิยมใช้กับการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อเทคนิคไม่ดีเกิด back mutation ได้เสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Euglena gracillis

ใช้วิธี Tube method อ่านความขุ่นของเซลล์ แต่ต้องระวังเพราะมักมีเชื้ออื่นปะปนง่าย เพราะว่าเชื้อยูกลีนาโตช้า ต้องใช้เวลานาน 5-8 วัน จึงจะอ่านผลได้

4. Ochromonas malhamenis

เชื้อนี้ไวต่อวิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin และโคเอนไซม์ แต่เจริญได้ช้า เวลาใช้ต้องระวังแบคทีเรียอื่นเข้าปะปนได้ อาจต้องใช้ตู้เขี่ยเชื้อแยกต่างหาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

1. Propionibacterium freudenreichii TISTR 446 ใช้ศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization แล้วจึงทำการจัดเก็บในสถาน Stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน MRS medium แบบ agar stab (ภาคผนวก ข.)

2. Lactobacillus leichmannii TISTR 449 ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ได้รับจากสภาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นจัดเก็บในสภาพ Stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน MRS agar แบบ agar stab (ภาคผนวก ข)

อาหาร

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซอสถั่วเหลือง จากโรงงานง่วนเชียงอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด ตั้งอยู่ที่ อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Suction pump
2. Autoclave
3. Incubator
4. Hot air oven
5. Centrifuge
6. Spectrophotometer (รุ่น DR / 400 ของ Hach Company, 1996.)
7. Kjeltec System 1002 Distilling Unit
8. Fermenter 2 litre
9. Cyclo Mixer
10. Assay tube 13 x100 มิลลิลิตร
11. Cuvette

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. Pipette

16. เครื่องแก้วต่าง ๆ

สารเคมี

16. Glucose

16. Yeast extract

16. $CoSO_4 .6 H_2O$

16. โพแทสเซียมไซยาไนด์

16. $NH_4 OH$

16. HCl

16. Cyanocobalamin

16. Vitamin B_{12} assay medium

16. Acid Hydrolysis of casein

16. Pancreatic digest of casein

16. Pancreatic acid

16. Biotin

16. $NaH_2 PO_4$

16. $K_3 PO_4$

16. $MgCl_2 . 6 H_2O$

16. $Fe SO_4$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารที่ใช้ผลิตวิตามินบี 12

1.1 การเตรียม Complete Medium เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ศึกษาการเตรียมและรายละเอียดในภาคผนวก ข)

1.2 การเตรียมน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง เพื่อนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 แบ่งน้ำทิ้งใส่ขวดสีชาแช่แข็งไว้ เพื่อสะดวกในการนำมาใช้งาน

1.2.3 เมื่อจะนำมาใช้จึงนำขวดสีชาไปแช่น้ำให้น้ำแข็งละลายหมด

1.2.3 กรองแยกตะกอนออกโดยการใช้ชุดกรองที่ต่อกับ Suction pump ของ MFG CORP Model U523 – V4 – G21 DX โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเบอร์ 5 ตามลำดับ

1.2.4 เติมสารอาหารที่ผ่านการศึกษามาแล้วว่าสามารถทำให้มีปริมาณเซลล์สูงสุด โดยเติมกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์ และ $CoSo_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปน้ำทิ้ง

1.2.5 ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 ด้วย NH_4OH 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ HCl 15เปอร์เซ็นต์

1.2.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. การหาการเจริญเติบโตและปริมาณเซลล์สูงสุดใน Complete Medium

2.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

2.1.1 ถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii in agar stab ลงใน Complete Medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.1.2 บ่มฟลาสก์ในข้อ 2.1.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบวันที่ 4 นำมาวัดความขุ่นของเชื้อเป็น Optical density (O.D.) โดยใช้ Complete Medium เป็น Blank ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ทำสารละลายของเชื้อให้เจือจางจนได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.5 โดยใช้ Complete medium เจือจาง ใช้สารละลายที่ได้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองแต่ละครั้ง

2.2 การเลี้ยงเชื้อใน Complete medium

2.2.1 เตรียม Complete medium บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อ ประมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ จากข้อ 2.1.4 ลงในฟลาสก์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย

2.2.2 นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัด O.D. ที่เวลาต่าง ๆ กันดังนี้ คือ 0 , 12, 24 , 36 , 48 , 60 , 72 , 84 , 96 , 108, 120 และ 144 ชั่วโมง โดยใช้ Complete medium เป็น Blank

2.2.3 บันทึกค่า O.D. ที่ได้และหาค่าเฉลี่ยในแต่ละเวลาที่กำหนด

2.2.4 เขียนกราฟแสดงการเติบโต โดยให้แกนตั้งของกราฟ เป็นค่า O.D. เฉลี่ย โดยใช้ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และแกนนอนเป็นเวลา

2.2.5 หาอัตราการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด โดยอ่านผลจากกราฟแสดงการเจริญเติบโต ปริมาณเซลล์สูงสุด อ่านค่าได้จาก O.D. ที่มีค่าสูงสุด

3. การเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักแห้ง (Cell dry weight)

3.1 เติมหัวเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ที่มี O.D. เท่ากับ 0.5 โดยเติมหัวเชื้อประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในฟลาสก์ที่บรรจุ Complete medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เตรียมฟลาสก์จำนวน 15 ฟลาสก์

3.2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่มทิ้งไว้จนถึงเวลาที่มีปริมาณเซลล์สูงสุด (ดูได้จากกราฟแสดงการเจริญเติบโตที่ O.D. สูงสุด แสดงว่ามีปริมาณเซลล์สูงสุด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เมื่อครบเวลาที่มีปริมาณเซลล์สูงสุด นำสารละลายเชื้อในฟลาสก์ นำไปวัด O.D. อยู่ในช่วง 0.1 – 0.8 ถ้าเกิน 1.0 ต้องทำการเจือจางโดยใช้อัตราส่วน1:1 , 1: 3 และ 1: 5 หลังจากเจือจางแล้ว ต้องนำไปวัดค่า O.D. ให้อยู่ในช่วง 0.1 – 0. 8

3.4 นำสารละลายในฟลาสก์ที่เหลือมาทำการเจือจางตามอัตราส่วน ที่ทำให้ค่า O.D. อยู่ในช่วง 0.1 – 0.8

3.5 ปิเปต สารละลายในข้อ 3.4 ที่ผ่านการเจือจางแล้วใส่หลอด centrifuge จำนวน 2 หลอด ๆ ละ 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

3.6 รินน้ำออกให้เหลือแต่ตะกอน เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วย cyclo mixer จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงใหม่อีกครั้ง ทำการล้างเซลล์เช่นนี้ 3 ครั้ง

3.7 เมื่อได้ตะกอนเซลล์ครั้งสุดท้าย เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าแล้วเทใส่กระทง อะลูมิเนียมที่ผ่านการอบแห้งแล้วทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบกระทงอะลูมิเนียมจะใช้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

3.8 นำกระทงมาเก็บตะกอนเซลล์แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบอีก ทำซ้ำ 3 ครั้ง จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลง

3.9 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. เป็นแกนตั้ง และน้ำหนักแห้งซึ่งมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร อยู่ในแกนนอน สามารถใช้เปรียบเทียบหาน้ำหนักแห้งของเชื้อนี้ในอาหารอื่น ๆ จากค่า O.D. ที่อ่านได้

4. การผลิตวิตามินบี 12

4.1 นำอาหาร Complete medium ที่เตรียมไว้ตามข้อ 1 บรรจุใน Stationary flask ให้มีปริมาตร 75 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด โดยใช้ฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ฟลาสก์ละ 1500 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ และบรรจุอาหารใน Fermenter ขนาด 2 ลิตร ให้มีปริมาตร 75 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 เติมหัวเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เริ่มต้นที่มีค่า O.D. เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 โดยจะใช้ปริมาตรหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ เติมลงไปทั้งใน stationary flask และ ถังหมัก

4.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยจะใช้เวลาเหมือนกับการหาการเจริญเติบโต ในขณะที่มีการบ่มของภายในถังหมัก จะต้องมีการกวนตลอด โดยใช้อัตราการกวน 300 รอบ / นาที ไม่มีการให้อากาศ

4.4 เปลี่ยนจาก complete medium เป็นน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่ได้เตรียมแล้วจาก 1 แล้วทำตามขั้นตอนตั้งแต่ข้อ 4.1 – 4.3

5.การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12

5.1 หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ที่สภาวะ Stationary flask และ สภาวะภายในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48 , 72 , 96 , 120 และ ชั่วโมงตามลำดับ

5.2 หาปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่สภาวะ stationary flask และ สภาวะภายในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48, 72 , 96 , 120 และ 144 ชม. ตามลำดับ การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน stationary liquor และใน สภาวะภายในถังหมัก liquor ใช้วิธี turbidimetric method of microbiological assay โดยเชื้อ Lactobacillus leichmannii TISTR 449 เป็น ทดสอบจุลินทรีย์ โดยใช้ assay medium ของ Merck ซึ่งไม่มีวิตามินบี 12 แต่จะมีเฉพาะสารที่สำคัญต่อการเจริญของ Lactobacillus leichmannii TISTR 449 เท่านั้น

5.3 การเตรียมตัวอย่าง

5.3.1 ปิเปต ตัวอย่าง จาก stationary flask และ ถังหมัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดฝาเกลียวแล้วเติม buffer cyanide solution 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก

5.3.3 นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที.

5.3.4 ปิเปต supernatant เก็บไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้อ cobalamin จะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์ และเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin จะอยู่ในส่วนของ supernatant

5.3.5 เจือจาง supernatant ที่ได้เพื่อให้ความเข้มข้นวิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้ โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น Double distillation ในอัตราส่วน 1: 10 1: 100 และ 1: 1000

5.3.6 นำตัวอย่างที่เจือจางได้นี้ไปหาปริมาณวิตามินบี 12 ต่อไป

5.4 การเตรียมสารละลายมาตราฐานวิตามินบี 12

5.4.1 การเตรียม working standard vitamin B_{12} ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดได้จากภาคผนวก)

5.4.2 การเตรียม working standard vitamin B_{12} ความเข้มข้น $5x10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจาก stock solution vitamin B_{12}

Solution A: ปิเปต stock solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรจาก ampule ซึ่งภายในบรรจุวิตามิน บี 12 เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร นำมาเจือจางเป็น 100 เท่า โดยใช้น้ำกลั่น double distillation

Solution B: ปิเปต solution a 0.1 มิลลิลิตรและโพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วย น้ำกลั่น double distillation จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตรเพื่อใช้เป็น working standard vitamin B_{12} ที่มีความเข้มข้น $5x10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4.3 การเตรียม standard assay tube

5.4.3.1 ปิเปต solution B ใส่ลงใน assay tube ขนาด 13x100 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4.3.2 เติมน้ำกลั่น double distillation ให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร

5.4.3.3 เติม double strength assay medium ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตรรวม 3.0 มิลลิลิตรทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer

5.4.3.4 นำ standard assay tube และ sample assay tube ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

5.4.4 นำไปวัดค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร โดยใช้ double strenght assay medium เป็น blank

5.4.5 เขียนกราฟ standard vitamin B_{12} โดยแกนตั้งแทนค่า O.D. และแกนนอนแทนความเข้มข้นของวิตามินบี 12 มีหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.5 การเตรียม sample assay tube

5.5.1 ปิเปต supernatant ของตัวอย่าง ที่เจือจางแล้วในข้อ 5.3.5 ของแต่ละความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นหนึ่งชนิดจะต้องปิเปตมา 0.2 , 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ทำทุกความเข้มข้นเช่นเดียวกัน และทุกปริมาณที่ปิเปตมาจะต้องทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.5.2 เมื่อปิเปตแล้วทุกหลอดต้องเติมน้ำกลั่น double distillation และ double strength assay medium

5.5.3 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer

5.5.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

5.6 การเตรียมสารละลายของเชื้อ Lactobacillus leichmannii

5.6.1 ถ่ายเชื้อ Lactobacillus leichmannii จาก stock culture ลงใน MRS agar แบบ agar stab ทุกวันใน 1 สัปดาห์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพที่สมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.6.2 ถ่ายเชื้อจาก agar stab ในข้อ 5.6.1 ลงใน micro – inoculum broth (ศึกษาการเตรียมจากภาคผนวก ข.) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะต้องถ่ายเก็บลง Micro – inoculum broth ทุกครั้งที่มีการ assay

5.6.3 นำมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางให้ค่า O.D. เท่ากับ 0.5

5.6.4 ปิเปตเชื้อใส่หลอด centrifuge 5.0 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกตะกอนเซลล์ไว้

5.6.5 ล้างตะกอนเซลล์เพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 เหลืออยู่ โดยใช้ single strength assay Medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ศึกษาวิธีการเตรียมและรายละเอียดได้จากภาคผนวก ข.)

5.6.6 เติม single strength assay medium 10 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ที่ได้ จากนั้นเจือจางด้วยอัตราส่วน 1: 1,000 ด้วย double strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

5.6.7 นำ suspension ของเชื้อที่ได้นี้หยดลงใน sample assay tube หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปต ยกเว้นหลอดที่เป็น Blank

5.6.8 เขย่าด้วย cyclo mixer นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

5.6.9 วัดค่าความน่าจะเป็นของเชื้อ และนำข้อมูลมาเขียนกราฟ เพื่อคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12 ในตัวอย่างออกมาในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii กับน้ำหนักแห้งของเชื้อ

การทดลองหาค่าน้ำหนักแห้งของเชื้อ จะอ้างอิงจากกราฟการเจริญเติบโต ที่ชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณเซลล์มากที่สุด จึงนำมาใช้ในการหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ทำได้โดยนำสารละลายเชื้อมาเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วจึงทำการวัดค่าความขุ่นของเชื้อ และหาน้ำหนักแห้งที่อัตราการเจือจางดังกล่าว จะได้กราฟมาตราฐานความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ ซึ่งในการทดลองต่อไปจะสามารถใช้กราฟนี้ เทียบหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ในชั่วโมงต่าง ๆ ของการหมักได้จากค่าความขุ่นของเชื้อที่อ่านได้

2. ผลการศึกษาอัตราการเจริญ ปริมาณเซลล์สูงสุดและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน Complete medium และน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสมใน สภาวะ Stationary flask และสภาวะในถังหมัก

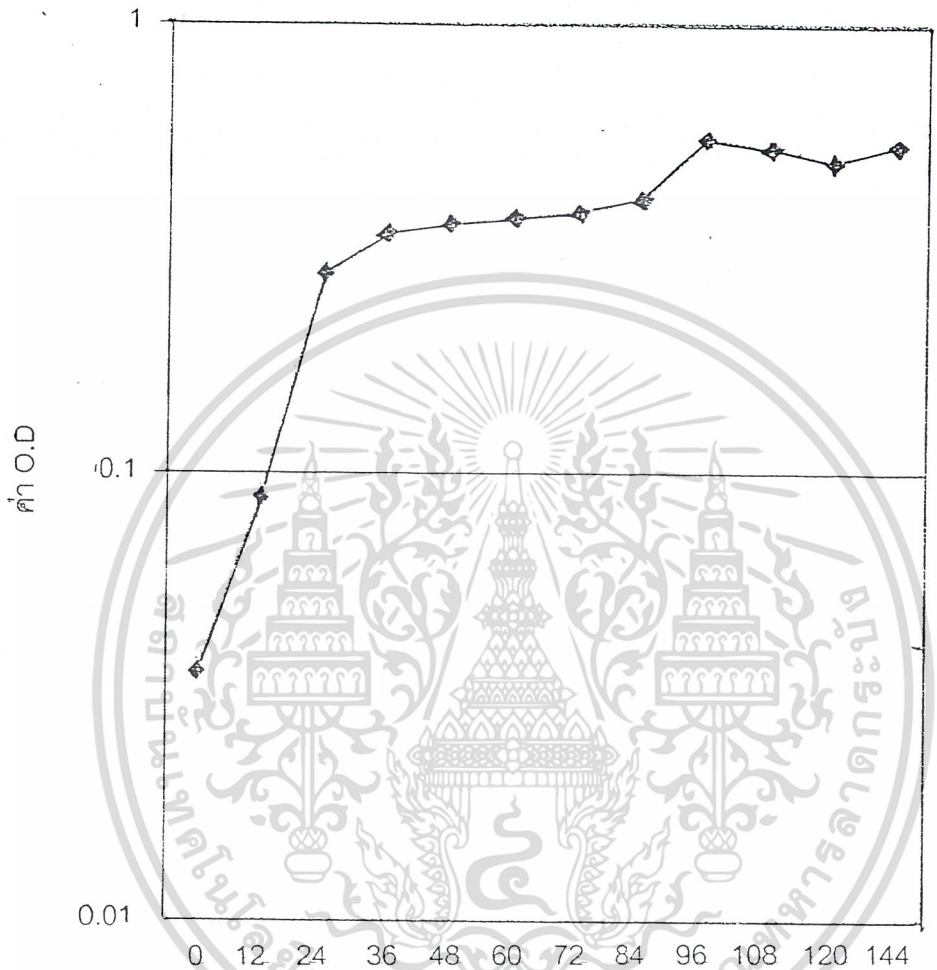
จากการทดลองการศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้อาหาร Complete medium และน้ำทิ้งที่ทำการเติม น้ำตาลกลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 2.0 เปอร์เซ็นต์ และ $CoSO_4$ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าในอาหาร Complete medium ที่สภาวะ Stationary flask จะมีปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.0020 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งที่ชั่วโมงที่ 96 และในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารสามารถผลิตวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.0036 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 96 และการทดลองศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ในถังหมักที่มีใบพัดกวนในอัตราเร็ว 300 รอบต่อนาที โดยใช้อาหาร Complete medium สามารถผลิตวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.0042 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งที่ชั่วโมงที่ 96 และน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุด 0.0044 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 96

การผลิตวิตามินบี 12 ที่มีปริมาณมากที่สุดจะเกิดที่ชั่วโมงที่ 96 พบว่าน้ำทิ้งที่ได้จากการหมักซอสถั่วเหลืองในถังหมักสามารถผลิตวิตามินบี 12 มากที่สุด ลำดับต่อมาคือ อาหาร Complete medium ในถังหมัก น้ำทิ้งที่ได้จากการหมักซอสถั่วเหลืองในสภาวะ Stationary flask และอาหาร Complete medium ในสภาวะ Stationary flask ผลิตวิตามินได้น้อยสุดตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

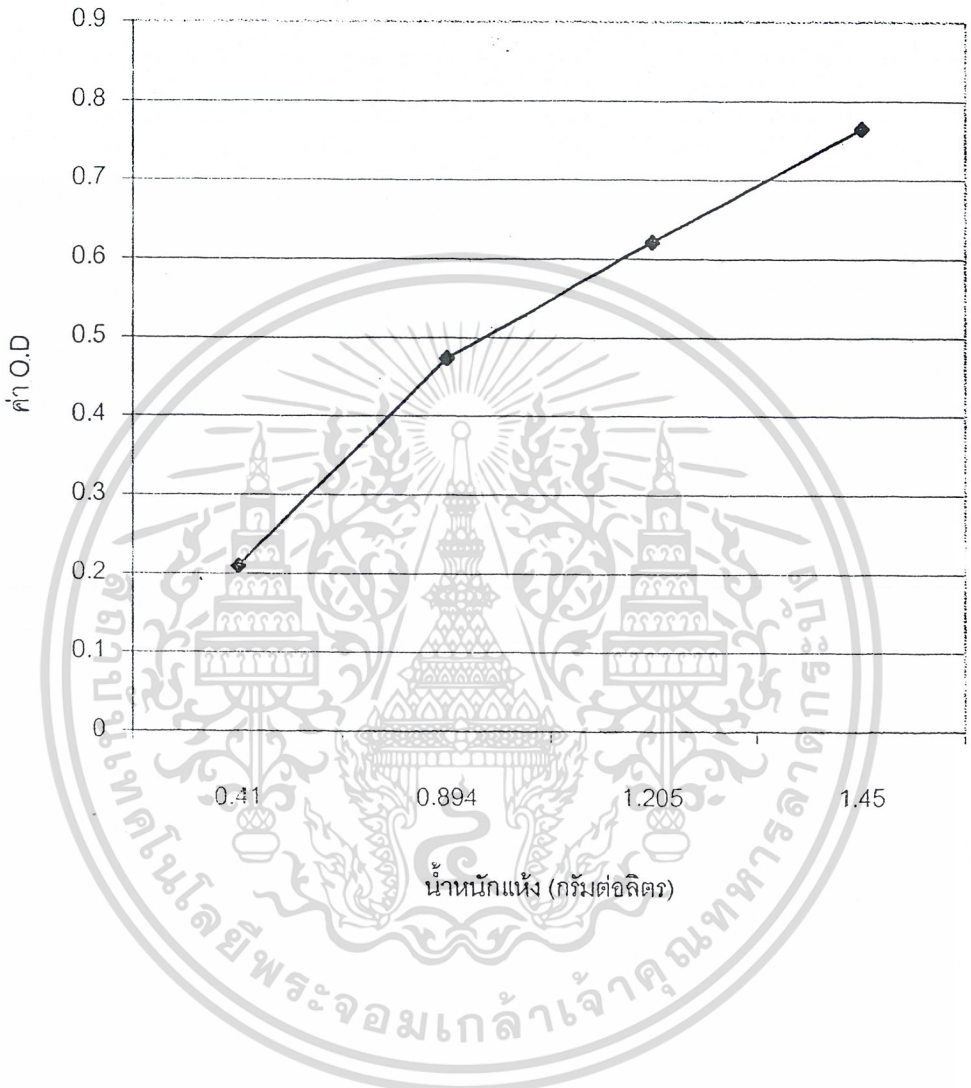
จากการวัดผลการเจริญของ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งในสภาวะ Stationary flask และในสภาวะภายในถังหมัก ปริมาณเซลล์สูงสุดจะเกิด ณ. ชั่วโมงที่ 72 หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ ส่วนอาหาร Complete medium ทั้งในสภาวะ Stationary flask และในสภาวะภายในถังหมักมีปริมาณเซลล์สูงสุด ณ. ชั่วโมงที่ 96 การเจริญเติบโตของเชื้อสูงสุดพบว่าในน้ำทิ้งในสภาวะ Stationary flask จะมีอัตราการเจริญสูงสุด ลำดับต่อมาคือน้ำทิ้งภายในถังหมักและอาหาร Complete medium ในถังหมักและอาหาร Complete medium ที่อยู่ในสภาวะ Stationary flask จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



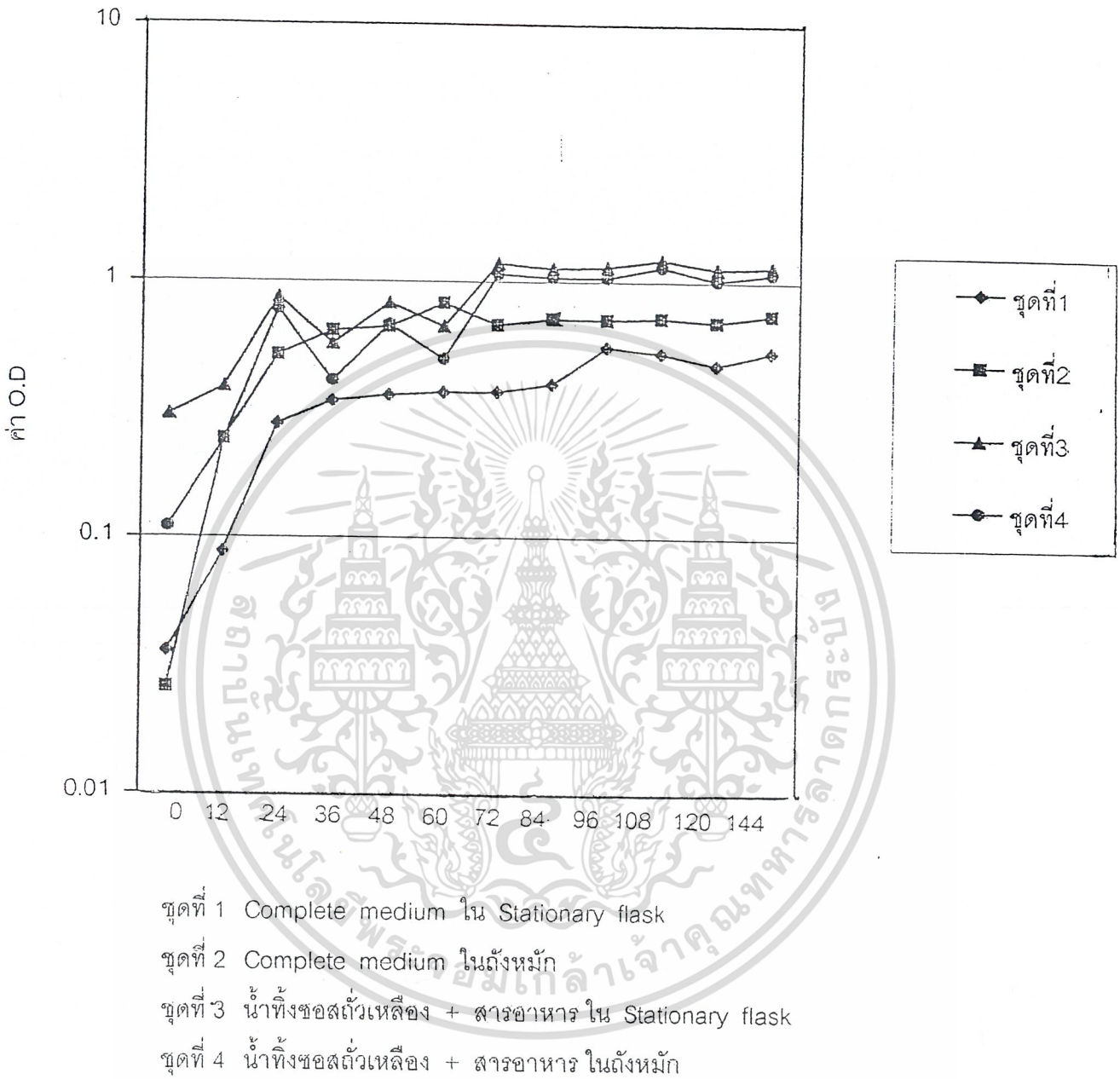
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium ที่ พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสใน Stationary flask

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



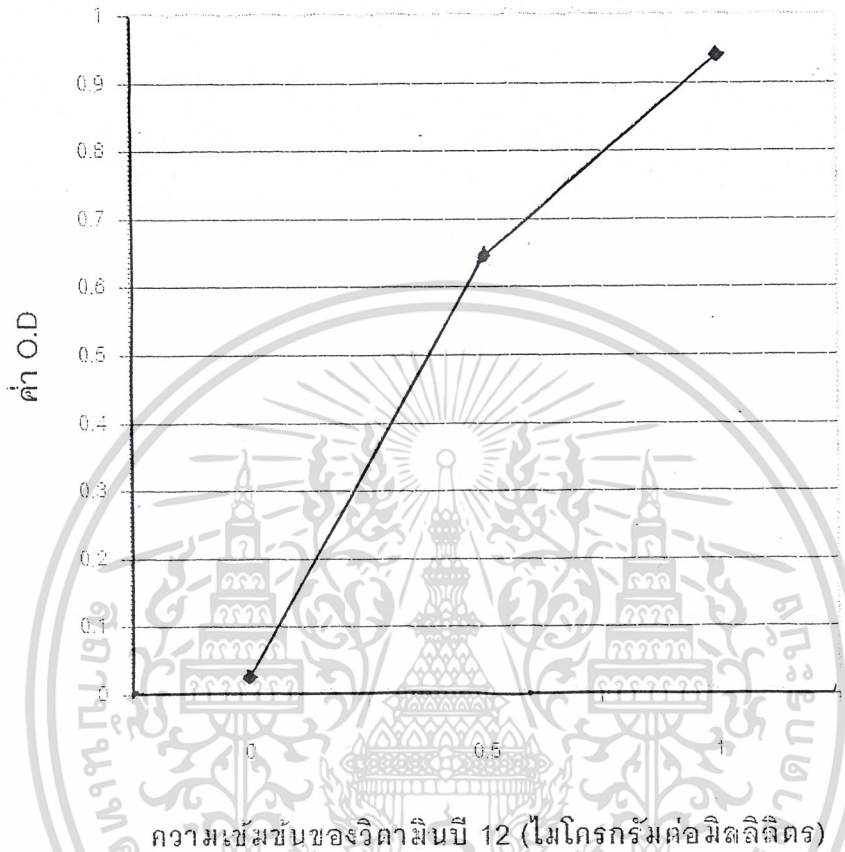
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) กับค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



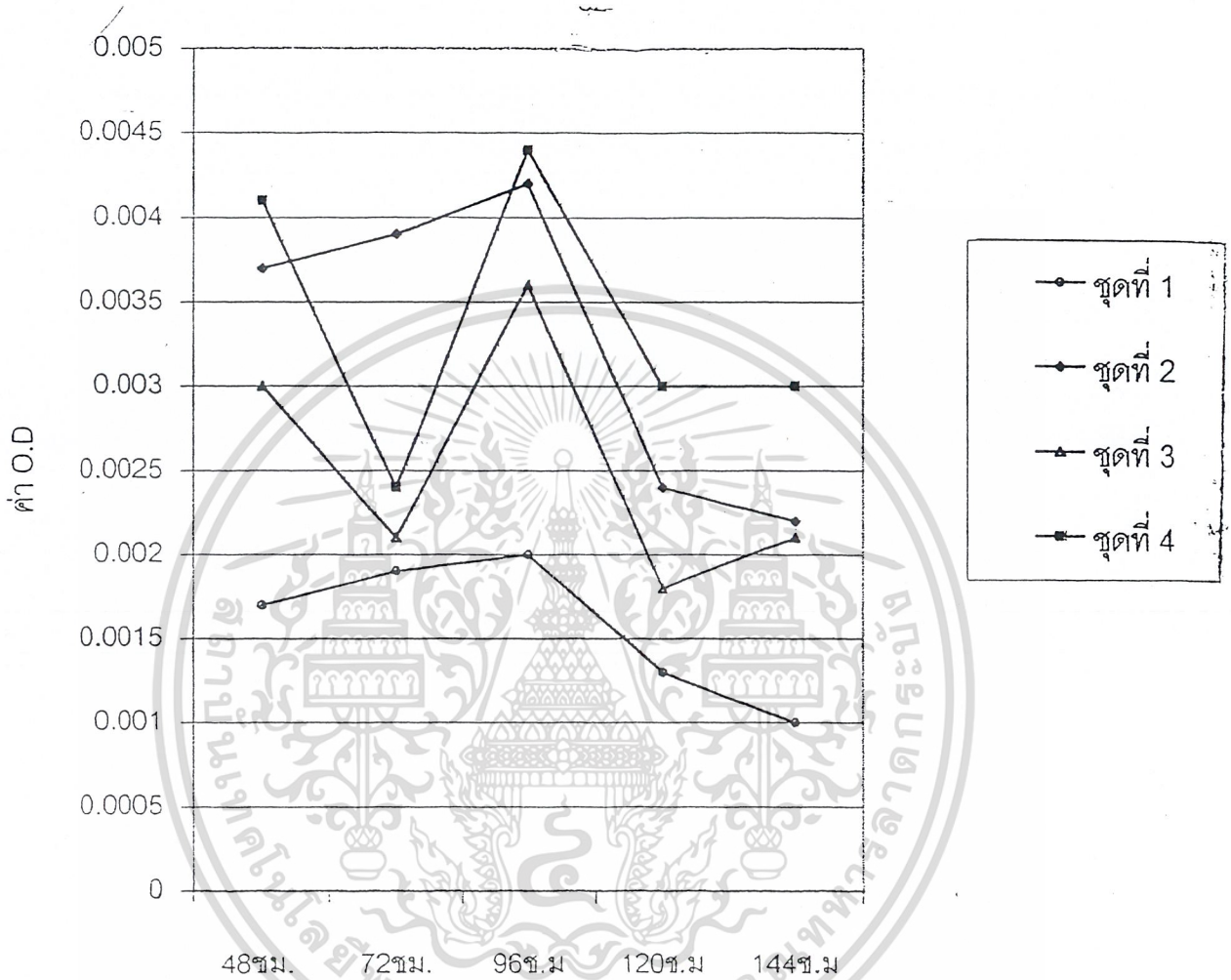
รูปที่ 4.3 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium และน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่ทำการเติมสารอาหารแล้ว ใน Stationary flask และ ในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงค่า O.D ที่ 660 นาโนเมตรและปริมาณวิตามินบี 12 ของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 Complete medium ใน Stationary flask

ชุดที่ 2 Complete medium ในถังหมัก

ชุดที่ 3 น้ำทิ้งซอสถั่วเหลือง + สารอาหาร ใน Stationary flask

ชุดที่ 4 น้ำทิ้งซอสถั่วเหลือง + สารอาหาร ในถังหมัก

รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium กับน้ำทิ้งซอสถั่วเหลือง + สารอาหาร ใน Stationary flaskและในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

Propionibacterium freudenreichii จะมีชีวิตอยู่ในช่วง 0 – 144 ชั่วโมง หลังจากนั้นประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อจะลดลง หลังจากการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้อาหาร complete medium ทั้งในสภาวะ Stationary flask และในสภาวะภายในถังหมัก ค่าพีเอชสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 3.3 โดยมีพีเอชเริ่มต้นก่อนการผลิตเท่ากับ 7.0 แสดงให้เห็นว่าน้ำที่ผ่านการหมักแล้วนั้นมีค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงมาก เนื่องจากมีการสะสมของอาหารบางชนิดเช่น propionic acid, acetic acid หรือของเสียที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงมากทำให้วิตามินบี 12 ไม่เสถียรจึงมีปริมาณวิตามินบี 12 ลดลงมากกว่าการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งกระบวนการหมักซอสถั่วเหลืองที่ผ่านการเติมสารอาหารแล้วไม่ทั้งในสภาวะ Stationary flask และสภาวะภายในถังหมักที่มีค่าพีเอชสุดท้ายหลังการหมักเฉลี่ยเท่ากับ 4.0 โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 น้ำทิ้งนี้สามารถรักษาสภาพค่าพีเอชของอาหารอยู่ในช่วง 4.0 – 7.0 ซึ่งเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ทำให้มีปริมาณวิตามินบี 12 อยู่มากกว่าอาจลดลงบ้างเล็กน้อยเท่านั้น

ในสภาวะภายในถังหมักจะมีปริมาณวิตามินบี 12 มากที่สุด ซึ่งมากกว่าการผลิตวิตามินบี 12 ในสภาวะ Stationary flask เนื่องจากระบบใบพัดกวนในถังหมักทำหน้าที่กวนให้สารอาหารและจุลินทรีย์ผสมเข้ากัน และความเข้มข้นของอาหารเท่ากันทั้งถังหมักทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้อาหารในการผลิตวิตามินบี 12 อย่างเต็มที่ ส่วนในสภาวะ Stationary flask จะเกิดความแตกต่างของสารอาหารที่ก้นฟลาสก์จะน้อยลงไปเรื่อย ๆ ทำให้การรับอาหารของจุลินทรีย์ไม่ทั่วถึง จึงทำให้การผลิตวิตามินบี 12 ลดน้อยลง

จากการผลิตวิตามินบี 12 ในครั้งนี้พบว่ายังได้ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ยังน้อยอยู่ โดยต้องทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ และน้ำกลั่นที่ใช้ในการทดลองต้องเป็นน้ำที่ทำการกำจัดไอออนและสิ่งเจือปนออกเพราะสิ่งเจือปนเหล่านี้มีผลต่อวิตามินมาก ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมสามารถลดต้นทุนการผลิตได้โดยนำเอาน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ก 1 ตารางแสดงผลการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium ที่ พีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสใน Stationary flask

	ค่า O.D			
ชั่วโมงที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0.021	0.010	0.005	0.036
12	0.121	0.036	0.107	0.088
24	0.266	0.311	0.256	0.278
36	0.296	0.430	0.297	0.341
48	0.317	0.450	0.313	0.360
60	0.345	0.438	0.328	0.370
72	0.342	0.445	0.328	0.372
84	0.393	0.464	0.339	0.399
96	0.553	0.551	0.564	0.556
108	0.550	0.564	0.466	0.527
120	0.519	0.451	0.453	0.474
144	0.574	0.451	0.581	0.535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก 2 ตารางแสดงผลการเปรียบการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium กับน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่เติมสารอาหารที่ได้ศึกษาระหว่าง Stationary flask กับ ถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชั่วโมงที่	O.D ที่ 660 นาโนเมตร			
	Complete medium		น้ำทิ้ง+สารอาหาร	
	Stationay Flask	ถังหมัก	Stationay Flask	ถังหมัก
0	0.036	0.026	0.301	0.110
12	0.088	0.242	0.387	0.241
24	0.278	0.514	0.865	0.780
36	0.341	0.640	0.569	0.410
48	0.360	0.664	0.824	0.678
60	0.370	0.824	0.669	0.498
72	0.372	0.678	1.182	1.068
84	0.399	0.715	1.126	1.042
96	0.556	0.710	1.142	1.035
108	0.527	0.721	1.220	1.144
120	0.474	0.699	1.124	1.015
144	0.535	0.745	1.146	1.077

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก 3 แสดงค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า O.D
0.0	0.027
0.5	0.646
1.0	0.940

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก4 ตารางแสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 โดย Propionibacterium freudenreichii ใน Complete medium ระหว่าง Stationary flask และ ถังหมัก

ชั่วโมงที่	Stationary flask			
	ค่า O.D	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
48	0.360	0.690	0.0012	0.0017
72	0.732	0.710	0.0013	0.0019
96	0.556	1.060	0.0021	0.0020
120	0.474	0.900	0.0012	0.0013
144	0.535	1.020	0.0010	0.0010

ชั่วโมงที่	ถังหมัก			
	ค่า O.D	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
48	0.664	1.260	0.0046	0.0037
72	0.678	1.290	0.0051	0.0039
96	0.710	1.350	0.0057	0.0042
120	0.6 99	1.330	0.0032	0.0024
144	0.745	1.410	0.0031	0.0022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก 5 ตารางแสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 โดย Propionibacterium freudenreichii ใน น้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองเติมสารอาหาร ระหว่าง Stationary flask และ ถังหมัก

ชั่วโมงที่	Stationary flask			
	ค่า O.D	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
48	0.824	1.550	0.0046	0.0030
72	1.182	2.240	0.0046	0.0021
96	1.142	2.150	0.0077	0.0036
120	1.124	2.120	0.0038	0.0018
144	1.146	2.170	0.0046	0.0021

ชั่วโมงที่	ถังหมัก			
	ค่า O.D	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
48	0.678	1.280	0.0053	0.0041
72	1.068	2.030	0.0049	0.0024
96	1.035	1.970	0.0086	0.0044
120	1.015	1.930	0.0057	0.0030
144	1.077	2.050	0.0062	0.0030

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก 6 ตารางแสดงผลเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichiiในอาหาร Complete medium และน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองที่ทำการเติมสารอาหารใน Stationary flask และถังหมัก

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ 660 นาโนเมตร			
	Complete medium		น้ำทิ้ง +สารอาหาร	
	Stationary Flask	ถังหมัก	Stationary Flask	ถังหมัก
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
48	0.0017	0.0037	0.0030	0.0041
72	0.0019	0.0039	0.0021	0.0024
96	0.0020	0.0042	0.0036	0.0044
120	0.0013	0.0024	0.0018	0.0030
144	0.0010	0.0022	0.0021	0.0030

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทำ Stock culture

1.1 อาหาร MRS medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
K_2HPO_4	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Tri – ammonium citrate	2.0	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$MnSO_4$	0.2	กรัม

อาหาร MRS medium ที่เตรียมได้ต้องนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหาร MRS agar มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ MRS medium แต่ต้องเติมวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตวิตามินบี 12

2.1 อาหาร Complete medium มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysis of casein	1.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	1.5	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม
K_3PO_4	1.6	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4$	10.0	มิลลิกรัม
$CoSO_4$	12.0	กรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Pantothenic acid	4.0	มิลลิกรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร
ปรับ พีเอช ให้ได้ 7.0		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ด้วย Turbidimetric Method of microbiological assay

1.1 Acetate buffer 0.1 M. พีเอช 4.6

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับ B

สารละลาย A : 0.1 M. CH_3COOH

acitic acid 5.8 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย B : 0.1 M. CH_3COONa

Sodium acetate 8.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลาย A 25.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 24.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 Buffer cyanide solution

ละลาย โพแทสเซียมไซยาไนด์ 1.0 กรัม ใน Acetate buffer 0.1 M. พีเอช 4.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย โพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์

ละลาย โพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

1.4 วิตามินบี 12 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผลึกวิตามินบี 12 (Cyanocobalamin) ของ Merck & co;Inc. 1.0 มิลลิกรัมในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 ปริมาตร100 มิลลิลิตร ดูดใส่ ampule (เตรียมจากหลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรโดยหลอมปลายปิดไว้ด้านหนึ่ง) 1.0 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปหลอมปลายอีกด้านหนึ่ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้เป็น Stock solution โดยแช่ไว้ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 Micro – inoculum broth ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii มีส่วนประกอบดังนี้

Bacto – yeast extract	20.0	กรัม
Proteose – peptone	5.0	กรัม
Bacto – dextrose	10.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.0	กรัม
Sorbitan monocleate complex(Span)	0.1	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.6 สารละลาย Single strength assay medium

ชั่ง วิตามินบี 12 assay medium ของ Merck & co;Inc 4.15 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Tween 80 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีสารละลายนี้ใช้สำหรับล้างเซลล์ Lactobacillius leichmannii

1.7 สารละลาย Double strength assay medium

ชั่ง วิตามินบี 12 assay medium ของ Merck & co;Inc 8.30 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Tween 80 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดละ 9 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายนี้สำหรับทำ Dilution ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii และใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

หมายเหตุ สารละลายวิตามินบี 12 assay medium ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์หาวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
แผนภาพแสดงวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน Stantionary flask liqour และ สภาวะภายในถังหมัก liqour ใช้วิธี Turbidimetric Method of Microbiological Assay โดยเชื้อ Lactobacillus leichmannii เป็น test organism ใน Vitamin B_{12} assay medium ของ Merck & Co; Ltd. ซึ่งมีเฉพาะสารที่จะเป็นต่อการเจริญแต่ไม่มีวิตามินบี 12

1.1 การเตรียม Sample assay tube

ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงใน test tube

↓

เติม Buffer cyanide solution 1.0 มิลลิลิตร

เขย่าด้วย cyclo mixer

↓

เขย่าด้วย cyclo mixer

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

↓

ปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

เก็บ supernatant แล้ว

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจือจาง Supernatant ด้วยน้ำกลั่น

Double distillation 10^{0} , 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3}

↓

ปิเปต Supernatant ที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร

0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอด assay tube

0.2, 0.5 , และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอด assay tube ปริมาตรละ 3 หลอด

↓

เติมน้ำกลั่น Double distillation

ให้มีปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตร

ให้มีปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตร ทุกหลอด

↓

เติม Double strength assay medium หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร

(ปริมาตรรวมเป็น 3.0 มิลลิลิตร ทุกหลอด)

เขย่าด้วย Cyclo Mixer

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

↓

ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วหยด สารละลายของเชื้อ

Lactobacillus lichmannii ด้วย pipetle ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

↓

ได้ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ :

1. การหยดสารละลายเชื้อให้หยดเพียง 2 หลอด อีก 1 หลอดที่เหลือให้เป็น blank สำหรับวัดความขุ่นของเชื้อ
2. เนื่องจากวิตามินบี 12 ที่เชื้อสร้างขึ้นอยู่ภายในเซลล์จึงต้องทำการทำให้เซลล์แตกด้วยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที cobalamin ที่เซลล์ปล่อยออกมาจะทำปฏิกิริยากับ Buffer cyanide solution ได้เป็น Cyanocobalamin อยู่ใน Supernatant

1.2 การเตรียม Standard vitamin B_{12}

ปิเปต Standard stock solution vitamin B_{12} ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

↓

เจือจางเป็น 100 เท่าด้วยน้ำกลั่น Double distillation โดยใช้ Volumetric flask 50 มิลลิลิตร

↓

โดยใช้ Volumetric flask 50 มิลลิลิตร

↓

ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.1 มิลลิลิตรเติม โพแทสเซียมไซยาไนด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

↓

เจือจางด้วยน้ำกลั่น Double distillation จนปริมาตร 100 มิลลิลิตรจะได้ Standard solution vitamin B 12 เข้มข้น 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปต Standard solution vitamin B 12 ปริมาตร 0.0,0.1 ,0.2 ,0.4 ,0.6 ,0.8 และ1.0

ใส่ในหลอด assay tube ปริมาตรละ 3 หลอด

↓

เติมน้ำกลั่น Double distillation ให้มีปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตร ทุกหลอด

↓

เติม Double strength assay medium 1.5 มิลลิลิตร

(ปริมาตรรวมเป็น 3.0 มิลลิลิตร ทุกหลอด)

เขย่าโดยใช้ cyclo mixer

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

(ทำการนึ่งพร้อมกับ sample assay tube) ทิ้งไว้ให้เย็น

↓

หยด สารละลายของ เชื้อ Lactobacillus leichmannii บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็น

เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

↓

วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

1.3 การเตรียมสารละลายของเชื้อ Lactobacillus leichmannii

ทำการต่อเชื้อ Lactobacillus leichmanniiลงใน

MRS agar แบบ stab

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายเชื้อ Lactobacillus leichmannii ที่อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์
ลงใน Micro-inoculum-broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
ให้ได้ค่า O.D เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

ปิเปตใส่หลอด Centrifuge 5 มิลลิลิตร

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

ปิเปตเอาส่วนที่เป็นน้ำออก เก็บตะกอนเซลล์ไว้

ล้างตะกอนเซลล์เพื่อไม่ให้ปริมาณวิตามินบี 12 เหลืออยู่
โดยใช้ single strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ทำการเขย่าด้วย Cyclo mixer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจือจางสารละลายที่ได้ให้เป็น 1:1000 ด้วย
Double strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

↓

ทำการถ่ายสารละลายเซลล์

หมายเหตุ

การเตรียมสารละลายของเชื้อ Lactobacillus leichmannii ทุกขั้นตอนต้องทำแบบปลอดเชื้อ

2. **การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12**

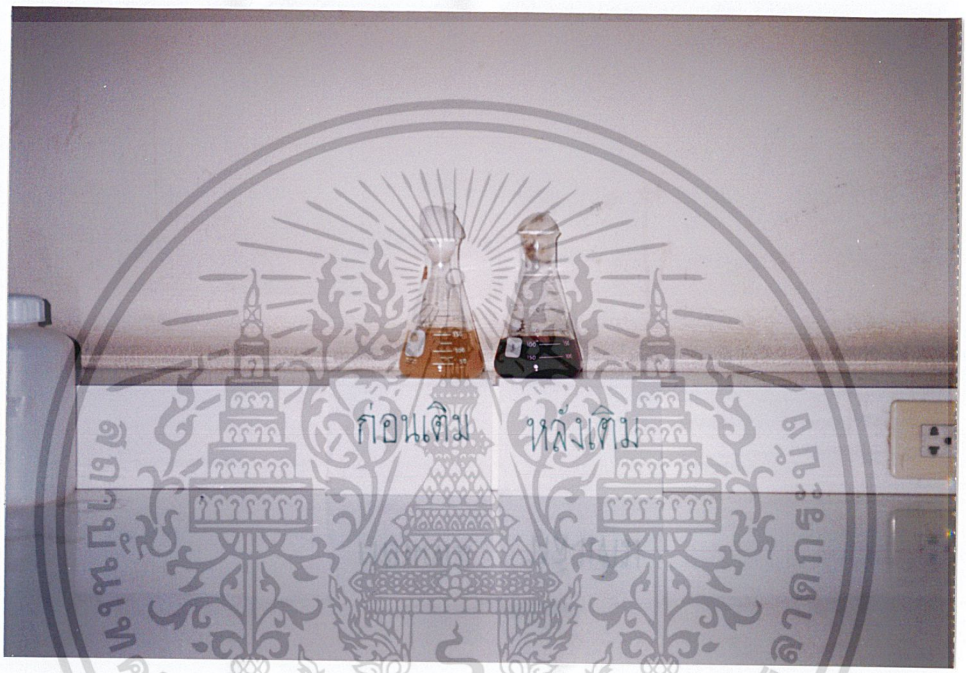
เส้นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับความเข้มข้นของวิตามินบี 12 มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณวิตามินบี 12} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยจากกราฟมาตรฐานวิตามินบี 12}}{\text{ปริมาณของตัวอย่าง}} \times \text{ความเจือจาง}$$

(ปริมาณของวิตามินบี 12 และค่าเฉลี่ยของปริมาณวิตามินบี 12 มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

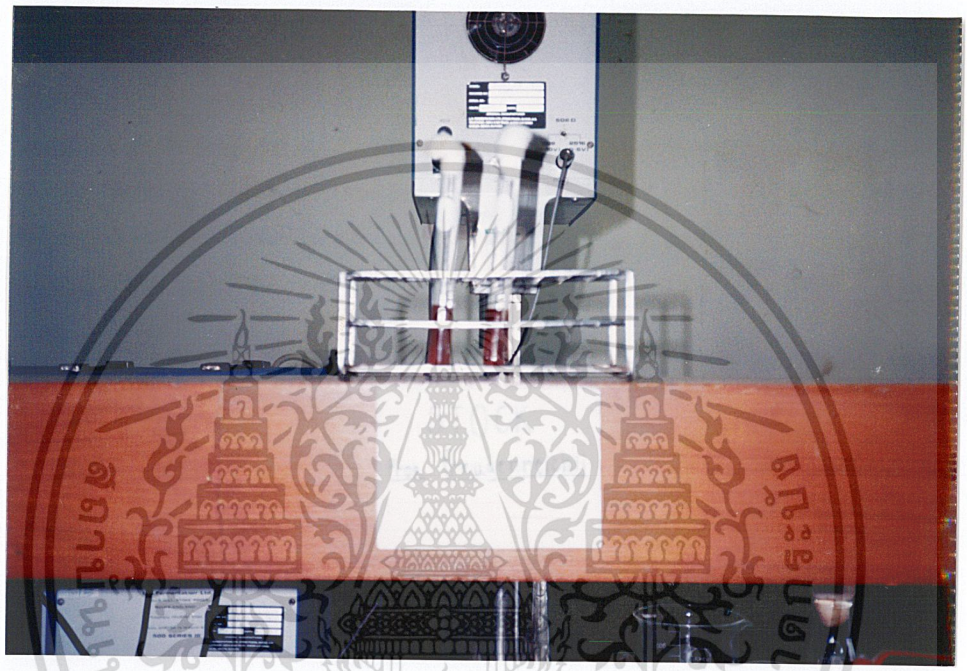
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
รูปภาพประกอบการทดลอง



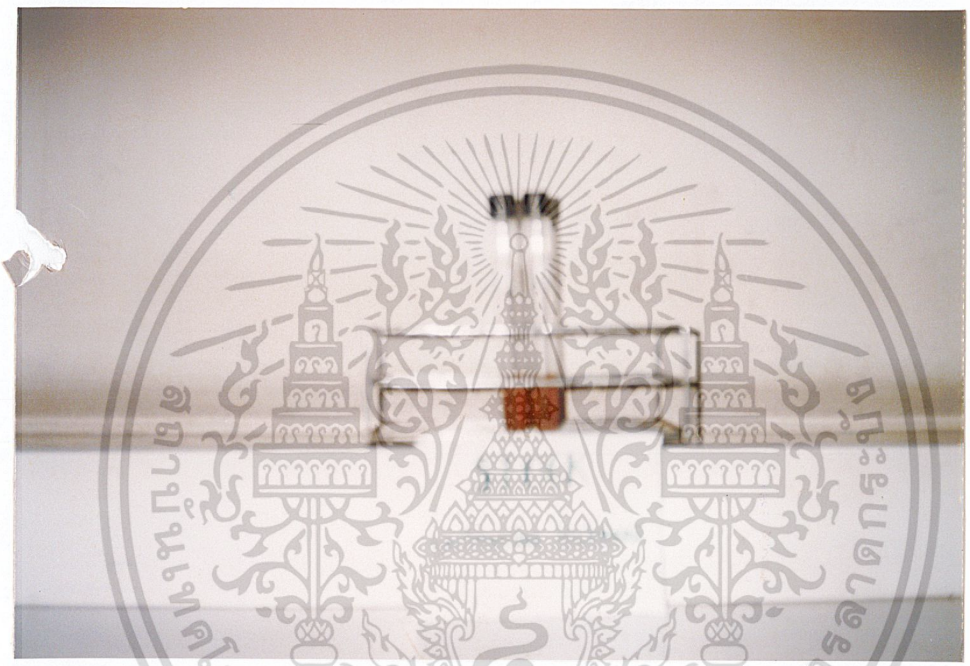
รูปที่ ง 1 แสดงน้ำทิ้งจากการหมักซอสถั่วเหลืองก่อนเติมสารอาหารและหลังเติมสารอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ง 2 แสดง Stock culture ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



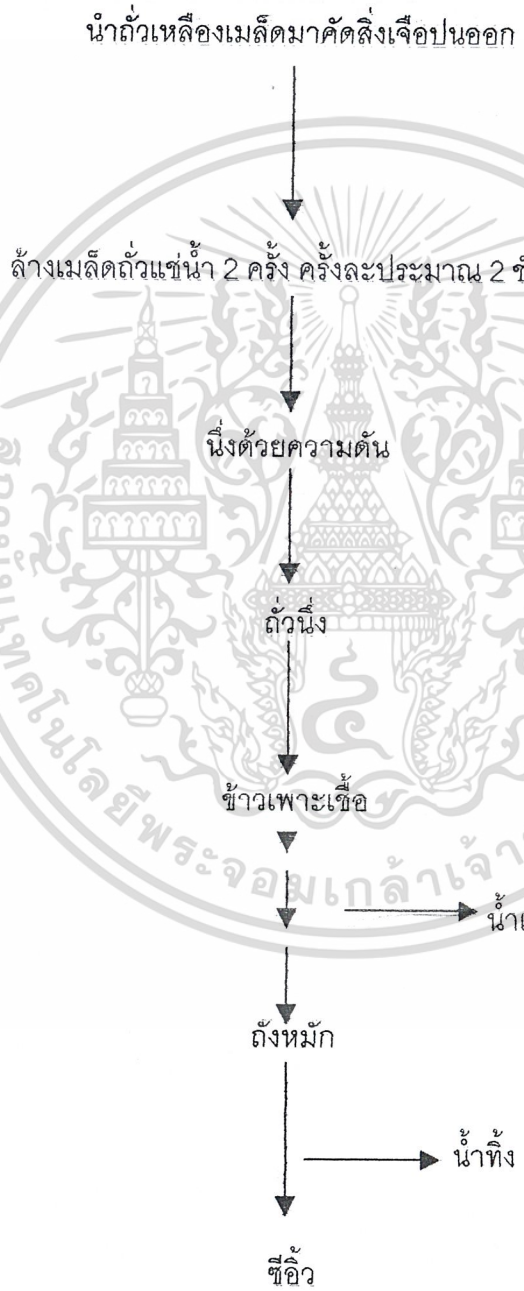
รูปที่ ง 3 แสดง Stock culture ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii ที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง 4 แสดง ถังหมักขนาด 2 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
แผนภาพแสดงกระบวนการผลิต ซีอิ๊ว ของบริษัทง่วนเซียง อุตสาหกรรมอาหาร จำกัด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิจจา ช.เจริญยิ่ง จิรัฐ นรเศรษฐธีรกุล และธเนศ เอิบอิ่มฤทธิ์ " การผลิตวิตามินบี12 โดย Propionibacterium freudenreichii ATCC จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ " โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2536.

ชลลวิชช์ ศิริขันธ์ วันวิสา ทวีแสง และเสาวนีย์ จิรธารานนท์ " การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตวิตามินบี12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii " โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2535.

ณัฐวุฒิ สุรณัฐกุล ทวีป เผือกเทศ และนิยม มาลัยเลิศ " การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋องเพื่อผลิตวิตามินบี12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii " โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2536.

พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์ "การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii subsp.sherminii ATCC 13673 โดยวัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ " วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2518.

พิณทิพย์ พุลโภคา " การคัดเลือกสายพันธุ์ Pseudomonas *ssp.*และการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี12 " วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2523.

เทพประสิทธิ์ ผดุงโยธี ธีรยุทธ หอมทอง และศิริเพ็ญ เชิญชัยวชิรากุล " การศึกษาผลของปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii TISTR 446" โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง , 2540 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทอดไทย เอกา จารุวรรณ วงศ์วรกุลกิจ " การศึกษาผลของปัจจัยการผลิตวิตามินบี12 จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii " โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2537.

บุษบา ยงสมิทธ์ " วิตามินบี 12 " จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2540.

ประชา บุญศิริกุล. การไปฝึกอบรม "การแปรรูปถั่วเหลืองให้เป็นอาหาร " วารสารอาหาร 7(3) : 21-34, 2518.

เสริมพล รัตสุข และไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. "การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชน " สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย, 2518.

สุวิทย์ อารีกุล. "กรดโฟลิกและวิตามินบี12 " ภาควิชารังสีไอโซโทปเขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล, 2522.

อำนวย ทองดี. " การเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง " วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 9(2) : 99-100, 2519.

Ansbacher, S. ,W.H. Hill , J.W. Thieman, J.F. Dowing and J.H. Caldwell. " Microbially synthesized APF(animal protein factor) ". Fedn Proc. 8 : 180.

Baron, A. 1962, " Use of thickening agent " U.S. Patent . 3,067,109, Dec. 4. Development Corp, New Jersey.

Baker, H. and H.B. Rose. 1957, " Production of vitamin B12 by thermophiles U.S.Patent. 2,917,436, Dec. 15, 1957.

Bray, R.C. and D. Shemin.1963 " On the biosynthesis of vitamin B12. " J.biol.Chem. 238 : 1501-1508.

Buchanan, R.E. ; N.E. Gibbson ; S.T. Cowan ;J.G. Holt ; J. Liston .1974. Bergey's Mannual of eterminative Bacteriogy. 8th ed. William and Wilkins Company, Baltimore.

Chinoin-Gyogyszer. 1971. "Crystalline coenzyme B_{12} by fermentation " French patent 2,062,367 .

Davis, B.D. and E.S. Mingioli. 1950." Mutants of E.coli Requiring methionine or vitamin B_{12}. " J.bacteriol. 60 : 17-28.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Demain, A.L. and R.F. White. 1971 " Phorphyrin overproduction by Pseudomonas denitrificans : essentiality of betaine and stimulation of ethionine. " J.bacteriol., 107 ; 456-460.

Di Marco,A.G. Boretti and C. Spalla. 1961. "Biosynthesis of cyanocobalamin in Nocardia rugosa " Sci.Repts. Ist . Sup Sanita (Rome),1 :355-367.

Florent,J.and L. Ninet. 1979 Vitamin B_{12}. p.497-519 In H.J. Peppler and D. Perlman. (eds) Microbial technology.Vol, 1.Academic press, New York.

Friedman, H.C. and C.M. Cagen . 1970. " Microbial biosynthesis of vitamin B_{12}-like compound" Annual Review. Microbiology. 24 : 160-208.

Grant, D. 1960. " Oxygen addition. " U.S.Patent 2,956,932 ; October 18, In : Noyes, R. ; 1969, Vitamin B_{12} manufacture, Noyes Development Corp,New Jersey.

Hargrove, R.E. and A. Leviton. 1951. " Process for the manufacture of vitamin B_{12} " U.S.Patent 2,715,602. August 16, 1955.

Hodgkin,D.C. ; J. Pichworth ; J.H. Robertson ; K.N. Trueblood ; R.J. Proson ; J.G. White ; R.Bonnet ; J.R.Cannon ; A.W.Johnson ; Sutherland ; A.R. Todd and E.L. Smith. 1955, Nature 176 : 325.Citied in rainbow, C. and A.H. Rose. 1963, Biochemistry of industrial microorganisms. Academic Press, Inc., London and New York.

Hunter, S.H., L. Provasoli, E.L.R.Storkstad,C.E. Hoffman,M. Belt, A.L. Fraklin and T.H. Jukes. 1949. " Assay of antipernicious anemia factor with Eulena. " Proc. Soc. Exptl. Med. 70 : 118-120.

Jackson, W.G., G.B. Whitefield and N.H. De Vries. 1951 ."The isolation of Vitamin B_{12} fromneomysin fermentation".J. Am . Chem . Soc. 73 : 337-341.

Kaczka, E.A., D.E. Wolf and K. Folkers.1956. "Vitamin B_{12} analogs and process for preparing the same" U.S. Patent . 2,738 , 302. Merck and Co .,Inc .

Kaken and Kagaku, K.K. 1965. Japanese Patent 65/4,440 .

Miller,I.M. and C. Rosenblum.1960. "Production of vitamin B_{12} using delta aminolevulinic acid " U.S. Patent . 2,939, 822 : Merck and Co .,Inc .

Noyes, R., 1969. Vitamin B_{12} manufacture , Noyes Development Corp, New Jersey.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Perlman, D. ; J.B. Semar and W.B. Frazier. 1960, Abst. 138th Meeting Amer. Chem. Soc. P. 10 A. Citied in Rainbow ; c. and A.H. Rose, 1963.Biochemistry of industrial microorganisms. Academic Press, Inc., London and New York.

Pierrel, S.P.A. 1963a . "Hydroxocobalamine from cyanocobalamine by ion Exchange" French patent 1,325, 304 .

Pierrel, S.P.A. 1963b." Pure hydroxocobalamine from natural materials by ion Exchange" French patent 1,325, 308 .

Pirce, J.V., A.C. Jr Page, E.L.R.Stokstad and T.H.Jukes. 1950. " Study of some Characteristics of vitamin B_{12} " J.Am.Chem.Soc. 72 : 2615-2616.

Prescott, S.C. and C.G. sunn. 1959, The production of vitamin B_{12} , Mc graw-Hill Book. Co.,New York,Toronto and London.

Renz, P. 1970 "Riboflavin as precursor in the biosynthesis of the 5,6-dimethylbenzimidazole-moiety of vitamin B_{12} " FEMS Letter. 6 (3) : 187-189.

Sato, K.,H. Ohmori,S. Shimizu and S. Fugui. 1971.Agric Biol. Chem. 35 : 333-50.

Sato, K.,S.Ueda and S. Shimizu. 1977. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 515-521.

Sebrell, W.H. Jr And R.S. Harris. 1968 " The vitamins chemistry, physiology, Methode" Academic Press, Inc., London and New York.

Shemin, D. and R.C. Bray. 1964 " The biosynthesis of corrin structure of vitamin B_{12} " Annu,N.Y.Acad.Sci.112: 615-621.

Sifa. 1964 " 5,6- dimethylbenzimidazole-cobamide-coenzyme " Frence Patent 1,368,892.

Smith, E.L. and S. Ball . 1953 ." Nitrous acid treatment for separating impurities from antipermicious anemia active materil " U.S. Patent . 2,630,402.

Spalla, C.,A. Grein, L Garofano,and G.Ferni. 1989. Microbial production of vitamin B_{12} " pp.256-284. In E.J. Vandamme (ed.), Biotechnology of vitamin , Pigments and Growth Factors. Elsevier Appliend Science,London and NewYork.

Speedie, J.D. and G.W.Hall. 1960 . " Cobalamin producing fermentation process " U.S. Patent 2,951,017.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Speedie, J.D. and G.W.Hall. 1960 ," vitamin B12 Production by Propionibacterium shermanii " U.S. Patent 2,951,317 . July 15, 1963.

Wood, H.G.; R.W. Stone and C.H. Werkman. 1937 , " The intermediate metabolism of the propionic acid bacteria " Biochem.J. 31 : 349.

Youngsmith, B., A. Sonomoto, A. Tanaka and S. Fukui. 1982. "Vitamin B_{12} production by immobilized Propionibacterium arl AKU 1251 " Eur. J.Appl. Microbiol. Biotechnology.16:70-74.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้