สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์ผลจากการศึกษาปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

นายกอบชัย พรดุษฎีกุล
นางสาวเกศินี ชื่นปิยะวาจา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2538

ปพ.
ก363ค
-2538-
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 25404
วัน, เดือน, ปี 9 ก.ค. 2539

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Analysis of Vitamin B_{12} production from waste water of livestock chicken factory by *Propionibacterium freudenreichii* under studied condition.

Mr. Kobchai Porndussadeekul

Miss Kasinee Chuenpiyawacha

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of
the Requirment for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การวิเคราะห์ผลจากการศึกษาปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

โดย นายกอบชัย พรดุษฎีกุล

นางสาวเกศินี ชื่นปิยะวาจา

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(อาจารย์ อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต)

_____ กรรมการ

(ผศ.ดร.เรียม เตชะโสภณณี)

_____ กรรมการ

(รศ.สุขใจ ชูจันทร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การวิเคราะห์ผลจากการศึกษาปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

โดย นายกอบชัย พรดุษฎีกุล

นางสาวเกศินี ชื่นปิยะวาจา

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งส่วนน้ำทิ้งรวมของโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 5.0 เปอร์เซ็นต์ และ $CoSO_4 . 7H_2O$ 2.0 มิลลิลิกรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะการหมักแบบ Stationary flask และ Fermentor ที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.0 พบว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่สภาวะ Stationary flask มีปริมาณสูงสุด 0.480 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งที่ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร complete medium ในสภาวะเดียวกันสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุดเพียง 0.252 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งน้อยกว่า 52.48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่สภาวะเดียวกัน

เมื่อเลี้ยง Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามที่ได้ศึกษาเช่นเดียวกับข้างต้น ปริมาตร 1.0 ลิตร ในถังหมัก (Fermentor) ความจุ 2.0 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 7.0 และกวนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ พบว่าสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุด 2.206 ไมโครกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมน้ำหนักแห้งที่ชั่วโมงที่ 96ของการหมัก และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร complete medium ในสภาวะเดียวกันสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุดเพียง 0.715 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่ชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งน้อยกว่า 32.43 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่สภาวะเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่มีการเติมสารอาหารต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการหมักแบบ Stationary flask กับ Fermentor พบว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ ภายใต้สภาวะการหมัก แบบ Fermentor มีปริมาณสูงกว่าสภาวะการหมักแบบ Stationary flask ถึง 21.76 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Analysis of Vitamin B_{12} production from waste water of livestock chicken factory by Propionibacterium freudenreichii under studied condition.
Name	Mr.Kobchai Porndussadeekul
	Miss Kasinee Chuenpiyawacha
Special Project Advissor	Dep.Prof. Sukjai Choojan
Department	Applied Biology
Acedemic Year	1995

Abstract

The studying of vitamin B_{12} production by Propionibacterium freudenreichii from poultry factory waste water contained additionally nutrients as 1.5 percent (w/v) of glucose, 5.0 percent (w/v) of yeast extract and $CoSO_4.7H_2O$ 2.0 milligrams / litre under stationary flask and fermentor's condition , which controlled temperature was 30 c , initial pH 7.0 and inoculumn was 0.26 grams by weight/litre. From this experiment's result found that the highest yield of vitamin B_{12} produced under stationary flask condition was 0.480 micrograms/gram dry weight in the 96^{th} hour of fermentation that less than 52.48 % of the vitamin B_{12} yield produced from poultry factory waste water under the same condition.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fermentation of Propionibacterium freudenreichii in 1 litre of poultry factory waste water contained additionally nutrients under fermentor's condition with 2 litre fermentor controlled temperature at 30 c , initial pH was 7.0 and agitated with 100 rpm without aeration found that the vitamin B_{12} yield was maximum at 2.206 micrograms/gram dry weight in the 96^{th} hour of fermentation while vitamin B_{12} production from complete medium in the same condition was maximum at 0.715 micrograms / gram dry weight in the same hour that less than 32.42 % of vitamin B_{12} yield produced from poultry waste water contained additionally nutrients.

From the comparation between yield of vitamin B_{12} produced from poultry waste water under stationary flask's condition and fermentor's condition show that the yield of vitamin B_{12} produced under fermentor's condition was higher than the yield of vitamin B_{12} produced under stationary flask's condition up to 21.76 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่องนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปได้ ถ้าไม่ได้รับความอนุเคราะห์ความร่วมมือ และความช่วยเหลือของบุคคล ดังต่อไปนี้

1. รศ.สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำและความรู้ซึ่งเป็นแนวทางสำหรับแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ในโครงงานพิเศษ ตลอดจนอำนวยความสะดวก และให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ดำเนินโครงงานพิเศษจนสำเร็จ

2. อาจารย์สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำ และความรู้เกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการดำเนินโครงงานพิเศษ รวมทั้งแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างดำเนินโครงงานพิเศษ

3. บริษัท ไก่สด ซี.พี. จำกัด ที่อนุเคราะห์น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิต

4. เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาทุกท่าน

5. เพื่อนๆ น้องๆ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ และช่วยเหลือในการดำเนินงาน

จึงขอขอบคุณอย่างสูงมา ณ.โอกาสนี้

ผู้จัดทำ

มีนาคม 2539

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย ก

บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ ข

กิตติกรรมประกาศ ค

สารบัญตาราง ง

สารบัญรูป จ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 4

ลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii 4

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 14

การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง 19

การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ 29

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 31

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 40

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 57

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก : อาหารเลี้ยงเชื้อ 58

ภาคผนวก ข : สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 60

ภาคผนวก ค : แผนภาพแสดงวิธีวิเคราะห์ผล 62

ภาคผนวก ง : ตารางแสดงผลการทดลอง 69

ภาคผนวก จ : รูปประกอบการทดลอง 80

เอกสารอ้างอิง 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	8
2.2	แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนและปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	9
2.3	แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	9
2.4	แสดงอิทธิพลของ Nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	10
2.5	แสดงขบวนการและอาหารที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ในอุตสาหกรรม	27
ง.1	แสดงผลการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในอาหาร complete medium ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask	69
ง.2	แสดงความขุ่นของเชื้อ(O.D.) และ น้ำหนักแห้ง(cell dry weight) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในอาหาร complete medium ที่ pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask	70
ง.3	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium กับน้ำทิ้งไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง.4	แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของ Vitamin B_{12} working standard ของ complete medium ณ.ชั่วโมงต่าง ๆ	71
ง.5	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 48	72
ง.6	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 72	72
ง.7	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 96	72
ง.8	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 120	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง.9	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 144	73
ง.10	แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของ Vitamin B_{12} working standard ของน้ำทิ้งไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงต่าง ๆ	74
ง.11	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 48	75
ง.12	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 72	75
ง.13	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 96	75
ง.14	แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 120	76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ หน้า

ง.15 แสดงผลค่า O.D.ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 144 76

ง.16 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ระหว่าง สภาวะ stationary flask กับ fermentation 77

ง.17 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษามา ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation 78

ง.18 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษามา ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation 79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดง Dissimilation ของน้ำตาลกลูโคสโดย Propionic acid bacteria	5
2.2	แสดง Riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญต่อการผลิตวิตามินบี 12	16
2.3	แสดง Structure of vitamin B_{12} และ related compound	20
2.4	แสดงสมมติฐานของ Biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12	21
2.5	แสดงการสังเคราะห์ corrin ring	22
4.1	แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน complete medium ที่ pH เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask	43
4.2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล์ กับค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	44
4.3	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium กับน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	45
4.4	แสดงปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium และน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.5	แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 48	47
4.6	แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 72	48
4.7	แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 96	49
4.8	แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 120	50
4.9	แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 144	51
4.10	แสดง calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 48	52
4.11	แสดง calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 72	53
4.12	แสดง calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 96	54
4.13	แสดง calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 120	55
4.14	แสดง calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 144	56
จ.1	เปรียบเทียบน้ำทิ้งไก่ก่อนเติมสารอาหาร และหลังเติมสารอาหาร	80
จ.2	แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร complete medium สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ชั่วโมงที่ 96	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
จ.3	แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร complete medium สภาวะ fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ชั่วโมงที่ 96	82
จ.4	แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ชั่วโมงที่ 96	83
จ.5	แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ สภาวะ fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ชั่วโมงที่ 96	84
จ.6	แสดงเชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis ในอาหาร Microinoculum broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	85
จ.7	แสดง Sample assay tube เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

วิตามินบี 12 หรือ ไซยาโนโคบาลามิน (Cyanocobalamin) เป็นวิตามินที่เป็นต้นกำเนิดของโคเอนไซม์บี 12 หรือ methyl cobalamin ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกรดโฟลิก (Folic acid) ซึ่งส่วนใหญ่มักอยู่ในรูป methyl tetrahydrofolate ให้เป็นสารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้โคเอนไซม์บี 12 ยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน methyl malonyl coA ให้เป็น succinyl coA และพบว่าถ้าร่างกายขาดหรือไม่สามารถดูดซึมวิตามินบี 12 ได้จะเป็นโรคโลหิตจางชนิดรุนแรงถึงชีวิต ที่เรียกว่า Pernicious anemia ผู้ป่วยจะมีอาการผิดปกติทางระบบประสาท ร่วมกับความผิดปกติในการสังเคราะห์เม็ดเลือดแดง จากความสำคัญของวิตามินบี 12 ดังกล่าวข้างต้น วิตามินบี 12 จึงเป็นวิตามินที่มีความต้องการสูงมากในทาง การแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์

ในปัจจุบันการผลิตวิตามินบี 12 ในรูปที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้นั้น ได้มาจากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์เท่านั้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ แบคทีเรียโดยเฉพาะ Propionibacterium freudenreichii และเมื่อพิจารณาประกอบกับสภาพอุตสาหกรรมในประเทศไทย พบว่าโดยส่วนใหญ่เป็นอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้มีปริมาณสูงมากก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่เมื่อพิจารณาในด้านความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารจากน้ำทิ้งเหล่านี้ พบว่ามีความเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตวิตามินบี 12 เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์ ทั้งยังเป็นการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งเพื่อช่วยลดปัญหามลภาวะของสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุจูงใจในการทำโครงงานพิเศษ

1. วิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์เท่านั้น และในปัจจุบันความต้องการวิตามินบี 12 ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์สูงมาก

2. เพื่อเป็นการนำกากของเสียมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด และเป็นการลดปัญหามลภาวะ

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ในสภาวะต่าง ๆ ที่มีการศึกษาปัจจัยในการผลิตโดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii โดยวิธีการ Turbidimetric method of Microbiological assay โดยใช้เชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis เป็นตัวตรวจสอบ

วิธีการดำเนินการโดยย่อ

การดำเนินการทดลอง แบ่งออกเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 : เลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่ได้มีการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ และ ในอาหารชนิด Complete medium ทั้งในสภาวะ Stationary flask และ Fermentor

ขั้นที่ 2 : วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตขึ้นโดยวิธี Turbidimetric method of Microbiological assay โดยเชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis

ขั้นที่ 3 : การวิเคราะห์ผล สรุปผล และจัดทำรายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

2. กระบวนการหมักวิตามินบี 12 เป็นการปรับปรุงคุณภาพน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่ใช้ให้ดีขึ้น โดยจะสามารถลดค่า BOD ลงจนสามารถปล่อยลงแหล่งน้ำธรรมชาติได้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

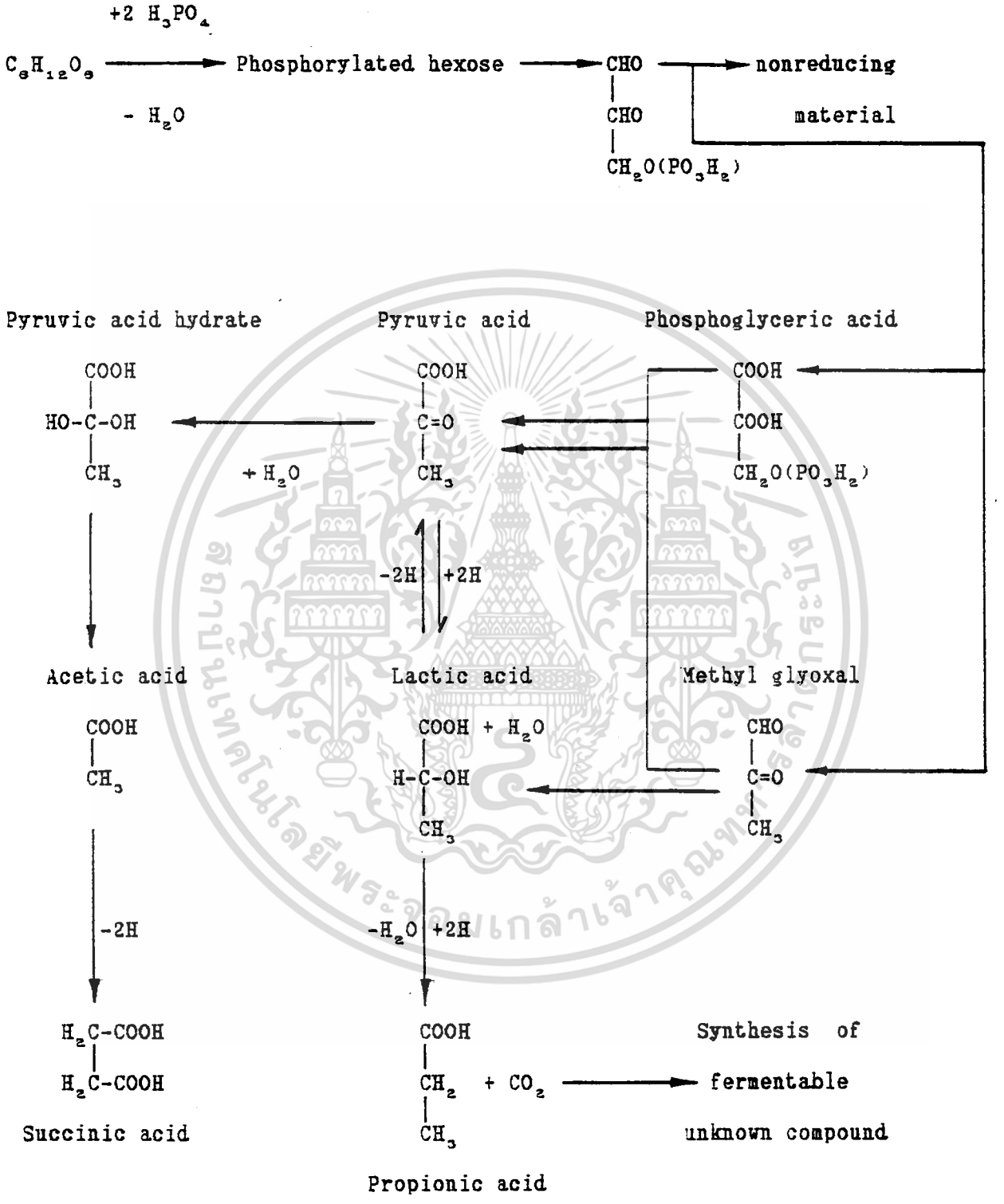
การศึกษาลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.

Propionibacterium freudenreichii (15) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จาก Diary product, นมดิบ และ Swiss cheese เมื่อเชื้อเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะมีรูปร่างกลม และขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน มักอยู่เป็นคู่หรือสายสั้นๆ ส่วนในสภาวะที่มีการให้อากาศ จะมีรูปร่างเป็น club-shaped และ branched หรือเป็นท่อนยาวที่ไม่เคลื่อนที่มี metacromatic granules ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างสปอร์ให้ผล catalase-positive เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จนถึง Aero-tolerent สามารถหมัก กรดแลคติก กรดไพรูวิก คาร์โบไฮเดรต และโพลีแอลกอฮอล์ ได้เป็นกรดโพรพิโอนิค และกรดอะซิติก คุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในสภาพที่ไม่มีอากาศ หรือ Microaerophilic fermentation ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการพ่นอากาศลงไปในถังหมัก

การเลือกใช้ Propionic acid bacteria ในกระบวนการหมักมีประโยชน์มากเพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นกรด เนื่องจากมี propionic acid เกิดขึ้น ทำให้สามารถป้องกันการ contamination ซึ่งมักจะเกิดกับการหมักธรรมดาได้ เป็นเพราะว่าระหว่างการหมักในสภาพที่ไม่มีอากาศ Calcium propionate ทำหน้าที่เป็น Bacteriostatic หรือ Fungistic แต่ไม่เป็นพิษกับ Propionibacterium spp. (52)

Wood et al.(75) ได้แสดงการ Dissimilation ของน้ำตาลกลูโคสโดย Propionic acid bacteria ตามแผนภาพดังนี้ (รูปที่ 2.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดง Dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย Propionic acid bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hargrove และ Leviton (30) ได้ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Propionic acid bacteria ที่สำคัญคือ Prop. freudenreichii และ Prop. shermanii เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysate of casein	10	กรัม
L-Tryptophan	0.2	กรัม
L-Cystine	0.4	กรัม
Asparagin	0.2	กรัม
Xathine	0.02	กรัม
Adenine, guanine, urasil	0.02	กรัม
Riboflavin, thiamine	1.0	มิลลิกรัม
Niacin	2.0	มิลลิกรัม
Biotin	8.0	ไมโครกรัม
Pyridoxine, pyridoxal	4.0	มิลลิกรัม
Pyridoxamine	0.08	มิลลิกรัม
D-Calcium pantothenate	1.0	มิลลิกรัม
Para-aminobenzoic acid	2.0	มิลลิกรัม
Tween 80 solution	2.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
KH_2PO_4, K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0.4	กรัม
NaCl, $FeSO_4$, $MnSO_4$	0.02	กรัม
N/5 phosphate	50	มิลลิลิตร
Buffer pH	6.8	

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 โดยใช้ NaOH ปรากฏว่าให้วิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และจาก Prop. shermanii 3 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณต่ำจากมาตรฐานที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าต่อไปเพื่อให้ได้วิตามินบี 12 มากขึ้น โดยการปรับความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่น ๆ ดังนี้

1. เติม $CoCl_2.6H_2O$ 15 มิลลิกรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 12 วัน ได้วิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii และ Prop. shermanii เป็น 100 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2. ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน 10 กรัม แทน Dextrose 20 กรัม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน ได้วิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii และ Prop. shermanii เป็น 100 และ 68 ไมโครกรัมต่อลิตร

3. ศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติกโดยใช้ Basal medium ที่ประกอบด้วย skim milk 1 ส่วน, whey solids 1 ส่วน, น้ำ 2 ส่วน และ $CoCl_2$ ที่ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.1

4. ศึกษาอิทธิพลแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ การให้ Rich medium ทำให้ได้สภาพที่เหมาะสม (Optimum condition) เป็นผลให้การหมักเกิดได้รวดเร็ว Basal medium ที่ใช้ N-Z amine type A (Enzymatic digest of casein : Sheffield Farms, Inc.) 1 เปอร์เซ็นต์, yeast extract (Difco) 0.3 เปอร์เซ็นต์, $CoCl_2.6H_2O$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้ได้ใช้กรดแลคติกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0.5 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 10 วัน พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 คือ 1.5 - 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้วิตามินบี 12 สูงถึง 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.2

5. ศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Basal medium ซึ่งประกอบด้วย N-Z amine 1 เปอร์เซ็นต์ และ $CoCl_2.6H_2O$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร Incculate ของ Prop. freudenreichii บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 8 วัน ปรับ pH ทุกวัน ดังสภาพในตารางที่ 2.3 ปรากฏว่าสภาพ micro-aerophilic ได้วิตามินบี 12 มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. อิทธิพลของ Nitrogenous compound ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ yeast extract และ beef extract เป็นแหล่งของวิตามินและปัจจัยอื่น ๆ ที่จุลินทรีย์ต้องการ อาหารที่ใช้เตรียม ดังตารางที่ 2.4 เติม $CoCl_2.6H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เชื้อเริ่มต้นของเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 3 วัน 5 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เท่ากับ 7 บ่ม 5 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.4 พบว่ายิ่งความเข้มข้นของ Proteinaceous material จะทำให้ผลผลิตสูงขึ้น

ตารางที่ 2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เชื้อเริ่มต้น	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	Prop. shermanii	100
2	Prop. shermanii + L. bulgaricus	153
3	Prop. shermanii + S. thermophilus	223
4	Hasen lactic starter	146
5	Prop. freudenreichii	84
6	Prop. freudenreichii + L. bulgaricus	352
7	Prop. freudenreichii + S. thermophilus	175
8	Prop.shermanii + Hasen lactic starter	350

ที่มา : (57 หน้า 105)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	ปริมาณแลคติก (%)	เชื้อเริ่มต้น	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	0.5	Prop. freudenreichii	84
2	1.0	Prop. freudenreichii	84
3	1.5	Prop. freudenreichii	84
4	2.0	Prop. freudenreichii	84
5	0.5	Prop. shermanii	100
6	1.0	Prop. shermanii	100
7	1.5	Prop. shermanii	100
8	2.0	Prop. shermanii	100

ที่มา : (57 หน้า 106)

ตารางที่ 2.3 แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	สภาวะ	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	anaerobic	560
2	micro-aerophilic	800
3	aerobic	23

ที่มา : (57 หน้า 106)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แสดงอิทธิพลของ Nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เปอร์เซ็นต์				วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
	Yeast extract	Beef extract	Sodium lactate	N-Z amide	
1	0.4	-	1.0	-	300
2	0.4	-	1.0	0.5	330
3	0.4	-	1.0	1.0	430
4	0.4	-	1.0	2.0	590
5	0.4	-	1.0	3.0	600
6	-	0.3	1.0	1.0	390
7	-	0.6	1.0	1.0	440
8	-	1.0	1.0	1.0	460
9	-	-	1.0	1.0	80
10	0.5	-	1.0	1.0	440
11	1.0	-	1.0	1.0	450
12	1.5	-	1.0	1.0	460

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่เติมสารนั้น

ที่มา : (57 หน้า 107)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sudasky และ Fischer (70) ได้ทำการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. freudenreichii โดยใช้ Molasses เป็นแหล่งคาร์บอน และ Waste brewer's yeast เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ครั้ง

1. ใช้ liquid waste brewer's yeast ใหม่ ๆ ในปริมาณ 6,000 แกลลอน ซึ่งมีส่วนที่เป็นของแข็ง 12.2 เปอร์เซ็นต์ แยกเอาออกโดยใช้ที่กรองขนาด 100 mesh ได้ยีสต์ 5,975 แกลลอน ให้ความร้อน 44 องศาเซลเซียส และเก็บโดยการกวนอย่างช้า ๆ 10 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด autolysis จึงนำไปกรองผ่าน yeast separators จะได้ yeast autolysate ประมาณ 4,000 แกลลอน ที่ประกอบด้วยของแข็ง 6 เปอร์เซ็นต์ นำไปผสมกับ beet molasses 8,000 แกลลอนและปรับปริมาตรเป็น 10,200 แกลลอน ปรับ pH ให้เป็น 7 โดยเติม aqua ammonia แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 600 แกลลอนลงไปและหมักต่อไป 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้าๆ ปรับ pH ระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7.0 ได้วิตามินบี 12 เป็น 17 มิลลิกรัมต่อแกลลอน

2. ใช้ soluble autolyed brewer's yeast extract ที่แห้ง เช่น Yeastamin (Vico Product Company) และ beet molasses 120 กรัม ละลายกับน้ำกลั่น ให้เป็น 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 5.0 โดยใช้ H_2SO_4 และเติม invertase 5 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ sucrose ใน beet molasses แตกตัวปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดย aqua ammonia ใช้ USP precipitated chalk 40 กรัมเติมลงไปเพื่อเป็น buffer เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร ทดลองใน fermentor ขนาด 4 ลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 100 แกลลอน หมักต่อไป 96 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้า ๆ ได้วิตามินบี 12 เป็น 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hoffman et al.(35)ได้ทดลองใช้ Prop. shermanii(select PS-B_1) เลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย molasses ที่มี dextrose 4 เปอร์เซ็นต์ , corn steep liqour 8 เปอร์เซ็นต์ เติม dimethybenzimidazole 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดลองในถังหมัก ปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วย NH_4OH แล้วถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ หมัก 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้วิตามินบี 12 เป็น 25.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 143 กรัม หรือ 176.22 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง

นอกจากนี้ยังมีการเติมสารอื่นๆ เช่น ortho-phenylenediamine 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แทน dimethylbenzimidazole ได้วิตามินบี 12 เป็น 226 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง และ 1,2-dimethyl-4,5-diamino benzene hydrochloride 48 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้วิตามินบี 12 เป็น 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Becher et al.(12)ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Prop. shermanii strain 33 หรือ ATCC 13673 ใช้อาหารที่ประกอบด้วย

glucose	10.0	กรัม
nitrogen in the form of a casein proteolyzate	1.5	กรัม
nitrogen in the form of a casein acid hydrolyzate	1.0	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม
K_3PO_4	1.6	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
$CoSO_4.7H_2O$	12.0	มิลลิกรัม
pantothenic acid	4.0	มิลลิกรัม
biotin	0.3	มิลลิกรัม
yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ อายุ 3-5 วัน ทดลองที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ปรับ pH แต่ละวันเป็น 6.6 เมื่อปริมาณน้ำตาลลดลงต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำตาลกลูโคสที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วแต่ละวันเพื่อให้ความเข้มข้นเป็น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก รักษาระดับนี้ไว้ 10 วัน ในวันที่ 5 ของการทดลอง เติม 5,6-dimethyl benzimidazole ในสารละลายอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ในปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงไปได้ 12 วัน ได้ปริมาณวิตามินบี 12 เป็น 18.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

Rudy et al.(65) ได้ทดลองใช้ เส้นใยของ Aspergillus niger ที่ได้จากการผลิต citric acid โดยเติมเส้นใย กับ molasses ลงไปในถังหมักเพื่อเลี้ยงเชื้อ Prop. shermanii พบว่า ได้วิตามินบี 12 เป็น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากหมักไป 96 ชั่วโมง ต่อมาเมื่อมีการเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และเกลือโคบอลท์ พบว่าได้วิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นเป็น 2.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Lim (40) ได้ทดลองเพื่อศึกษาว่า กรดอะมิโนตัวใดที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii (ATCC 6207) โดยใช้กรดอะมิโนชนิดต่างๆเช่น alanine, leucine, isoleucine, tyrosine, methionine ,glutamic acid และกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ปรากฏว่า glycine ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 ดังนั้นจึงทดลองเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในอาหารที่ประกอบด้วย

yeast extract	20	ส่วน
glucose monohydrate	25	ส่วน
$CoCl_2.6H_2O$	0.008	ส่วน
tap water	1,000	ส่วน

เติม glycine ปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.05, 0.10, 0.20, และ 0.30 ส่วน ได้วิตามินบี 12 เป็น 13.1, 15.6, 16.8, 23 และ 22 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Renz และ Weyhenmeyer (63) ศึกษาการสังเคราะห์ dimethylbenzimidazole (5,6-DMBIA) จากวิตามินบี 2 (Riboflavin) โดยเชื้อ Prop. shermanii strain 33 อายุ 3 วัน ซึ่งมีน้ำหนักเปียก 0.35 กรัม ละลายใน phosphate buffer 0.07 M. pH 7 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม 1-14-C-riboflavin ลงไปประมาณ 5 มิลลิกรัม นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อวินาที 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองปรากฏว่า C-2 ของ 5,6-DMBIA มาจาก 1-14-C-riboflavin และได้วิตามินบี 12 บริสุทธิ์ 5.95 มิลลิกรัมต่อ 0.35 กรัมของเชื้อ

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium spp.

1. อาหาร

แหล่งคาร์บอน มีหลายประเภทคือ ประเภทที่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรทเช่น dextrose, maltose, xylose, invert sugar, corn syrup, lactose, sucrose, beet หรือ cane molasses, starch และ lactic acid, gluconic acid, citric acid และ glycerol โดยต้องใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ (10)

จากการศึกษาของ Osman (54) กล่าวว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเหมาะสมสำหรับการเจริญ และ การผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii ส่วน Hargrove และ Leviton (30)ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งอาจได้จากการเติมลงไปในอาหาร หรือได้จากขบวนการ fermentation ของน้ำตาลแลคโตสในนมโดยเชื้อ Lactobacillus casei ที่อยู่ร่วมกับ Propionibacterium spp. แบบ symbiosis Speedie และ Hall (69) ศึกษาขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.โดยใช้วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแบบ batch process พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลแลคโตส ซึ่งนิยมใช้ความเข้มข้น 8-10 เปอร์เซ็นต์

แหล่งไนโตรเจน มักเป็นพวกกรดอะมิโน หรือโปรตีนจากถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวโพด เนื้อสัตว์ หรือ yeast extract, tryptic digest of casein, pancreatic digest of casein, meat extract, blood meal protein, bone scrap, fish meals, fish solubles, peptone, peanut meal, cotton seed meal, corn steep liquor และ lactalbumin

Osman (54) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่างๆ จากเกลือแอมโมเนีย พบว่า แอมโมเนียมซิเตรท แอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีเหมาะสมต่อการเจริญ และ การผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii

Kucheras (36) ศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน จะได้รับวิตามินบี 12 น้อยกว่าที่ใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนบางอย่าง เช่น glycine, methionine, serine, glutamate, arginine และ α-alanine ช่วยเร่งการผลิตวิตามินบี 12 แต่ cysteine จะยับยั้งขบวนการนี้ Bukin (16) ใช้ methionine ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 นอกจากนี้ยังพบว่า methionine ทำหน้าที่เป็น methylation

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และ การผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ โคบอลท์ ไซยาไนต์ และ เหล็ก

โคบอลท์ (Co) ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้ามีโคบอลท์ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม คือ สูงเกินไป จะเป็นพิษกับจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะใช้โคบอลท์ในอาหารได้ในช่วงไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และมีผลไปถึงการสร้างวิตามินบี 12 อาจใช้โคบอลท์ในรูป

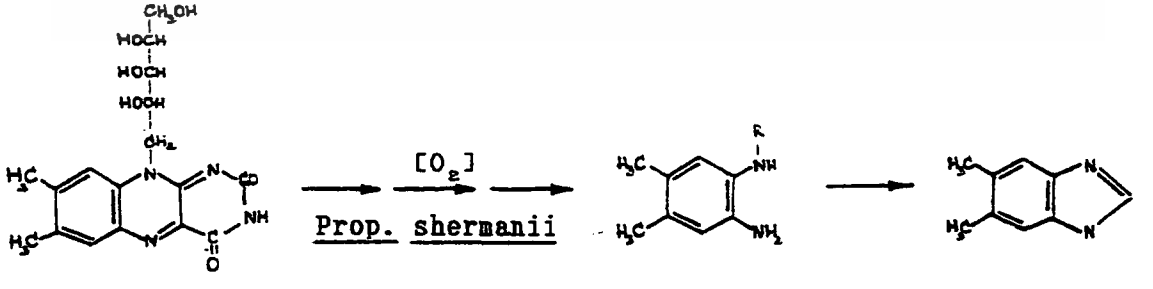
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเกลือที่ละลายน้ำได้เช่น cobalt chloride, cobalt sulfate, cobalt nitrate หรือ เกลือโคบอลท์อื่น ๆ (58)

ไซยาไนด์ (CN) ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารจะต้องเติมลงในปริมาณที่พอเหมาะไม่เกิน 0.1-100 มิลลิกรัมต่อลิตรถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ไซยาไนด์จะเติมในรูปของ ammonium cyanide, metal, alkali metal & alkali earth, metal cyanide, ferrocyanides, ferricyanidases หรือ ในรูป sodium, potassium, barium, calcium, strontium และรูปอื่นๆ หรือในรูปของเหลวและแก๊ส เช่น hydrocyanic acid, hydrogen cyanide (58)

เหล็ก (Fe) มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ส่วนแมกนีเซียมมีความสำคัญต่อการเจริญ แต่ทองแดง (Cu) และบิสมัท (Bi) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ส่วนธาตุอื่นๆ นอกจากที่กล่าวมาแล้วไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ขณะที่ผงชักฟอกจะยับยั้งการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งขบวนการ metabolic ของจุลินทรีย์จะยับยั้งการเจริญ และการสร้างวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii (60)

วิตามินที่สำคัญที่ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 คือ วิตามินบี 2 จากการค้นคว้าของ Renz (63) พบว่าสามารถใช้วิตามินบี 2 แทน 5,6-dimethyl benzimidazole ซึ่งเป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12 โดย Prop. shermanii สามารถเปลี่ยนวิตามินบี 2 เป็น 5,6-dimethylbenzimidazole ได้ซึ่งมี pathway ดังนี้



riboflavin 5,6-dimethylbenzimidazole

รูปที่ 2.2 แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญต่อการผลิตวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ต่อมา Renz (63)และ Weyhenmeyer (73) สามารถสังเคราะห์ 5,6-dimethylbenzimidazole ได้จากวิตามินบี 2 โดยเชื้อ Prop. shermanii strain 33

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12

สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Propionic acid bacteria อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7 (61) จะต้องรักษาระดับ pH ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4-9 (ที่เหมาะสม 6-7) เพราะ pH สูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจาก cobalamin ไม่คงตัวหรือถูกทำลายได้ง่าย (62)

อุณหภูมิ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในการหมักประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่แบคทีเรียพวกนี้เจริญได้ดี (61) จึงเหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12 ด้วย Zodrow (76) ทดลองใช้อุณหภูมิต่างๆในการหมักโดยใช้เชื้อ Prop. shermanii พบว่าได้วิตามินบี 12 มากที่สุด ที่อุณหภูมิระหว่าง 18-21 องศาเซลเซียส

การให้อากาศศึกษาโดย Grant(25)ทดลองกับ Prop. freudenreichii ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมในการสร้างวิตามินบี 12 เมื่อถึงช่วงปลายของการหมักอาหารจะขาดคาร์โบไฮเดรทที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดเจริญได้ จะต้องมีการ oxygenation หรือ aeration เพื่อให้เกิดฟองอากาศในอาหาร วิธีนี้นิยมใช้ mechanical agitation และปรับ pH ของอาหารให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มปริมาณของวิตามินบี 12 ได้ด้วย

การหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (75) ทำได้โดยการผ่าน non-oxidizing gas เช่น ไนโตรเจน หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ลงในอาหาร หรือ รักษาระดับแก๊สเหนืออาหารให้สภาวะนี้ไม่ต้องกวน เพราะจะเป็นการนำออกซิเจนลงไปในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25404

ต่อมาใช้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้น ช่วยรักษาสภาพที่ไม่มีอากาศของอาหารในการหมักแบบธรรมดา ระยะเวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารสัมผัสกับอากาศ 70-80 ชั่วโมง ในระหว่างการหมักจะเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 มาก แม้ว่าจะให้ออกซิเจนเพียง 24-50 ชั่วโมง เท่านั้นก็ช่วยเพิ่มผลผลิต สภาวะที่ไม่มีอากาศนิยมทำในช่วงมากกว่าครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ในการหมักเล็กน้อย เมื่ออาหารสัมผัสกับออกซิเจนเป็นการทำให้อยู่ในสภาพ micro aerophilic มากกว่าสภาวะที่มีอากาศ เพราะถ้าให้ออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ผลผลิตของ cobalamin น้อยลง

การหมักแบบครั้งคราว(Batch process)(69)ขบวนการผลิต cobalamin โดยเริ่มด้วยหมักอาหารเหลวด้วยเชื้อ Propionibacterium เป็นแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบี 12 ในสภาพที่ไม่มีอากาศจากนั้นให้อาหารสัมผัสกับออกซิเจนและเก็บเกี่ยววิตามินบี 12 ได้จากอาหารที่ใช้ในการหมักแบบครั้งคราว อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของการหมัก เช่น องค์ประกอบของอาหาร , อายุและขนาดของเชื้อเริ่มต้น , อุณหภูมิ , pH และ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

การหมักแบบต่อเนื่อง(Continuous process) (69) การหมักแบ่งเป็น 2 ตอน ระยะแรกหมักในสภาพไม่มีอากาศ เรียกว่า ตอนที่ 1 ระหว่างนี้จะมีการเติมสารอาหารลงไปจะหมักต่อไปถึง ตอนที่ 2 ระยะนี้อาหารสัมผัสกับอากาศและเติมอาหารลงไปอีก อัตราในการเติมอาหารลงไปในตอนที่ 1 และ ตอนที่ 2 จะต้องมีปริมาตรและความเข้มข้นเท่ากันซึ่งการผลิตวิตามินบี 12 จะเกิดขึ้นในการหมักตอนที่ 2

Baron(11) พบว่า เมื่อเติม thickening agent ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารนั้นโดยไม่ต้องมีการกวนและมีประโยชน์มากในแง่การเจริญ และ activity ของเซลล์ ในสภาพนี้ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และได้ cobalamin เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ thickening agent ที่เติมลงไป ทำให้แบคทีเรียมีความทนทาน หรือ สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าสภาพธรรมดา เช่น การหมักในสภาพที่มี thickening

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

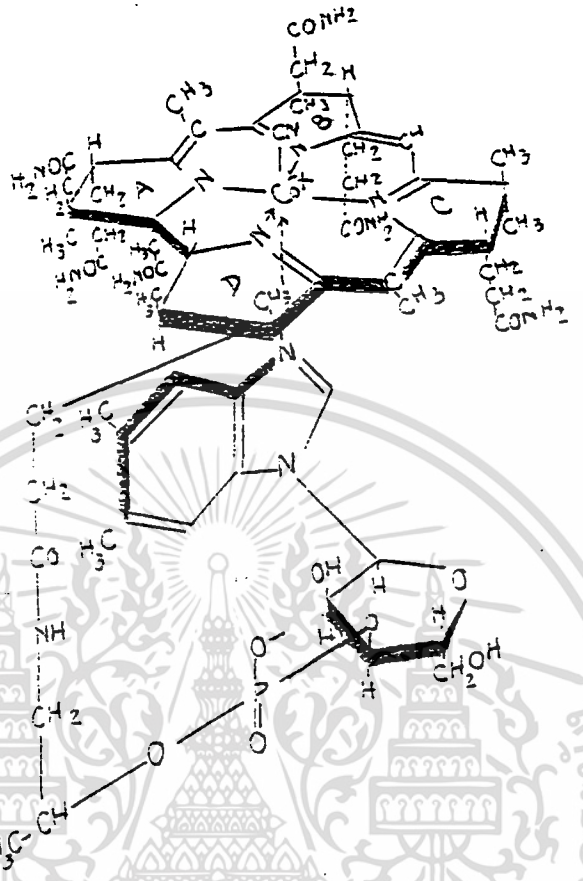
agent จุลินทรีย์ทนต่อโคบอลท์ และไซยาไนต์ออกได้ดีกว่าในสภาพปกติ จึงช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 และสามารถใช้ thickening agent เพื่อให้ได้สภาพ micro aerophilic และการเพิ่มความหนืดทำให้อาหารกลายเป็น semi-solid ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ตกไปอยู่ที่ก้นภาชนะ thickening agent ที่ใช้ได้แก่วุ้นมีความเข้มข้นในช่วง 0.1-2.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมี methyl cellulose, carboxymethyl cellulose, pectin, carragenin, sodium alginate, gum tragacanth, polyvinyl pyyrolidone

การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1926 Minot และ Murphy (46) รายงานว่าตับมีสารที่สามารถรักษาโรค perniciousanemia ได้ และสารนี้ถูกสกัดครั้งแรกออกจากตับในปี 1948 โดย Rickes et al.(64) และ Smith (67) พบว่า สารนี้มีชื่อว่าวิตามินบี 12 ละลายน้ำได้ โมเลกุลใหญ่ น้ำหนัก 1350 เป็นผลึกรูปเข็มหรือปริซึมสีแดงเข้ม สูตรเคมีคือ $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ (80) มีโครงสร้างสลับซับซ้อนยากแก่การศึกษา แต่ Hodgkin et al.(33) ก็ได้พยายามศึกษาต่อมาและในที่สุดก็เสนอสูตรโครงสร้างวิตามินบี 12 ได้สำเร็จโดยใช้ วิธี X-ray diffraction technique ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าถูกต้อง

โมเลกุลของวิตามินบี 12 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ planar group และ nucleotide group ส่วนที่เป็น planar group เป็นส่วนกลางของโครงสร้างที่ เรียกว่า corrin ring ฉะนั้นสารประกอบวิตามินบี 12 เรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า corrinoid ส่วนที่เป็น nucleotide group (benzimidazole ring) ซึ่งส่วนนี้จะตั้งอยู่ในแนวเกือบตั้งฉากกับ planar group โดยมีโคบอลท์เป็นแกนกลาง เชื่อมกับ tetrapyrrole (corrin ring)(14,57,62,73) การเรียกชื่อสารนี้ขึ้นกับสูตรโครงสร้าง คำว่า cobalamin หมายถึงโมเลกุลของวิตามินบี 12 แต่ถ้าแกนของ planar group เป็นสารอื่นก็มีวิธีการเรียกชื่อแตกต่างกันออกไป แสดงไว้ในรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Trivial names and abbreviations are given in parentheses.

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

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

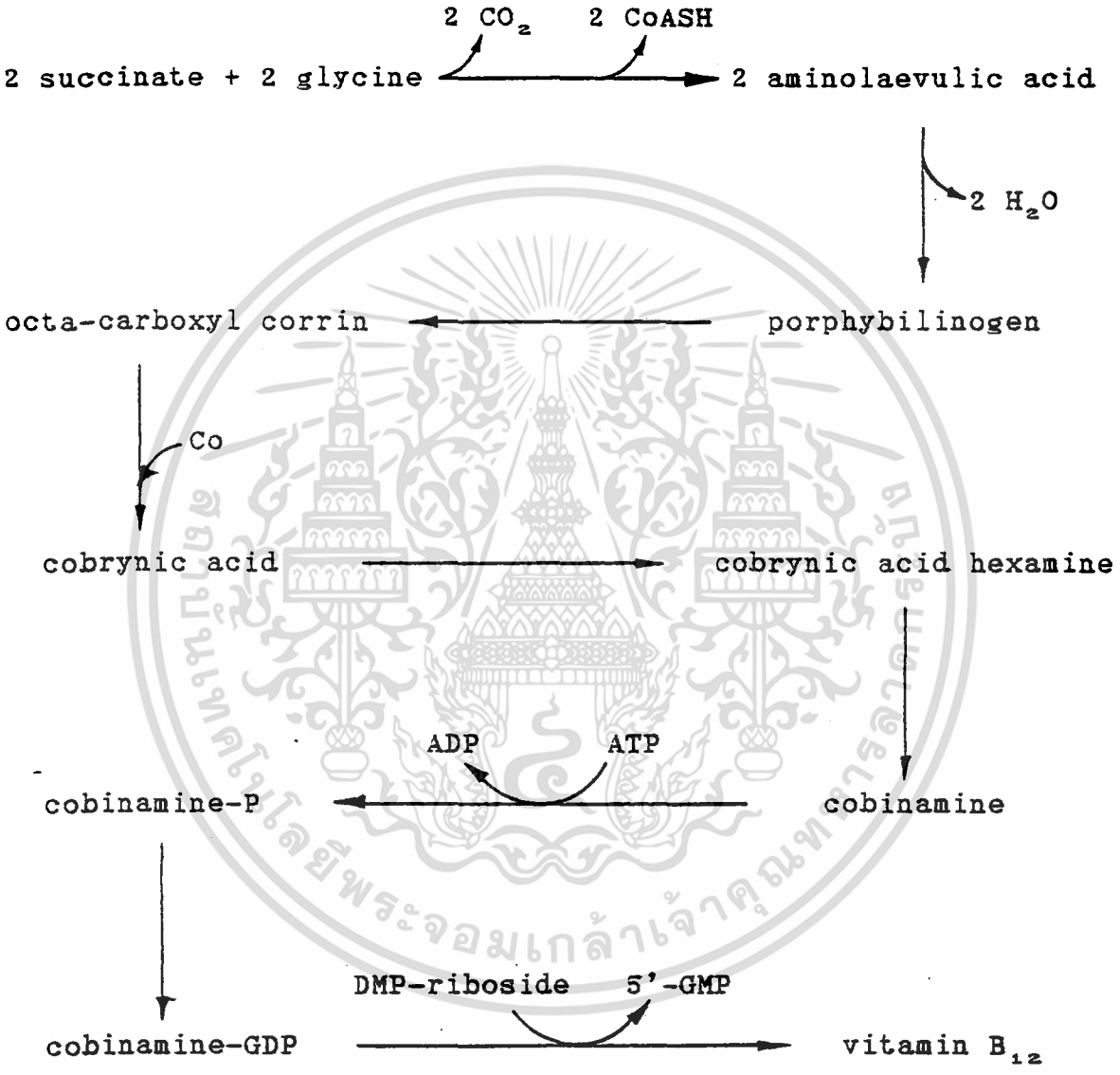
L = CH_3 : 5-(5,6-dimethylbenzimidazolyl-Co-methylcobamide or methylcobalamin (CH_3B_{12}) ; methyl-B_{12})

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

รูปที่ 2.3 แสดง Structure of vitamin B_{12} และ related compounds

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12 เสนอโดย Boretti et al.(13)



ADP = adenosine diphosphate ATP = adenosine triphosphate

GMP = guanosine monophosphate GTP = guanosine diphosphate

DMP-riboside = dimethylbenzimidazole-riboside

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

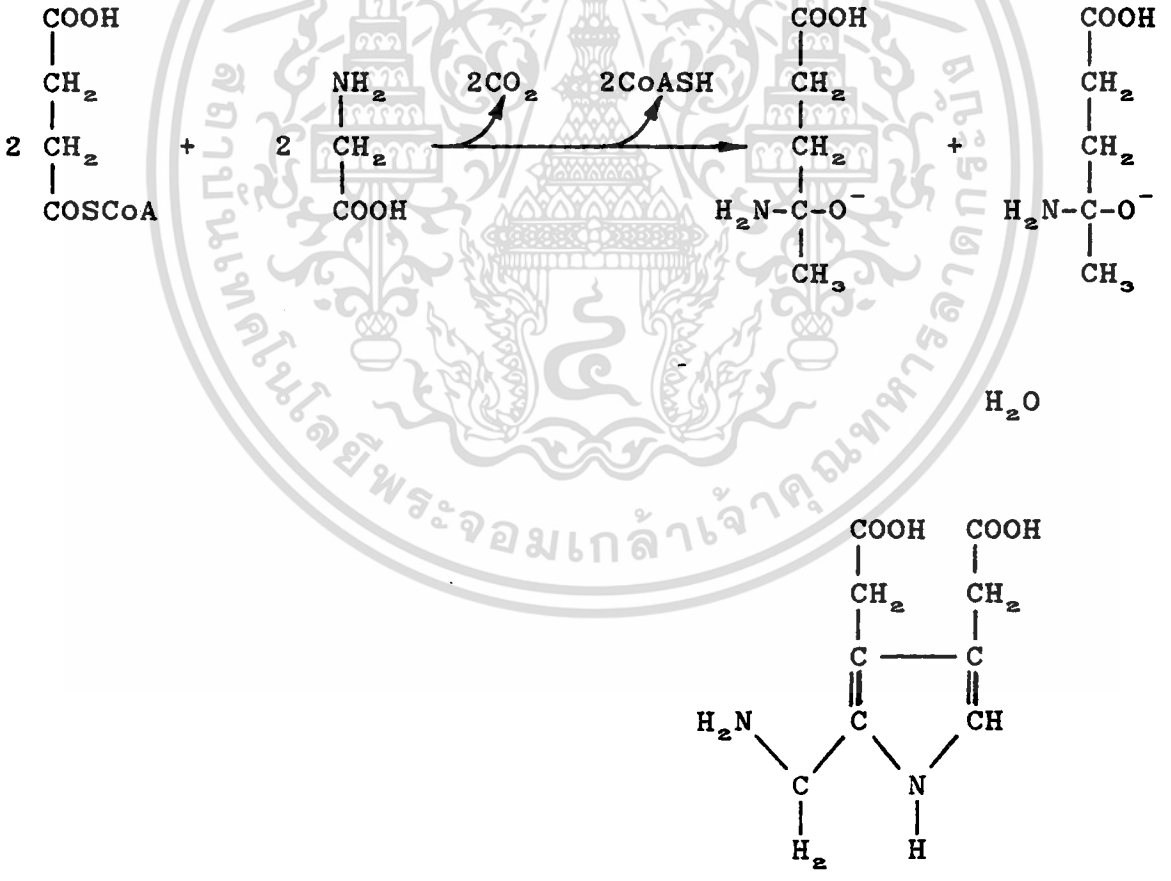
รูปที่ 2.4 แสดงสมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12

จากสมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12 รูปที่ 2.4 สามารถแบ่งเป็น 4 ขั้น (62,74) ดังนี้

1. Formation of the corrin ring

Neuberger et al. (49) แสดงให้เห็นว่า pyrrole ring เกิดจาก prophobilinogen และ prophobilinogen เปลี่ยนมาจาก succinate และ glycine ดังนี้

succinyl CoA glycine aminolaevulic acid

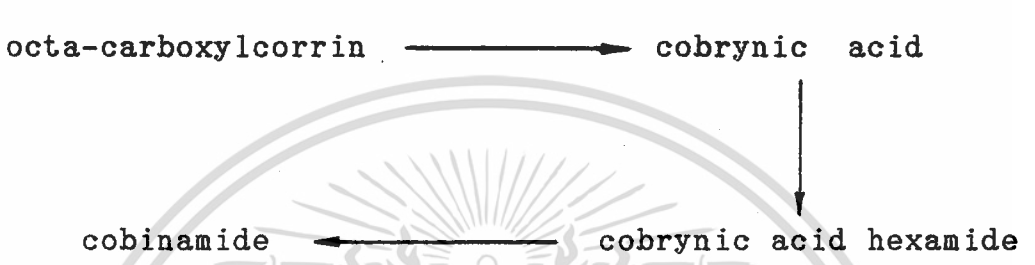


porphobilinogen

รูปที่ 2.5 แสดงการสังเคราะห์ corrin ring

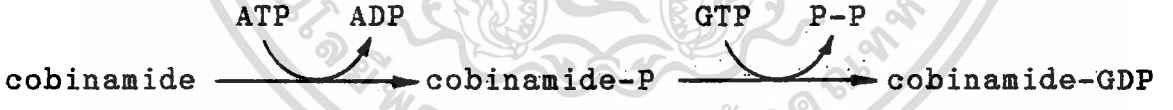
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

macroring อันดับแรกที่เกิดขึ้น คือ octacarboxylcorrin และ จะเปลี่ยนต่อไปโดยการ methylation decarboxylation และ co-ordination ด้วยโคบอลท์ไปเป็น cobrynic acid และเปลี่ยนเป็น cobrynic acid hexamide และเปลี่ยนเป็น cobinamide ในที่สุด



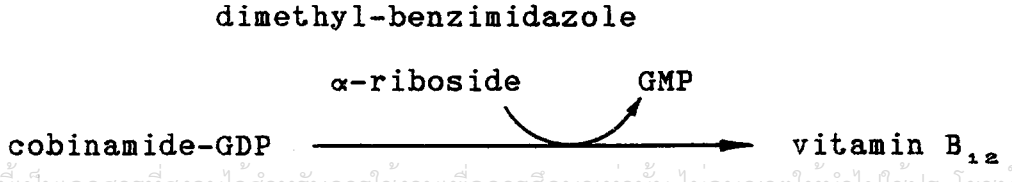
2. Incorporation of nucleotide residue

Boretti et al. (13) กล่าวว่า cobinamide จะถูกกระตุ้นให้อยู่ในรูป cobinamide-GTP ซึ่งเป็น intermediate ที่สำคัญใน biosynthesis ของวิตามินบี 12 ดังนี้



3. Formation of 5,6-dimethylbenzimidazole-riboside (DMRriboside)

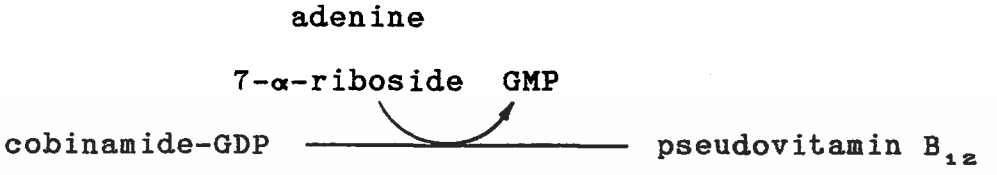
กลไกในการ form D-riboside linkage ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Formation of purine residue

เป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของการสร้างวิตามินบี 12 หรือ vitamin B_{12} analogues



แม้ว่ายังไม่มีหลักฐานที่แน่นอน แต่เชื่อว่าปัจจัยที่สำคัญ 2 ชนิดคือ 5'GMP และ 3'GMP จะต้องเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ของวิตามินบี 12 ในขั้นนี้

จุลินทรีย์สร้างวิตามินบี 12 ขึ้นภายในเซลล์และไม่ปล่อยออกมานอกเซลล์ Perlman(71) รายงานว่าวิตามินบี 12 ที่พบในจุลินทรีย์อยู่ในรูปของ coenzyme ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่บริสุทธิ์ที่สุดที่เตรียมได้จากจุลินทรีย์ที่มี cobanamide peptide อยู่ 23 เปอร์เซ็นต์ การสังเคราะห์ coenzyme B_{12} เกิดขึ้นเมื่อมีการเติม adenine nucleoside ให้กับวิตามินบี 12 แล้วจึงจะได้ coenzyme B_{12} ได้มีผู้สกัด coenzyme B_{12} จาก Prop. shermanii และ จาก Clostridium tetanomorphum ได้ cofactor ที่ใช้ในการสร้างคือ glutathione, $NADH_2$, flavin, $MnCl_2$ และ ATP ใช้วิธี lebel C^{14} ของ ATP แสดงให้เห็นว่า ATP ให้ทั้ง adenine และ sugar residue ในการสร้าง coenzyme B_{12} นั่นคือ adenosine ถูก incorporate เข้าไปโดยไม่มีการบุบสลาย และในสภาพปกติ adenine nucleoside จะไปติดกับ ring ของวิตามิน บี 12 ก่อนที่จะสร้างเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์(62)

ในปัจจุบันจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตวิตามินบี 12 และสารที่มี activity คล้ายกับวิตามินบี 12 ได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) ยีสต์ รา และ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรีย ได้แก่

Aerobacter aerogenes (61) Agobacterium radiobacter (34)

Alcaligenes faecalis (35) Azotobacter sp. (57)

Bacillus megaterium (20,23,39,57,61)

B. subtilis (64) B. stearothermophillus (10)

Butyribacterium rettgeri (57) Clostridium butyricum (75)

Cl. cochlearium (75) Cl. flabelliferum (75)

Cl. tetanomorphum (75) Escherichia coli (29)

Flavobacterium acetylicum (20) F. acidificum (20)

F. aquatile (20) F. arborescens (20)

F. devorans (28) F. esteroaromaticum (20)

F. flavescens (20) F. solare (60)

F. suaveolens (20) Lactobacillus arabinosus (65)

L. casei (68) Prop. freudenreichii (38)

Prop. shermanii (30) Prop. zeae (20)

Proteus vulgaris (32) Pseudomonas aeroginosa (64)

Ps. fluorescens (64) Ps. midenbergii (64)

Ps. mucidolens (64) Ps. lumichroma (64)

Ps. chloraraphis (64) Ps. denitrificans (64)

Rhizobium trifolii (37) Rh. meliloti (37)

Serratia marcescens (71) Staphylococcus aureus (66)

Streptococcus faecalis (68)

แอคทิโนมัยซีส ได้แก่

Micromonospora รวมทั้ง 69 species ที่ไม่สามารถ classified และ identified species (75)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Micromonospora purpuria (74) M. echinospora (74)

M. halophytica (74) M. fusca (74)

M. chalcea (74) M. carbonacea (74)

Mycobacterium phlei (20) My. smegmatis (63)

My. tubercurosum (59) Norcardia rugosa (42)

Streptomyces albidoflavus (20) St. antibioticus (20)

St. aureofaciens (56) St. aureus (20)

St. colombiensis (20) St. farinosus (20)

St. fradiae (20) St. griseus (35)

St. olivaceus (26,27,28) St. roseochromogenes (20)

St. vinaceus (20) Streptomyces sp. (20)

ยีสต์ ได้แก่

Torula sp. (76)

รา ได้แก่

Penicillium lilacinum (71)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Blue green algae) ได้แก่

Anabaena cylindrica (20) Claothrix parietina (20)

Plectonema nostocorum (20)

สาหร่ายทะเล (Marine algae) ได้แก่

Ceranium rubrum (20) Champia parvula (20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 แสดงขบวนการและอาหารที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ในอุตสาหกรรม

จุลินทรีย์	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณวิตามินบี 12 (mg/liter)	สภาวะ
Bacillus megaterium	Beet or cane molasses; ammonium phosphate; cobalt salt;inorganic salts	0.45	18 hours aerated fermentation
Propionibacterium freudenreichii	Cornsteep liquor; glucose;cobalt salt; maintained at pH 7.0 with NH_4OH	19	6-days batch fermentation (3 days anaerobic + 3 days aerobic)
Propionibacterium shermanii	Cornsteep liquor; glucose;cobalt salt; maintained at pH 7.0	23	7-days batch fermentation (3 days anaerobic + 4 days aerobic)
Streptomyces griseus	Glucose;soybean meal; cobalt salt	0.3	6-days batch (aerated)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณวิตามินบี 12 (mg/liter)	สภาวะ
Streptomyces olivaceus	Glucose;soybean meal; distiller solubles; cobalt salt;inorganic salts	3.5	6-days batch (aerated)
Streptomyces species	Soybean meal;glucose; cobalt salt;K_2HPO_4	5.7	6-days batch (aerated)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ (Microbiological assay)

จุลินทรีย์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 (66) มี 4 ชนิด คือ Lactobacillus , Escherichia coli (mutant type) , Euglena gracilis และ Orchromonas malhamensis

1. Lactobacillus species แรกที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 คือ L. lactis Dorner (LLD) เพราะพบว่าต้องการสารที่แยกได้จากตับ จากการศึกษาต่อมาได้ใช้ L. leichmannii(ATCC 4797) หรือ L. leichmannii (ATCC 7830) แทนเพราะพบข้อผิดพลาดจากการใช้ L. lactis Dorner 8000 ในการตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ความยุ่งยากในการใช้ Lactobacillus ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 พบในกรณีที่มีสารปฏิชีวนะปนอยู่ด้วย และจุลินทรีย์พวกนี้ยังตอบสนองต่อ deoxyriboside และ sensitive ต่อ sodium chloride ใน assay medium นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารที่คล้ายคลึงกับวิตามินบี 12 เช่น Factor A, pseudovitamin B_{12}, factor อื่น ๆ ที่พบใน rumen sewage sludge, intestine และ microbial fermentation การ assay โดยใช้ Lactobacillus มักใช้วิธี tube assay โดยการวัดความขุ่นหลังเชื้อเจริญ 18-40 ชั่วโมง หรือไตเตรตหาปริมาณกรดหลังจากเชื้อเจริญ 24 ชั่วโมง วิธีการ assay ที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป คือ วิธีของ Association of vitamin chemists (8) และ U.S. Pharmacopeia (19)

2. Escherichia coli (mutant)

ในสภาพธรรมดาจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่ต้องการวิตามินบี 12 แต่ E. coli ที่ใช้ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 แยกได้โดย Davis และ Mingioli (21) เป็นพวก ultraviolet induced stable mutant , No.113-3 ต้องการ methionine และวิตามินบี 12 ในการเจริญแต่ไม่ตอบสนองต่อ deoxyriboside อาจใช้วิธี assay โดยวิธี tube assay โดยวัดความขุ่น แต่มีข้อบกพร่องที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถในการใช้ประโยชน์มีขอบเขตจำกัด คือ ใช้ได้ดีกับ complex natural material วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ คือ plate assay หรือ agar diffusion method

3. Euglena gracilis

Euglena gracilis var. bacillarus เป็นพวก green photosynthetic fragellate ที่ต้องการวิตามินบี 12 & thiamine เป็น essential growth factor สามารถใช้วิตามินบี 12 ได้ในรูปที่เป็นอิสระเท่านั้น ส่วนวิตามินบี 12 ที่ติดกับโปรตีนใช้ไม่ได้ มีคุณสมบัติต่างจาก Lactobacillus คือ ถ้าอาหารมี thymidine หรือ deoxyriboside ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะไม่เจริญ เชื้อนี้สามารถใช้ hydroxycobalamin ได้โดยตรง ดังนั้นจึงไม่ต้องใช้ cyanide ช่วย stabilize และยังตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ทุกแบบ การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ใช้วิธี turbidimetric method หรือ ไตเตรทด่าง ใช้เวลา 8 วัน เมื่อมีการปรับปรุงอาหารและสภาวะการเจริญจึงสามารถลดเวลาลงเหลือ 5-6 วัน

4. Orchromonas malhamensis

Orchromonas malhamensis เป็นพวก photosynthetic chrysomonad ที่มีความต้องการวิตามินบี 12 ซึ่งคล้ายคลึงกับสัตว์ชั้นสูง O. malhamensis จะตอบสนองต่อปริมาณวิตามินบี 12 ที่แท้จริง (true vitamin B_{12}) ขณะที่ E. gracilis ตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ทั้งหมด (ทั้ง true vitamin B_{12} และ pseudovitamin B_{12}) ซึ่งการใช้เชื้อ O. malhamensis ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารได้ค่ามากกว่าใช้ L. leichmannii

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

1. Propionibacterium freudenreichii ใช้ศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นจัดเก็บในสภาพ stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน MRS medium แบบ agar stab (ภาคผนวก ก.)

2. Lactobacillus delbrueckii sp.lactis ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นจัดเก็บในสภาพ stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน tomato juice agar แบบ agar stab (ภาคผนวก ก.)

อาหารที่ใช้

น้ำทิ้งจากการผลิตไก่สดส่วนน้ำทิ้งรวมซึ่งได้รับจากบริษัท ไก่สด ซี.พี.จำกัด มีนบุรี กรุงเทพมหานคร

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Suction pump
2. Autoclave
3. Incubator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Hot air oven
5. Centrifuge
6. Spectrophotometer
7. Kjeltec System 1002 Distilling Unit
8. Fermentor
9. Cyclo mixer
10. Assay tube ขนาด 13x100 มิลลิเมตร
11. Quewett
12. Pipette
13. เครื่องแก้วต่าง ๆ

<u>สารเคมี</u>

1. Glucose
2. Yeast extract
3. $CoSO_4.7H_2O$
4. H_2SO_4
5. NaOH
6. KCN
7. Cyanocobalamin
8. Vitamin B_{12} assay medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. <u>การเตรียมอาหารที่ใช้ผลิตวิตามินบี 12</u>

1.1 การเตรียม complete medium

(ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดในภาคผนวก ก.)

1.2 การเตรียมน้ำทิ้งไก่เพื่อการทดลอง

1.2.1 นำน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานมาทำการต้มให้เดือดเพื่อตกตะกอนเลือดที่ปนมากับน้ำทิ้งจากนั้นนำน้ำทิ้งที่ต้มแล้วมาทำการกรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

1.2.2 แบ่งน้ำทิ้งเก็บใส่ขวดสีชา แช่แข็งไว้เพื่อสะดวกแก่การนำไปใช้

1.2.3 เมื่อจะนำมาใช้ให้ละลาย โดยแช่ในอ่างน้ำที่มีน้ำหล่ออยู่

1.2.4 นำมากรองซ้ำอีกครั้งเพื่อแยกเอาตะกอนที่แขวนลอยออก ด้วยเครื่องกรองสูญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

1.2.5 ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย NH_4OH 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ HCl 15 เปอร์เซ็นต์

1.2.6 นำมานึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. <u>การหาอัตราการเจริญ(Growth rate)และปริมาณเซลสูงสุด(Maximum yield)</u>

2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

2.1.1 ถ่ายเชื้อ <u>Prop. freudenreichii</u> จาก agar stab ลงใน complete medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.1.2 บ่มฟลาสก์ในข้อ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน

2.1.3 เมื่อครบวันที่ 4 วัดความขุ่นของเชื้อเป็น Optical density (O.D.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 ทำ suspension ของเชื้อให้เจือจางลงจนได้ O.D.เท่ากับ 0.5 ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ในการทดลองแต่ละครั้ง

2.2 การวัด O.D.ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

2.2.1 เตรียมอาหารที่จะศึกษาบรรจุลงในฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร

2.2.2 inoculate ด้วยเชื้อเริ่มต้น จากข้อ 2.1.4 (ทำ 3 ซ้ำ ทุกการทดลอง)

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2.4 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120 และ 144 ชั่วโมง นำแต่ละฟลาสก์มาวัดค่า O.D.โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันกับที่ศึกษาเป็น blank

2.2.5 จดค่า O.D.ในระยะเวลาที่กำหนด และหาค่าเฉลี่ย

2.3 การเขียนกราฟแสดงการเจริญ

เขียนกราฟระหว่างค่า O.D.เฉลี่ยกับระยะเวลา โดยให้แกนตั้งของกราฟเป็นค่า O.D. และแกนนอนเป็นช่วงเวลา

2.4 การหาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลสูงสุด

หาอัตราการเจริญและปริมาณสูงสุด โดยอ่านผลจากกราฟแสดงการเจริญเติบโต (2.3) โดยที่อัตราการเจริญอ่านค่าได้จากความชัน (slope) ของกราฟ ส่วนปริมาณเซลสูงสุด อ่านค่าได้จาก O.D.ที่มีค่าสูงสุด

3. <u>การเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักแห้ง(cell dry weight)</u>

3.1 Inoculate เชื้อ <u>Prop. freudenreichii</u> (O.D.เท่ากับ 5) ลงใน complete medium บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้ปริมาณเซลสูงสุดประมาณ 4 วัน

3.2 เมื่อครบวันที่ 4 นำมาวัดค่า O.D. โดยแบ่งใส่หลอด centrifuge จำนวน 2 หลอดๆละ 10 มิลลิลิตรนำส่วนที่เหลือมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วน 1:1 ,1:3 และ 1:5 จากนั้นนำไปวัดค่า O.D.แบ่งใส่หลอด centrifuge ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนละ 2 หลอด) จากนั้นนำหลอด centrifuge ทั้ง 4 หลอด ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

3.3 รินน้ำออกให้เหลือแต่ตะกอน เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วย cyclo mixer จากนั้นนำไปปั่นใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้ 3 ครั้งเพื่อล้างเซลจุลินทรีย์

3.4 เมื่อได้ตะกอนเซลครั้งสุดท้าย เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปทำการเขย่า ทำเป็น suspension

3.5 เทใส่ในกระทงอลูมิเนียมที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้วทั้งหมด 8 กระทง

3.6 นำเข้าตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบอีก ทำซ้ำ 3 ครั้ง จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลง

3.7 นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน ระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักแห้ง โดยให้ O.D.เป็นแกนตั้ง และน้ำหนักแห้งเป็นแกนนอน สามารถใช้เปรียบเทียบหาน้ำหนักแห้งของเชื้อนี้ในอาหารอื่น ๆ จากค่า O.D.ที่อ่านได้

4. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12</u>

4.1 หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ที่ stationary flask และ fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ

4.2 หาปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งไก่ เมื่อเติม glucose 1.5 เปอร์เซ็นต์ , yeast extract 5 เปอร์เซ็นต์ และ $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่สภาวะ stationary flask และ fermentation (2) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ

(การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน fermentation liquor ใช้วิธี turbidimetric method of microbiological assay โดยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus delbrueckii sp.lactis เป็น test organism โดยใช้ assay medium ของ Merck. ซึ่งไม่มีวิตามินบี 12 แต่จะมีเฉพาะสารที่สำคัญต่อการเจริญของ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis เท่านั้น)

4.3 การเตรียม sample (extraction)

4.3.1 ปิเปต sample ลงในหลอด centrifuge ฝาเกลียว 10 มิลลิลิตร เติม buffer cyanide solution 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer

4.3.2 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4.3.3 นำไป centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

4.3.4 ปิเปต supernatant เก็บไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้อ cobalamin จะถูกปลดปล่อยออกจากเซล และเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนของ supernatant

4.3.5 เจือจาง supernatant ที่ได้เพื่อให้ความเข้มข้นวิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น Double distillation ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000

4.3.6 นำ sample ที่เจือจางได้นี้ไปหาปริมาณวิตามินบี 12 ต่อไป

4.4 การเตรียม vitamin B_{12} standard solution

4.4.1 การเตรียม working standard vitamin B_{12} ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (72)

(ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดได้จากภาคผนวก ข.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 การเตรียม working standard vitamin B_{12} ความเข้มข้น $5x10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก stock solution vitamin B_{12}

solution A : ปิเปต stock solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จาก ampule ซึ่งภายในบรรจุวิตามินบี 12 เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร นำมาเจือจางเป็น 100 เท่า โดยใช้น้ำกลั่น double distillation

solution B : ปิเปต solution A 0.1 มิลลิลิตร และ KCN 0.05 % 1 มิลลิลิตรเจือจางด้วยน้ำกลั่น double distillation จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็น working standard ที่มีวิตามินบี 12 เข้มข้น $5x10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.3 การเตรียม standard assay tube

4.4.3.1 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 มิลลิลิตร โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.4.3.2 เติมน้ำกลั่น double distillation ให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร

4.4.3.3 เติม double strength assay medium ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตรรวม 3.0 มิลลิลิตร

4.4.3.4 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer

4.4.3.5 นำทั้ง standard assay tube และ sample assay tube ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

(ในการ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องทำ calibration curve of standard vitamin B_{12} ใหม่ทุกครั้งเพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อและอุณหภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก calibration curve)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การเตรียม sample assay tube

4.5.1 ปิเปต supernatant ของ sample ที่เจือจางแล้วในหัวข้อ 4.3.5 ของแต่ละความเข้มข้น มาความเข้มข้นละ 0.2, 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น double distillation และ double strength assay medium เช่นเดียวกับ standard assay tube (ข้อ 4.4.3.2 - 4.4.3.3) โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.5.2 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer

4.5.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที พร้อมกับ standard assay tube ทิ้งไว้ให้เย็น

4.6 การเตรียม suspension ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis

4.6.1 ถ่ายเชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis จาก stock culture ลงใน tomato juice agar ทุกวันใน 1 สัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพ active

4.6.2 ถ่ายเชื้อจาก agar stab ในข้อ 4.6.1 ลงใน micro-ino culum broth (ศึกษาการเตรียมจากภาคผนวก ข.) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.6.3 นำมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางให้ค่า O.D.เท่ากับ 0.5

4.6.4 ปิเปตเชื้อใส่หลอด centrifuge 5.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที แยกตะกอนเซลไว้

4.6.5 ล้างตะกอนเซลเพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 เหลืออยู่ โดยใช้ single strength assay medium (ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) 3-4 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.6 เติม single strength assay medium 10 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลที่ได้ จากนั้นเจือจางให้เป็น 1:1,000 ด้วย double strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

4.6.7 นำ suspension ของเชื้อที่ได้นี้หยดลงใน standard assay tube และ sample assay tube หลอดละ 1 หยด โดยใช้ micropipette ยกเว้นหลอด blank

4.6.8 เขย่าด้วย cyclo mixer นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

4.6.9 วัดค่าความขุ่นของเชื้อ และนำข้อมูลมาเขียนเป็นกราฟ เพื่อคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12 ใน sample ออกมาเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) กับน้ำหนักแห้งของเชื้อ (cell dry weight)

จากการทดลองหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ณ.ชั่วโมงที่ 120 ทำได้โดยนำน้ำหมักมาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 1:1, 1:3 และ 1:5 แล้วหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ระดับความเจือจางดังกล่าว เมื่อนำมาสร้างกราฟระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) กับน้ำหนักแห้ง จะได้กราฟมาตรฐานระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.)กับน้ำหนักแห้งของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งในการทดลองต่อไปจะสามารถใช้กราฟนี้เทียบหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ณ.ชั่วโมงต่าง ๆ ของการหมักได้จากค่าความขุ่นของเชื้อที่อ่านได้

2. ผลการศึกษาอัตราการเจริญ (growth rate) ปริมาณเซลสูงสุด (maximum yield) และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. freudenreichii ใน complete medium และ น้ำทิ้งไก่ที่เติมสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสม ณ.สภาวะ stationary flask และ fermentor ที่มีระบบการกวน

จากการทดลองศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้อาหาร complete medium และ น้ำทิ้งที่เติม น้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 5.0 เปอร์เซ็นต์ และ $CoSO_4.7H_2O$ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าในอาหาร complete medium ที่สภาวะ stationary flask ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.252 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ณ.ชั่วโมงที่ 96 และในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ในปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถผลิตวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.480 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ณ.ชั่วโมงที่ 96 และเมื่อทดลองศึกษาการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ใน fermentor โดยใช้อาหาร complete medium และในน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 5.0 เปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซ็นต์ และ $CoSO_4.7H_2O$ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรากฏว่าในอาหาร complete medium ที่สภาวะ fermentor ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.715 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ณ.ชั่วโมงที่ 96 และในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ในปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถผลิตวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 2.206 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ณ.ชั่วโมงที่ 96

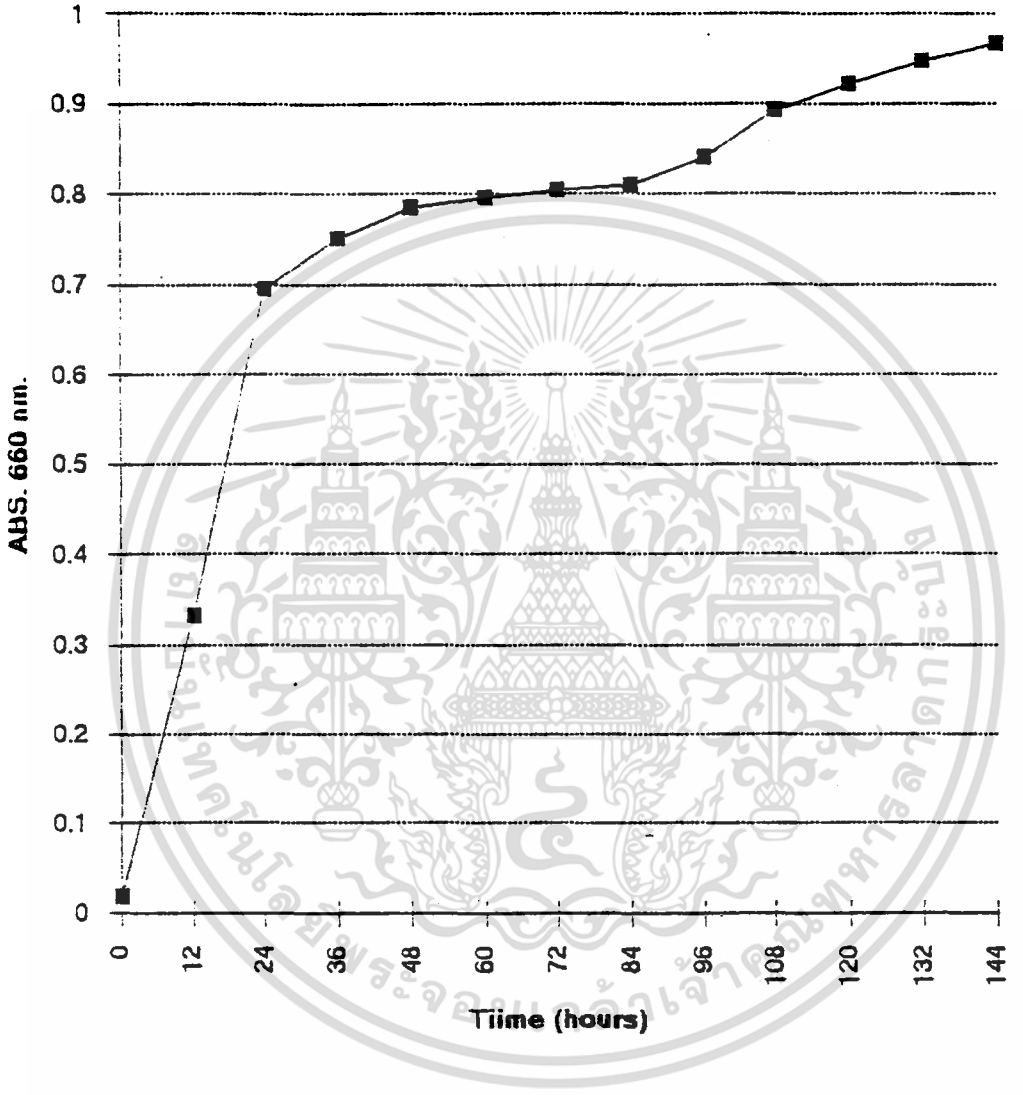
จากการวัดผลอัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์ แสดงในรูปที่ 4.3 และ 4.4 จะเห็นว่าการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 และจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องมาจากสภาวะในการหมักเริ่มไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตวิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเกิดจากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการสะสมของสารบางชนิด เช่น propionic acid, acetic acid หรือของเสียที่ปล่อยออกจากเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งอาจมีผลทำให้การสร้างวิตามินบี 12 ลดลง หรือทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงมากจนวิตามินบี 12 อยู่ในสภาวะที่ไม่เสถียร ทำให้ผลการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ลดต่ำลง

จากการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะ batch fermentor ได้ปริมาณวิตามินบี 12 จาก complete medium 0.715 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากสภาวะ stationary flask ทั้งนี้เนื่องมาจากระบบ fermentor ที่ใช้มีใบพัดกวน ทำหน้าที่กวนให้สารอาหารและเซลล์จุลินทรีย์ผสมเข้ากัน และความเข้มข้นของสารอาหารเท่ากันทั่วถังหมัก ทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้อาหารในการผลิตวิตามินบี 12 ได้เต็มที่ และไม่เกิด substrate inhibition เช่นในสภาวะ stationary flask ส่วนปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากน้ำทิ้งที่เติมสารต่าง ๆ ในสภาวะ batch fermentor มีค่ามากกว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่สภาวะ stationary flask ก็เนื่องมาจากเหตุผลเดียวกัน แต่การผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งไก่ควรมีการปรับปรุงให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น โดยมีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ให้เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อให้เป็นแบบต่อเนื่อง หรือทดลองศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

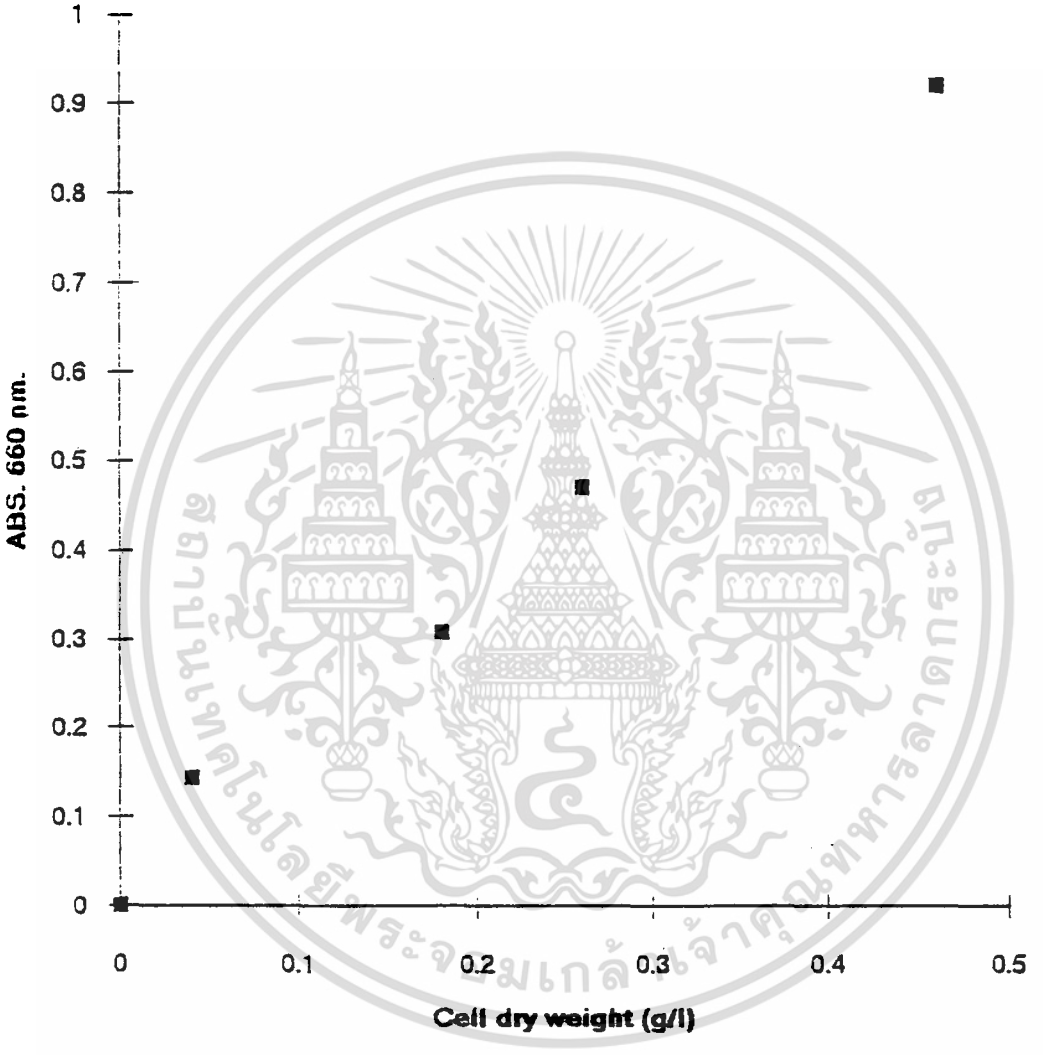
exponential-fed batch Toraya et al.(72) ได้ศึกษาโดยใช้อัตราการเติมแหล่งอาหารคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ให้สมดุลกับปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นให้สมดุลกับปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น พบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นถึงประมาณ 20 เท่า ของการเลี้ยงจุลินทรีย์ในฟลาสก์ ซึ่งไม่ได้เติมอาหารให้สมดุลกับเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



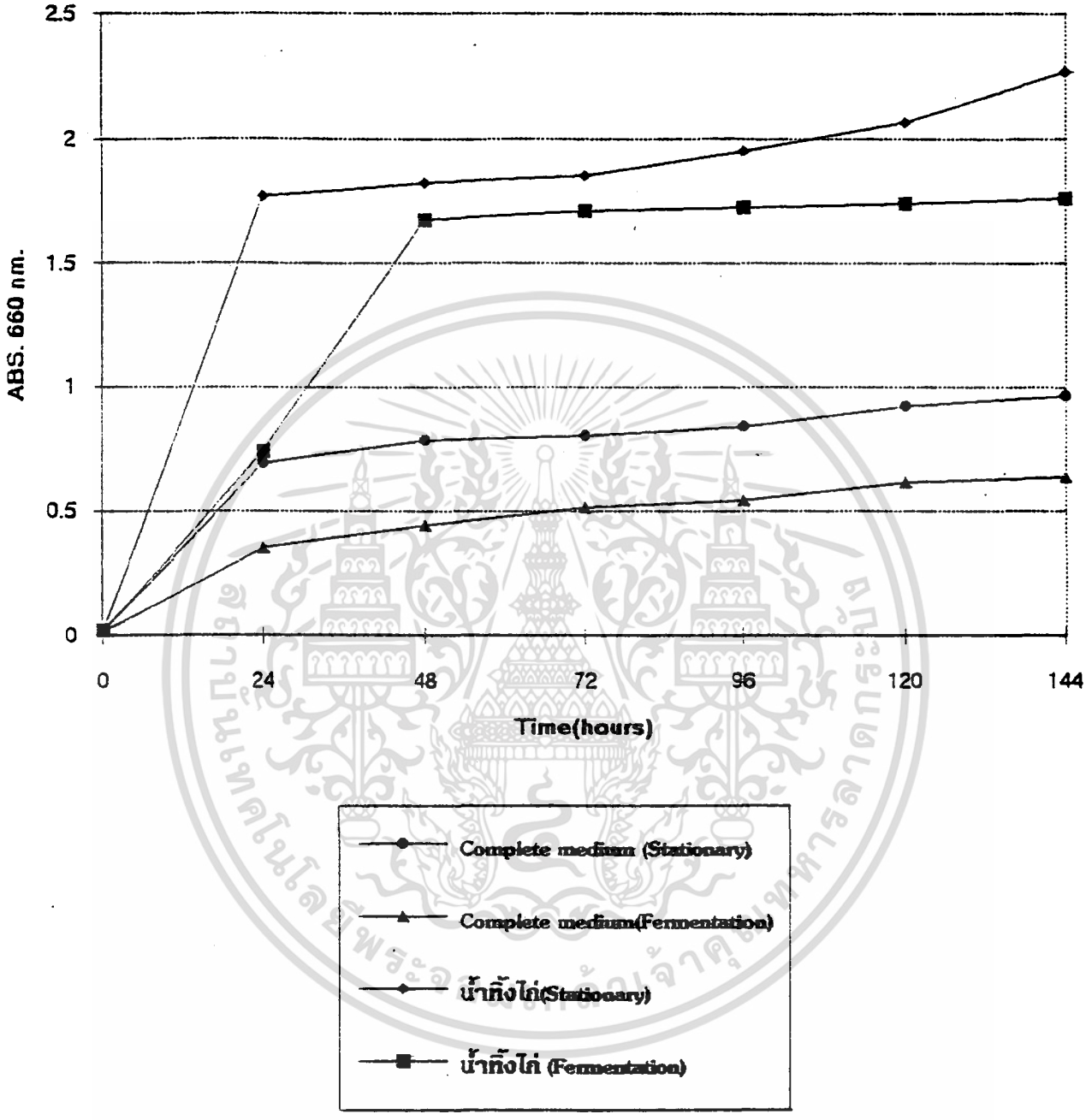
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร complete medium ที่ pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



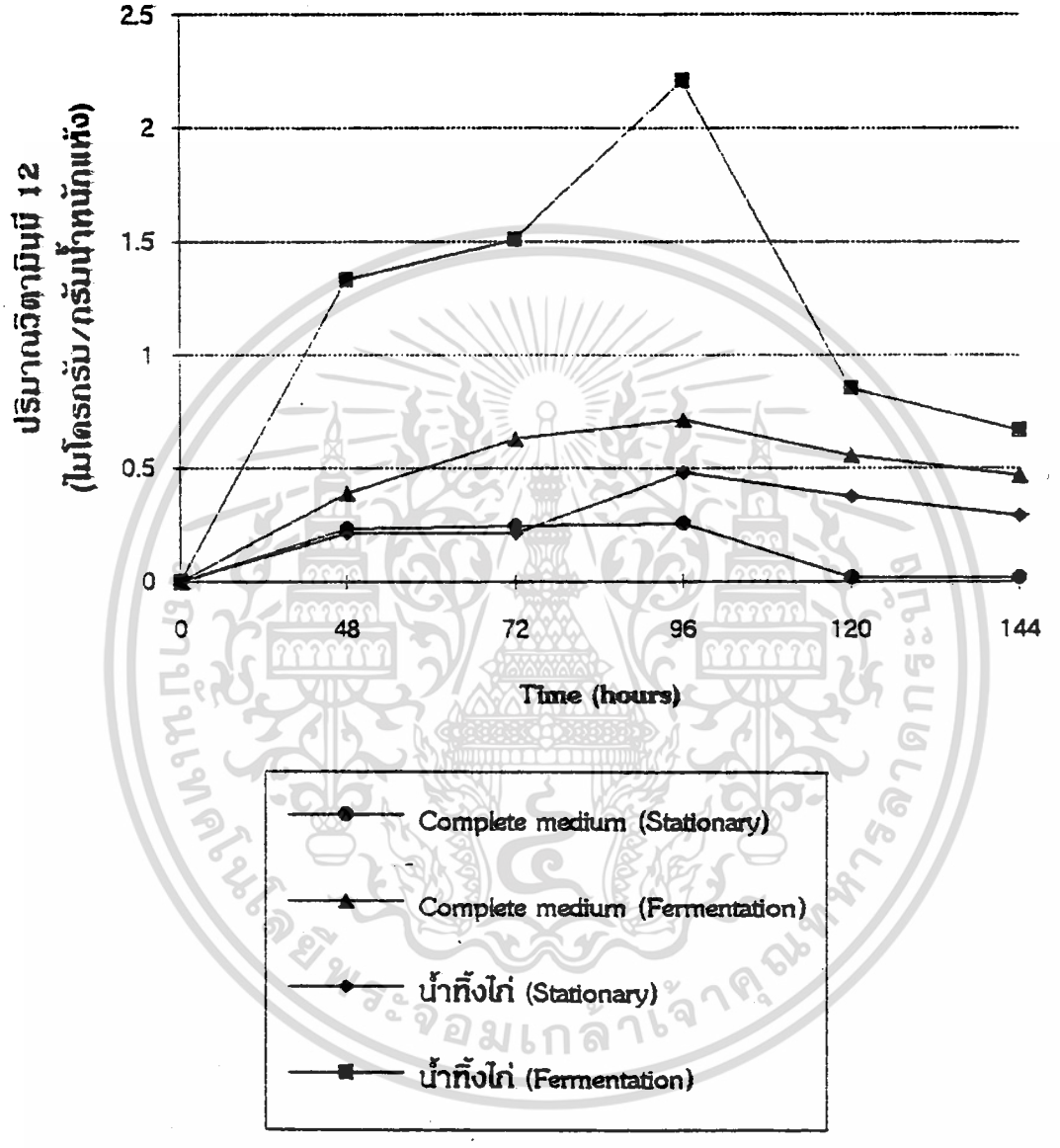
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล์กับค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



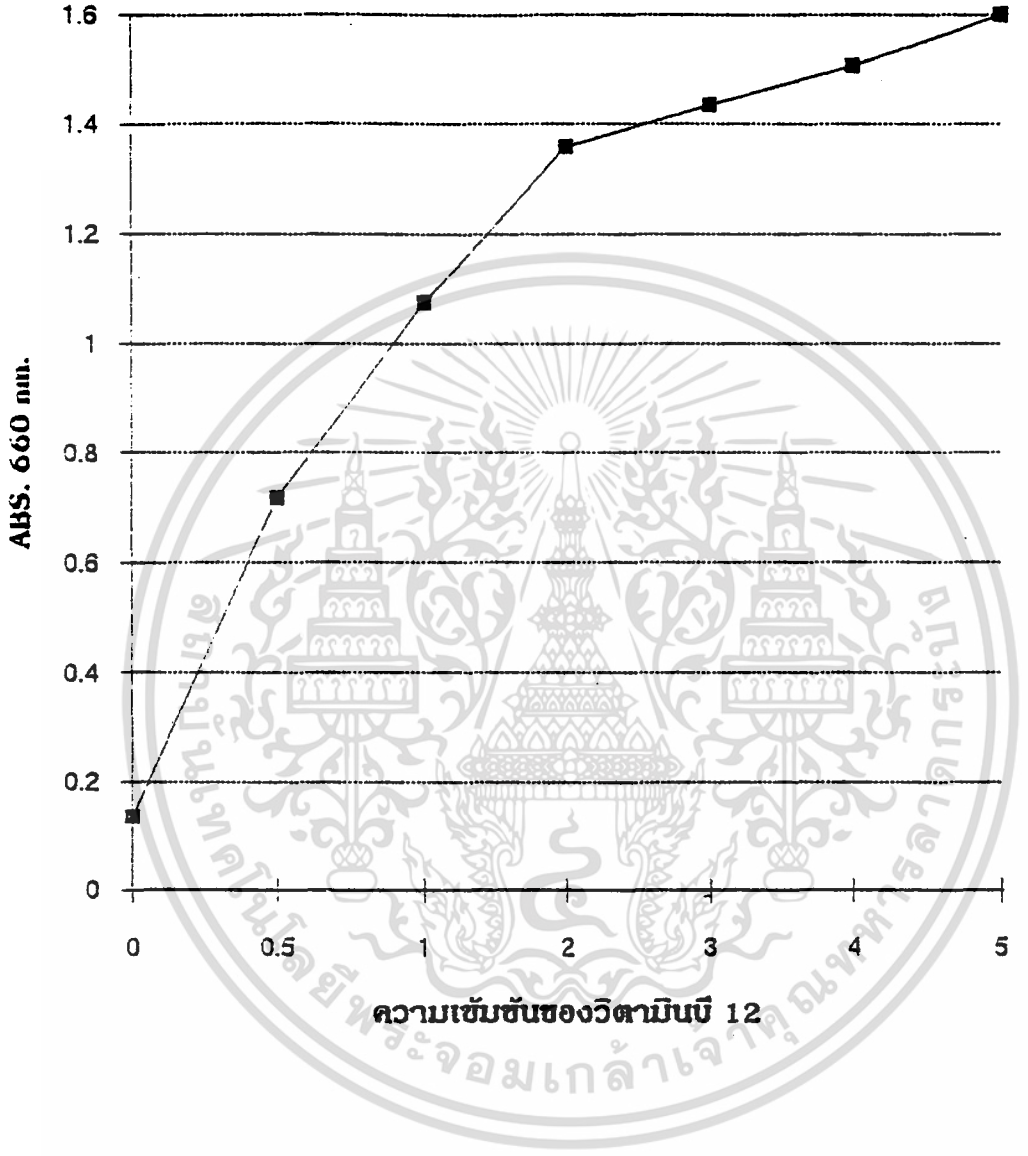
รูปที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium กับน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



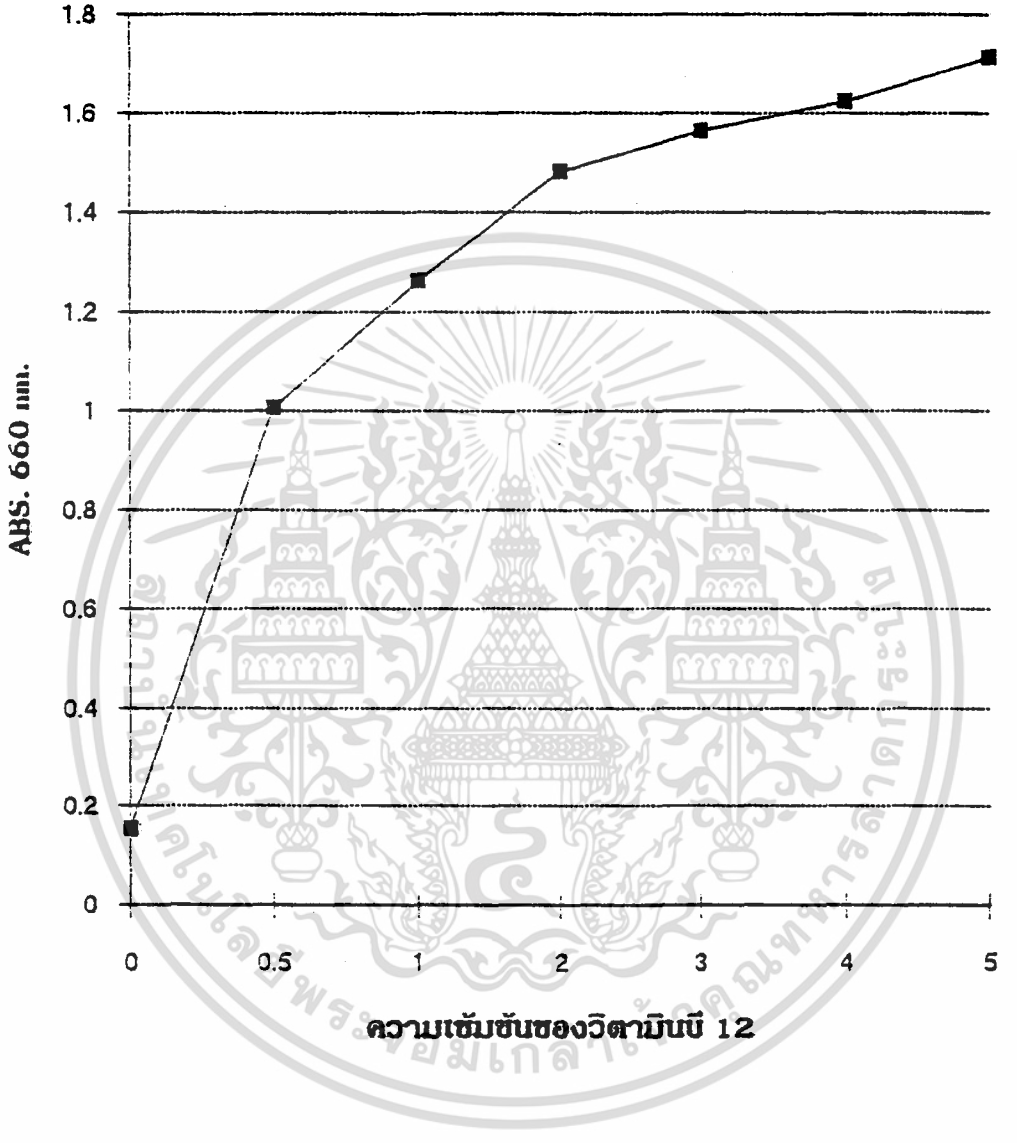
รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium กับน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



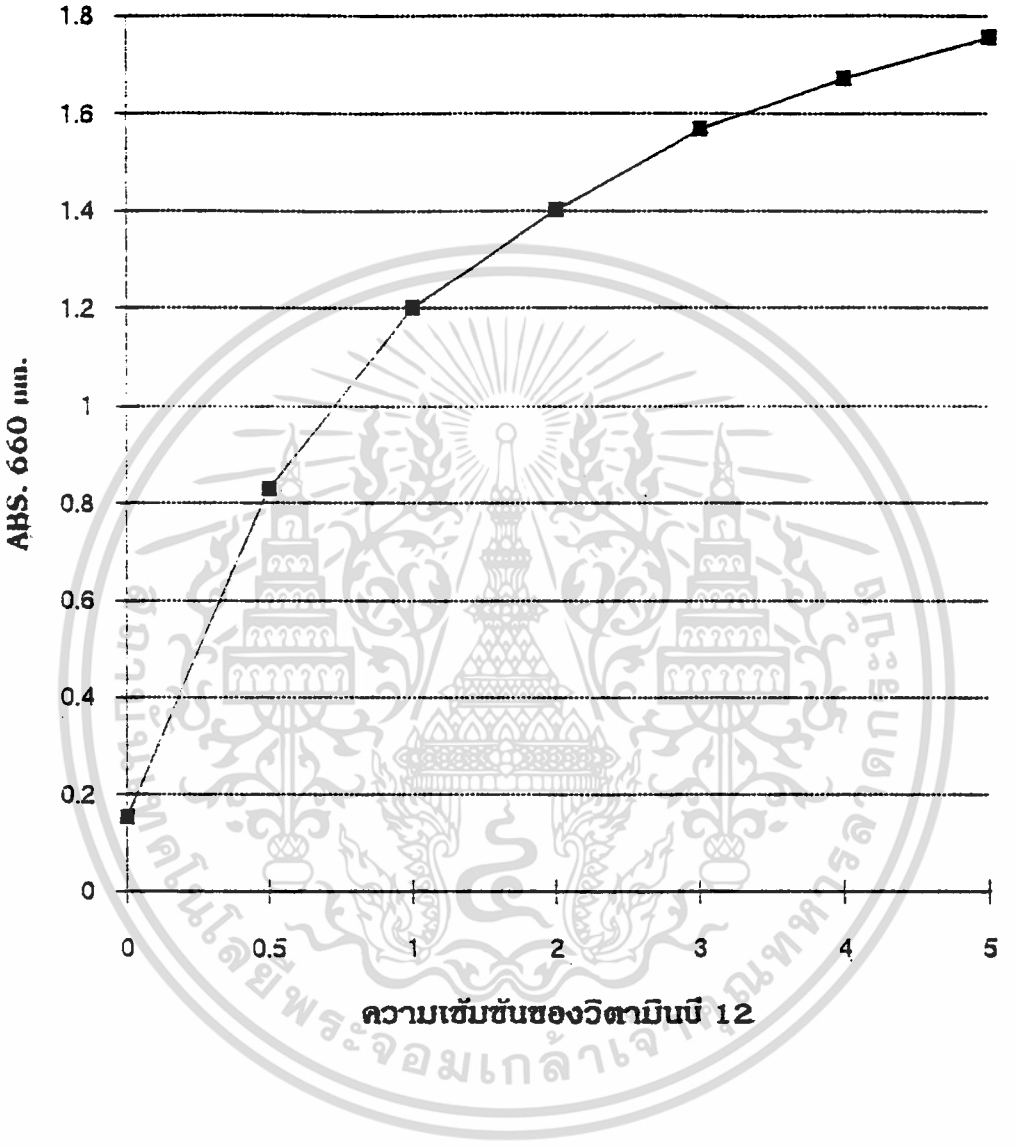
รูปที่ 4.5 แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



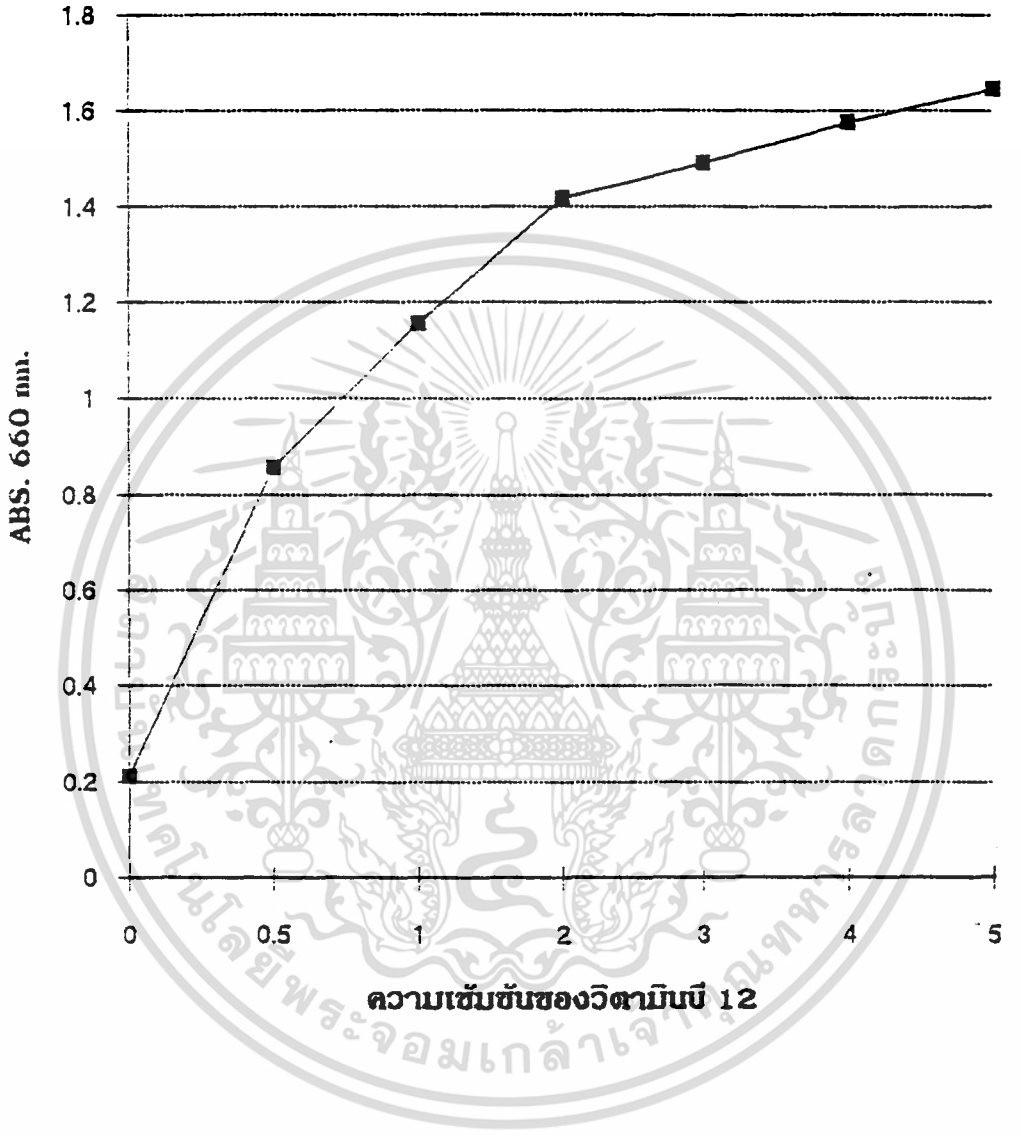
รูปที่ 4.6 แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



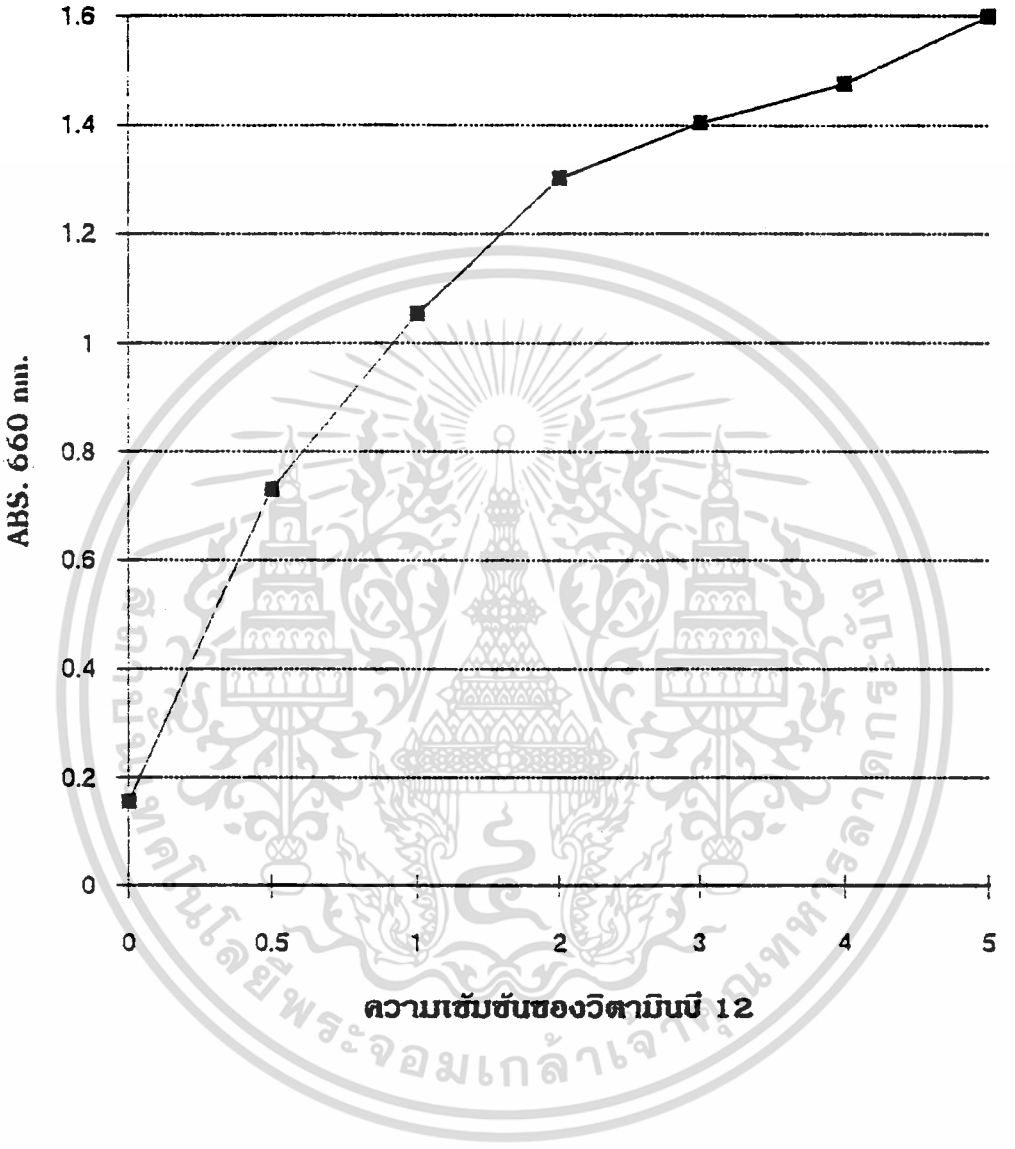
รูปที่ 4.7 แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



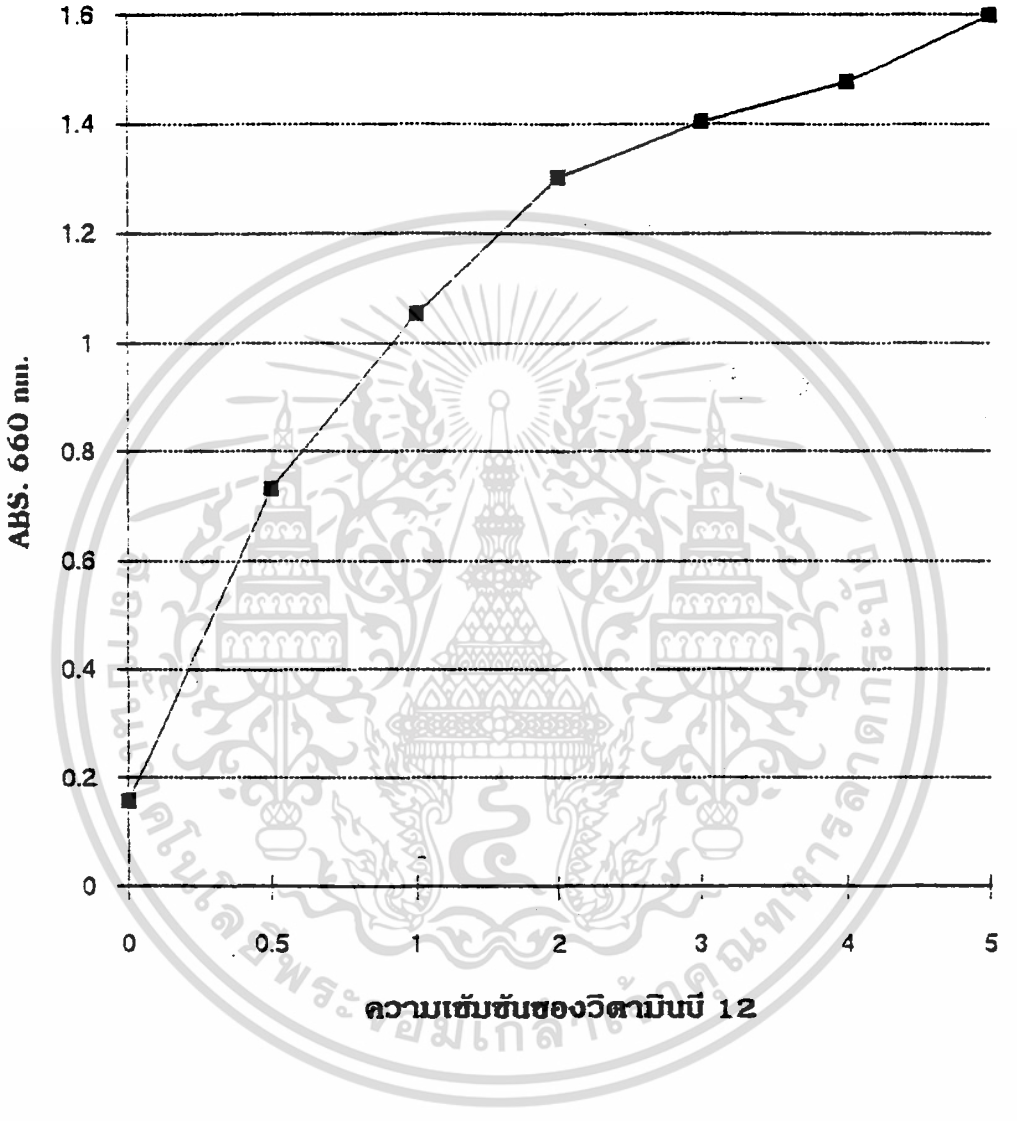
รูปที่ 4.8 แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



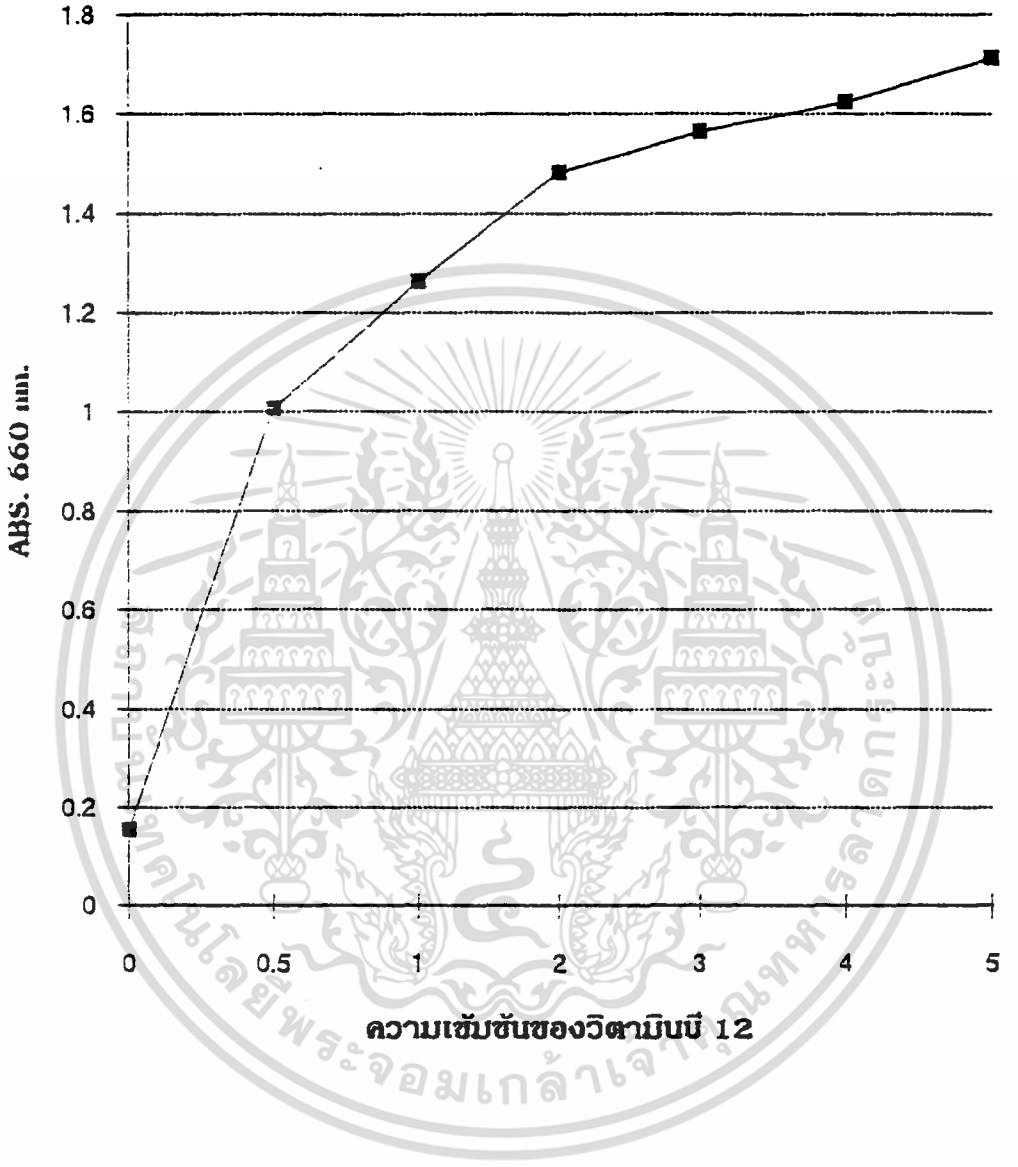
รูปที่ 4.9 แสดง calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



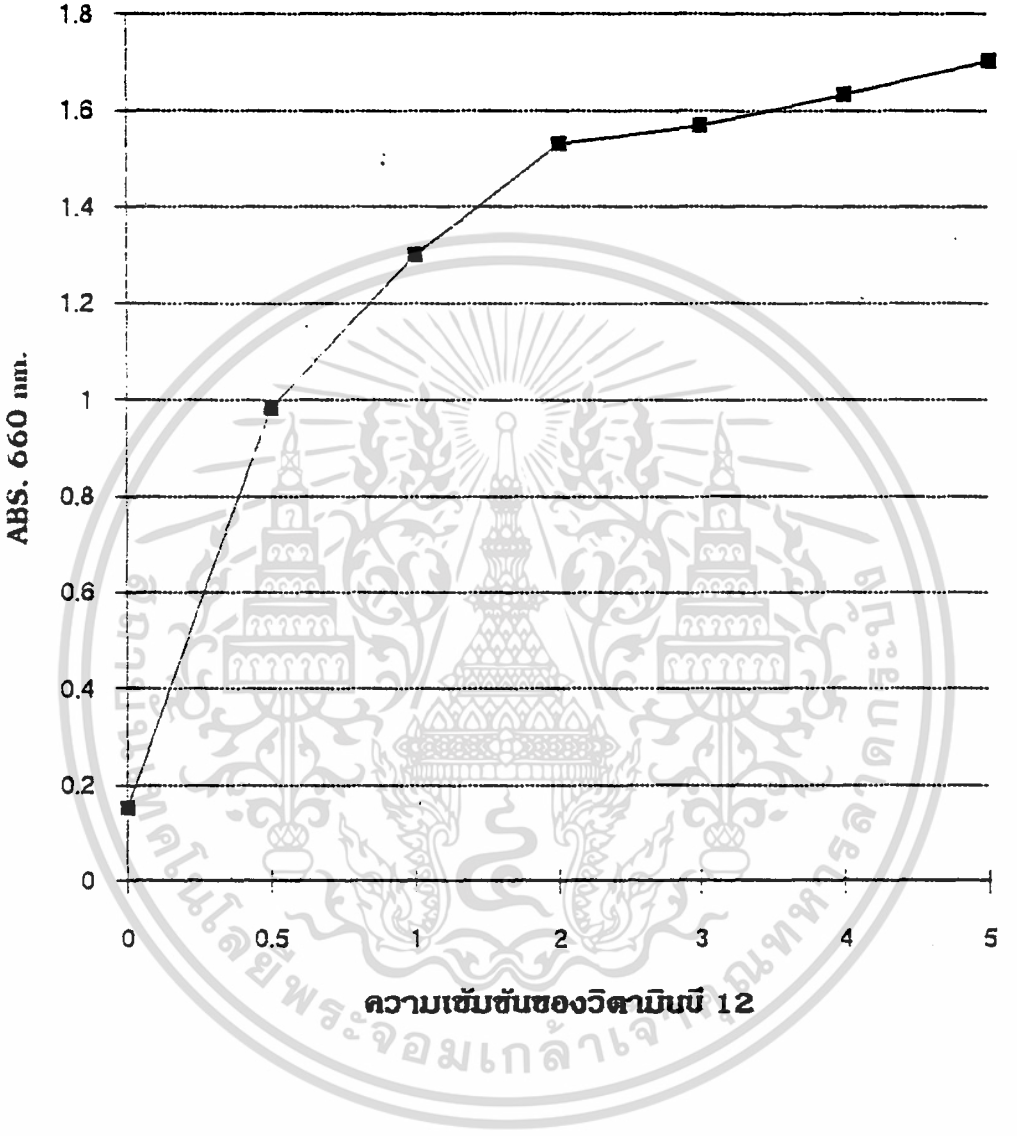
รูปที่ 4.10 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



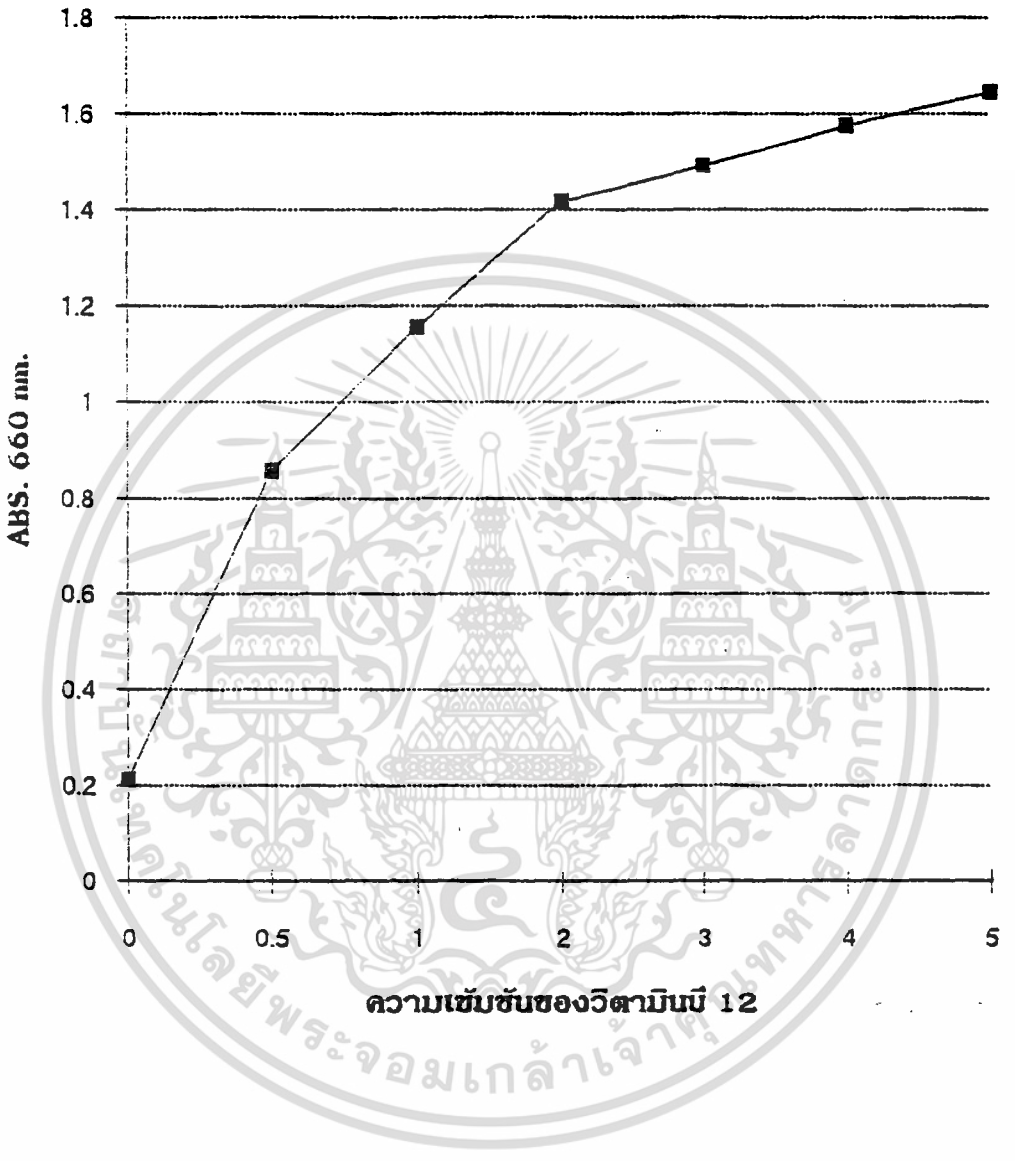
รูปที่ 4.11 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



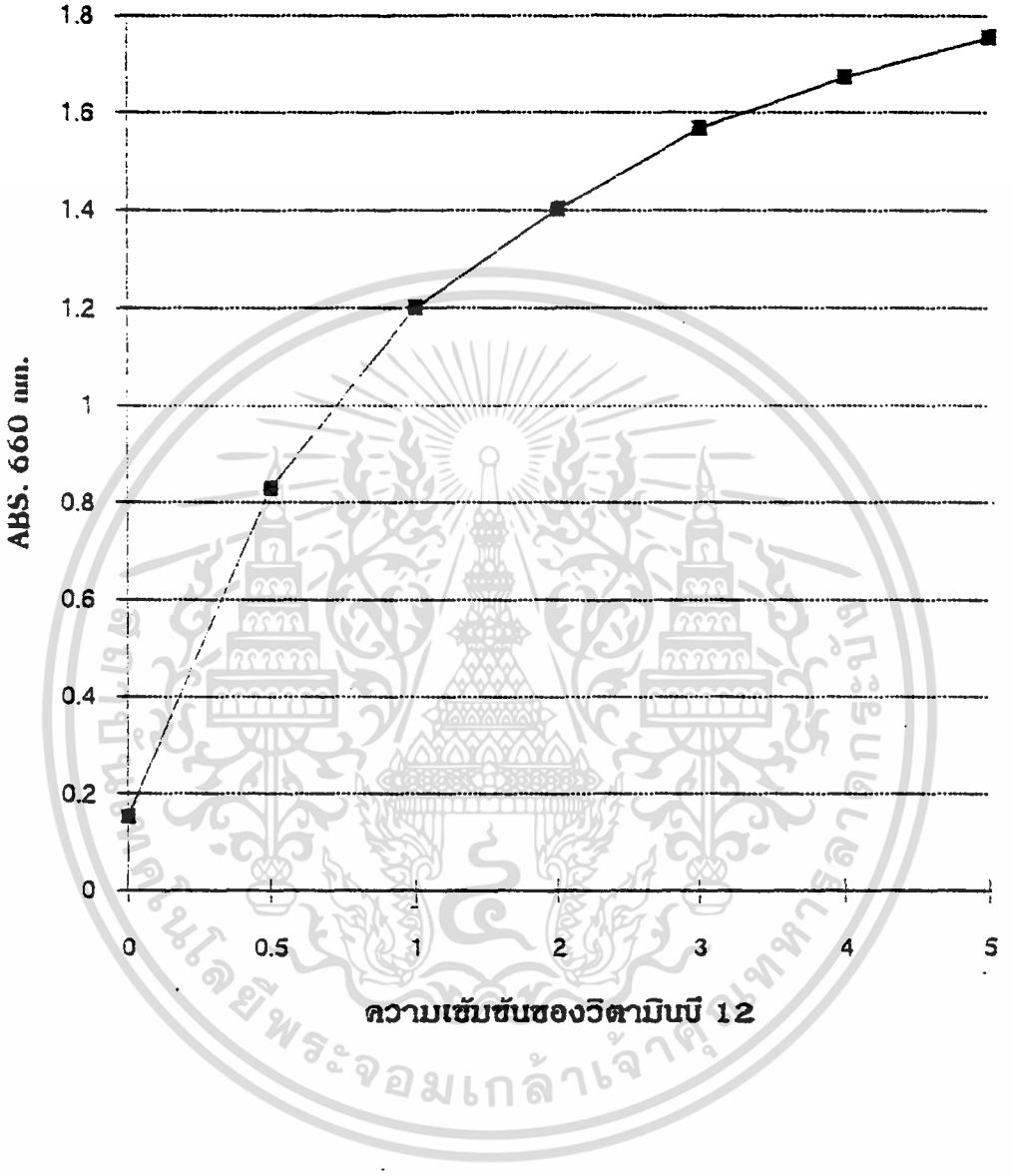
รูปที่ 4.12 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium ในสภาวะ stationary flask ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.252 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีการกวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.715 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำ Prop. freudenreichii มาเลี้ยงในน้ำทิ้งส่วนน้ำทิ้งรวมจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, ยีสต์สกัด 5.0 เปอร์เซ็นต์ และ $CoSO_4 . 7H_2O$ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าในสภาวะ stationary flask ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.480 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีการกวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 2.206 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง complete medium กับ น้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมแหล่งอาหารต่าง ๆ ในปริมาณที่เหมาะสม พบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่าใน complete medium ทั้งในสภาวะ stationary flask และใน fermentor โดยในสภาวะ stationary flask น้ำทิ้งไก่ให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่า complete medium ถึง 52.48 เปอร์เซ็นต์ และในถังหมักให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่า complete medium ถึง 32.43 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentor ที่มีระบบการกวนแต่ไม่มีการให้อากาศ พบว่าถังหมักที่มีการกวนแต่ไม่มีการให้อากาศ ให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่า 21.76 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ในปริมาณที่เหมาะสมในสภาวะการหมักที่มีการกวนโดยไม่มีการให้อากาศ จะให้ผลผลิตของวิตามินบี 12 สูงกว่าและเหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. : อาหารเลี้ยงเชื้อ

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 (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 อาหาร Tomato Juice Agar สำหรับเลี้ยงเชื้อ L. delbrueckii sp.lactis มีส่วนประกอบดังนี้

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Filtrate tomato juice	200.0	มิลลิลิตร
agar	11.0	กรัม

หมายเหตุ : การเตรียม Filtrate tomato juice มีวิธีการดังนี้ ชั่งมะเขือเทศ 200 กรัม บดให้ละเอียด ต้มในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ประมาณ 15 นาที กรองเอามะเขือเทศออกเหลือแต่น้ำใส เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

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	มิลลิกรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Pantothenic acid	4.0	มิลลิกรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข : สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ด้วย Turbidimetric Method of Microbiological Assay

1.1 Acetate buffer 0.1 M. pH 4.6

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B

สารละลาย A : 0.1 M. CH_3COOH

acetic acid 5.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย B : 0.1 M. CH_3COONa

sodium acetate 8.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลาย A 25.5 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลาย B 24.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 Buffer cyanide solution

ละลาย KCN 1.0 กรัม ใน Acetate buffer 0.1 M. pH 4.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย KCN 0.05 %

ละลาย KCN 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

1.4 วิตามินบี 12 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผลึกวิตามินบี 12 (Cyanocobalamin) ของ Merck & Co;Inc. 1.0 มิลลิกรัมในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 100 มิลลิลิตร ดูดใส่ ampule (เตรียมจากหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรโดยหลอมปลายปิดไว้ด้านหนึ่งก่อน) 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมปลายอีกด้านหนึ่ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีเก็บไว้เป็น Stock solution โดยแช่ไว้ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 Micro-inoculum broth ของเชื้อ L. delbrueckii sp.lactis 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 80)	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.6 สารละลาย single strength assay medium

ชั่ง vitamin B_{12} assay medium ของ Merck & Co;Inc. 4.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Tween 80 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส (239 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 10 นาที สารละลายนี้ใช้สำหรับล้างเซล L. delbrueckii sp.lactis

1.7 สารละลาย Double strength assay medium

ชั่ง vitamin B_{12} assay medium ของ Merck & Co;Inc. 8.30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Tween 80 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดละ 9.0 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารละลายนี้ใช้สำหรับทำ Dilution ของเชื้อ L. delbrueckii sp.lactis และใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

หมายเหตุ สารละลาย vitamin B_{12} assay medium ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการ assay วิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค. : แผนภาพแสดงวิธีการวิเคราะห์ผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ใน Stationary flask liqour และ Stationary liqour ใช้วิธี Turbidimetric Method of Microbiological Assay โดยเชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis เป็น test organism ใน Vitamin B_{12} assay medium ของ Merck & Co;Ltd. ซึ่งมีเฉพาะสารที่จำเป็นต่อการเจริญแต่ไม่มีวิตามินบี 12

1.1 การเตรียม Sample assay tube

ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงใน test tube

↓

เติม Buffer cyanide solution 1.0 มิลลิลิตร

เขย่าด้วย Cyclo mixer

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

↓

Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm. เป็นเวลา 15 นาที

เก็บ Supernatant ไว้

↓

เจือจาง Supernatant ด้วย น้ำกลั่น

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 ปริมาตรละ 3 หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปต Supernatant ที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร
0.2 ,0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่หลอด assay tube ปริมาตรละ 3 หลอด

↓

เติมน้ำกลั่น Double distillation
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 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที
(ทำการฆ่าเชื้อพร้อมกับ Working vitamin B_{12} assay tube)

↓

ทิ้งไว้ให้เย็นแล้ว หยด Suspension ของเชื้อ
Lactobacillus delbrueckii sp.lactis ด้วย Micropipette

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

↓

วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

หมายเหตุ

1. การหยด Suspension เชื้อ ให้หยดเพียง 2 หลอด อีก 1 หลอดที่เหลือใช้เป็น blank สำหรับวัดค่าความขุ่นของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เนื่องจากวิตามินบี 12 ที่เชื้อสร้างขึ้นอยู่ภายในเซลจึงต้องทำการ Break cell ด้วยการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที cobalamin ที่เซลปล่อยออกมาจะทำปฏิกิริยากับ Buffer cyanide solution ได้เป็น Cyanocobalamin อยู่ใน Supernatant

1.2 การเตรียม Working vitamin B_{12} assay tube

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

↓

เจือจางเป็น 100 เท่าด้วยน้ำกลั่น Double distillation
โดยใช้ Volumetric flask 50 มิลลิลิตร

↓

ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร
เติม KCN 0.05 % ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

↓

เจือจางด้วยน้ำกลั่น Double distillation จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร
จะได้ Standard solution vitamin B_{12}
เข้มข้น 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

ปิเปต Standard solution vitamin B_{12}
0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร
ใส่ในหลอด assay tube ปริมาตรละ 3 หลอด

↓

เติมน้ำกลั่น Double distillation ให้มีปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตรทุกหลอด

↓

เติม Double strength assay medium 1.5 มิลลิลิตร
(ปริมาตรรวมเป็น 3.0 มิลลิลิตรทุกหลอด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติม Double strength assay medium 1.5 มิลลิลิตร

(ปริมาตรรวมเป็น 3.0 มิลลิลิตรทุกหลอด)

↓

เขย่าโดยใช้ Cyclo mixer

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

(ทำการนึ่งเชื้อพร้อมกับ Sample assay tube)

↓

ทิ้งไว้ให้เย็น

↓

หยด suspension ของเชื้อ

Lactobacillus delbrueckii sp.lactis

ด้วย Micropipette

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

↓

วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

หมายเหตุ ในการ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องทำ Working vitamin B_{12} ทุกครั้งเพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อและอุณหภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก Calibration curve

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การเตรียม Suspension ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis

ถ่ายเชื้อ L. delbrueckii จาก stock culture

ลงใน tomato juice agar แบบ stab

(โดยต้องทำการต่อเชื้อทุกวัน เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพที่ active)

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อ L. delbrueckii ที่อยู่ในสภาพที่ active แล้วลงใน

Micro-inoculum broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

วัดค่าความขุ่นของเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ให้ได้ O.D.= 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำ suspension

(ถ้าค่า O.D.เกิน 0.5 ให้เจือจางด้วย Micro-inoculum broth)

↓

ปิเปตใส่หลอด Centrifuge 5 มิลลิลิตร

↓

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

↓

ปิเปตเอาส่วนที่เป็นน้ำออก เก็บตะกอนเซลไว้

↓

ล้างตะกอนเซลเพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 เหลืออยู่

โดยใช้ Single strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ล้างตะกอนเซลเพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 เหลืออยู่
โดยใช้ Single strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

↓

ทำการเขย่าด้วย Cyclo mixer

↓

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
ทำเช่นเดิม 3-4 ครั้ง

↓

ครั้งสุดท้ายถ่ายลงใน Single strength assay medium
ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

↓

ทำการเขย่าด้วย Cyclo mixer

↓

เจือจาง suspension ที่ได้ให้เป็น 1 : 1000 ด้วย
Double strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

↓

Inoculum cell suspension
(suspension ที่จะใช้หยดใน sample assay tube กับ
Working vitamin B_{12} assay tube)

หมายเหตุ :

การเตรียม suspension ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ทุกขั้นตอนต้องทำแบบ Aseptic technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12

เส้นกราฟที่เขียนขึ้นระหว่าง absorbance กับ ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 มีหน่วยเป็น 10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$$\text{ปริมาณวิตามินบี 12} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินบี 12}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}} \times \text{ความเจือจาง}$$

(ปริมาณวิตามินบี 12 มีหน่วยเป็น 10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

(ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินบี 12 มีหน่วยเป็น 10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง. : ตารางแสดงผลการทดลอง

ชั่วโมงที่	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0.019	0.016	0.180	0.018
12	0.332	0.331	0.332	0.332
24	0.694	0.696	0.694	0.695
36	0.748	0.749	0.752	0.750
48	0.785	0.785	0.786	0.785
60	0.797	0.800	0.792	0.796
72	0.805	0.807	0.801	0.804
84	0.812	0.810	0.809	0.810
96	0.842	0.841	0.840	0.841
108	0.893	0.892	0.893	0.893
120	0.919	0.921	0.922	0.921
132	0.948	0.946	0.947	0.947
144	0.965	0.971	0.966	0.967

ตารางที่ ง.1 แสดงผลการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium ที่ pH เริ่มต้น เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 แสดงความขุ่นของเชื้อ (O.D.) และน้ำหนักแห้ง (cell dry weight) ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร complete medium ที่ pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask

ความเจือจาง	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)
1 : 5	0.143	0.04
1 : 3	0.308	0.18
1 : 1	0..470	0.26
1 : 0	0.921	0.46

ตารางที่ ง.3 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน complete medium กับน้ำทิ้งไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ศึกษา ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร			
	complete medium		น้ำทิ้งไก่ + สารอาหารต่าง ๆ	
	stationary flask	fermentation	stationary flask	fermentation
0	0.018	0.014	0.016	0.020
48	0.785	0.445	1.822	1.673
72	0.804	0.513	1.851	1.708
96	0.841	0.544	1.952	1.725
120	0.921	0.617	2.067	1.738
144	0.967	0.639	2.267	1.760

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.4 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของ Vitamin B_{12} working standard ของ complete medium ณ.ชั่วโมงต่าง ๆ

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 (x 10^{-5} ไมโครกรัม/cube)	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 144
0.0	0.136	0.153	0.153	0.212	0.155
0.5	0.718	1.007	0.829	0.857	0.730
1.0	1.074	1.263	1.201	1.156	1.054
2.0	1.357	1.483	1.401	1.418	1.302
3.0	1.435	1.565	1.568	1.492	1.403
4.0	1.506	1.624	1.673	1.577	1.476
5.0	1.599	1.712	1.757	1.645	1.598

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง. 5 แสดงค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก Complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 48

Complete medium	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.131	0.155	0.165	0.151	0.165	0.190	0.160	0.201	0.220
Fermentation	0.121	0.131	0.149	0.135	0.171	0.186	0.191	0.273	0.351

ตารางที่ ง.6 แสดงค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก Complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 72

Complete medium	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.136	0.151	0.165	0.161	0.175	0.241	0.169	0.233	0.297
Fermentation	0.145	0.286	0.302	0.163	0.311	0.342	0.299	0.356	0.372

ตารางที่ ง.7 แสดงค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก Complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ Staaionary flask กับ Fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 96

Complete medium	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.133	0.172	0.217	0.165	0.190	0.231	0.201	0.252	0.341
Fermentation	0.364	0.583	0.818	0.665	0.972	1.301	0.739	1.064	1.422

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.8 แสดงค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก Complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 120

Complete medium	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.088	0.106	0.125	0.092	0.115	0.155	0.149	0.207	0.308
Fermentation	0.210	0.301	0.332	0.261	0.531	0.575	0.420	0.641	0.700

ตารางที่ ง.9 แสดงค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จาก Complete medium เปรียบเทียบระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation ณ.ชั่วโมงที่ 144

Complete medium	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.099	0.128	0.134	0.147	0.155	0.163	0.156	0.204	0.313
Fermentation	0.150	0.185	0.211	0.207	0.234	0.304	0.242	0.381	0.470

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.10 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของ Vitamin B_{12} working standard ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงต่าง ๆ

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
(x 10^{-5} ไมโครกรัม / tube)	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 144
0.0	0.155	0.153	0.152	0.212	0.153
0.5	0.730	1.007	0.982	0.857	0.829
1.0	1.054	10263	1.299	1.156	1.201
2.0	1.302	1.483	1.531	1.418	1.401
3.0	1.403	1.565	1.568	1.492	1.568
4.0	1.476	1.624	1.633	1.577	1.673
5.0	1.598	1.712	1.704	1.645	1.757

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.11 แสดงผลค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 48

น้ำทิ้ง + สารอาหาร	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.185	0.201	0.220	0.221	0.250	0.332	0.331	0.500	0.711
Fermentation	0.153	0.206	0.302	0.431	0.791	0.998	1.293	1.638	1.853

ตารางที่ ง.12 แสดงผลค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 72

น้ำทิ้ง + สารอาหาร	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.142	0.189	0.318	0.201	0.253	0.479	0.465	0.947	1.299
Fermentation	0.183	0.301	0.780	0.635	1.110	1.295	1.565	1.724	1.835

ตารางที่ ง.13 แสดงผลค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 96

น้ำทิ้ง + สารอาหาร	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.152	0.167	0.184	0.169	0.214	0.275	0.312	0.509	0.841
Fermentation	0.193	0.298	0.415	0.499	0.892	1.176	1.460	1.722	1.844

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.14 แสดงผลค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 120

น้ำทิ้ง + สารอาหาร	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.149	0.190	0.275	0.232	0.427	0.887	0.552	0.996	1.332
Fermentation	0.662	1.012	1.418	0.741	1.228	1.555	1.285	1.614	1.830

ตารางที่ ง.15 แสดงผลค่า O.D. ของเชื้อ Lactobacillus delbrueckii ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จากของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ได้ศึกษา ณ.ชั่วโมงที่ 144

น้ำทิ้ง + สารอาหาร	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}		
สภาวะ	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Stationary flask	0.135	0.190	0.345	0.370	0.571	0.649	0.903	1.370	1.607
Fermentation	0.192	0.245	0.521	0.361	0.630	1.082	1.285	1.711	1.830

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.16 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation

ชั่วโมงที่	Stationary flask			
	ค่า O.D.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/g)
48	0.785	0.400	0.092	0.229
72	0.804	0.410	0.100	0.244
96	0.841	0.430	0.108	0.252
120	0.921	0.460	0.009	0.020
144	0.967	0.490	0.007	0.015

ชั่วโมงที่	Fermentation			
	ค่า O.D.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/g)
48	0.354	0.180	0.070	0.389
72	0.445	0.223	0.140	0.628
96	0.544	0.275	0.197	0.715
120	0.617	0.317	0.177	0.557
144	0.639	0.322	0.150	0.466

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.17 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษามาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation

ชั่วโมงที่	Stationary flask			
	ค่า O.D.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/g)
48	1.822	0.920	0.193	0.210
72	1.851	0.940	0.200	0.213
96	1.952	0.990	0.475	0.480
120	2.067	1.045	0.393	0.376
144	2.267	1.150	0.337	0.293

ชั่วโมงที่	Fermentation			
	ค่า O.D.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/g)
48	1.673	0.850	1.130	1.329
72	1.708	0.870	1.310	1.506
96	1.725	0.875	1.930	2.206
120	1.738	0.880	0.750	0.852
144	1.760	0.895	0.597	0.667

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.18 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตโดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน Complete medium และน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษามาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation

ชั่วโมงที่	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)			
	Complete medium		น้ำทิ้ง+สารอาหาร	
	Stationary flask	Fermentation	Stationary flask	Fermentation
48	0.229	0.389	0.210	1.329
72	0.244	0.628	0.213	1.506
96	0.252	0.715	0.480	2.206
120	0.020	0.557	0.376	0.852
144	0.015	0.466	0.293	0.667

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง + สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + น้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ + ยีสต์สกัด 5.0 เปอร์เซ็นต์ และ $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ. : รูปประกอบการทดลอง

รูปที่ จ.1 เปรียบเทียบน้ำทิ้งไก่ก่อนเติมสารอาหารและหลังเติมสารอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ จ.2 แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน อาหาร complete medium สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 96

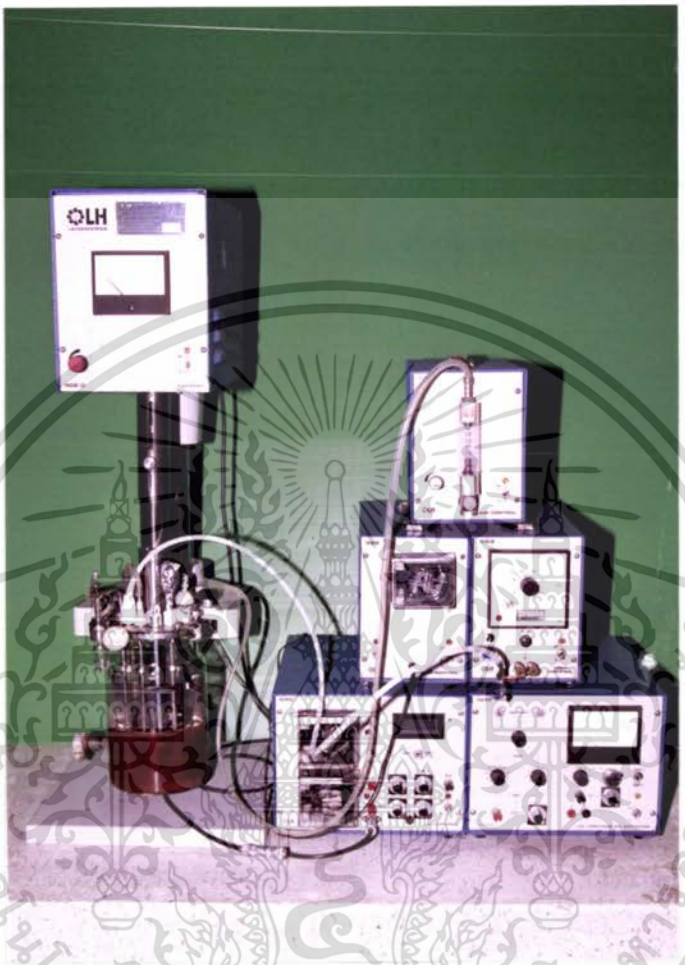
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ จ.3 แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน อาหาร complete medium สภาวะ fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

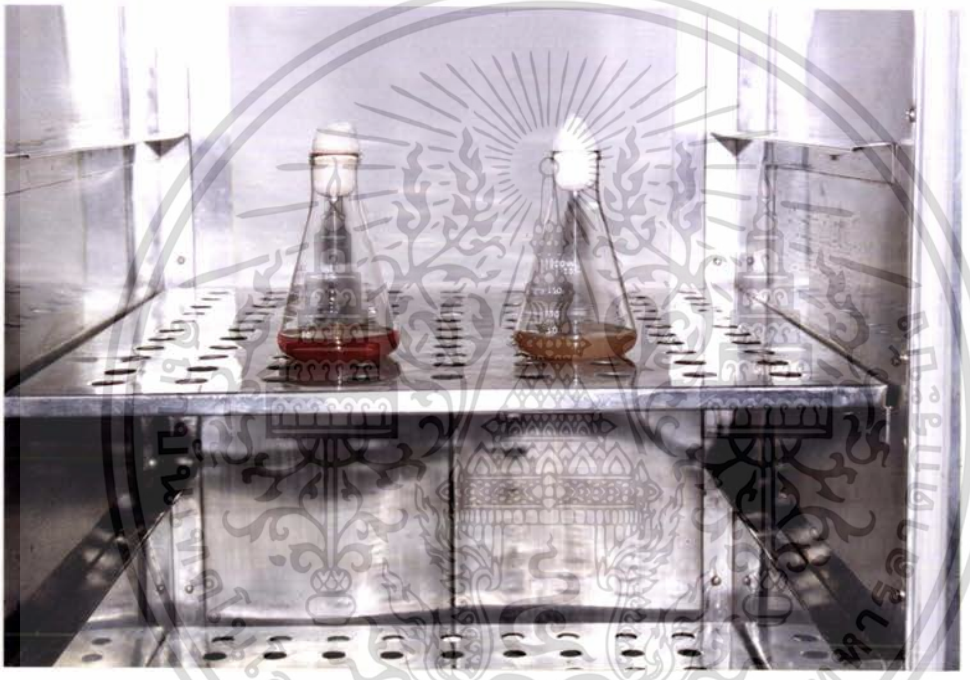
รูปที่ จ.4 แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



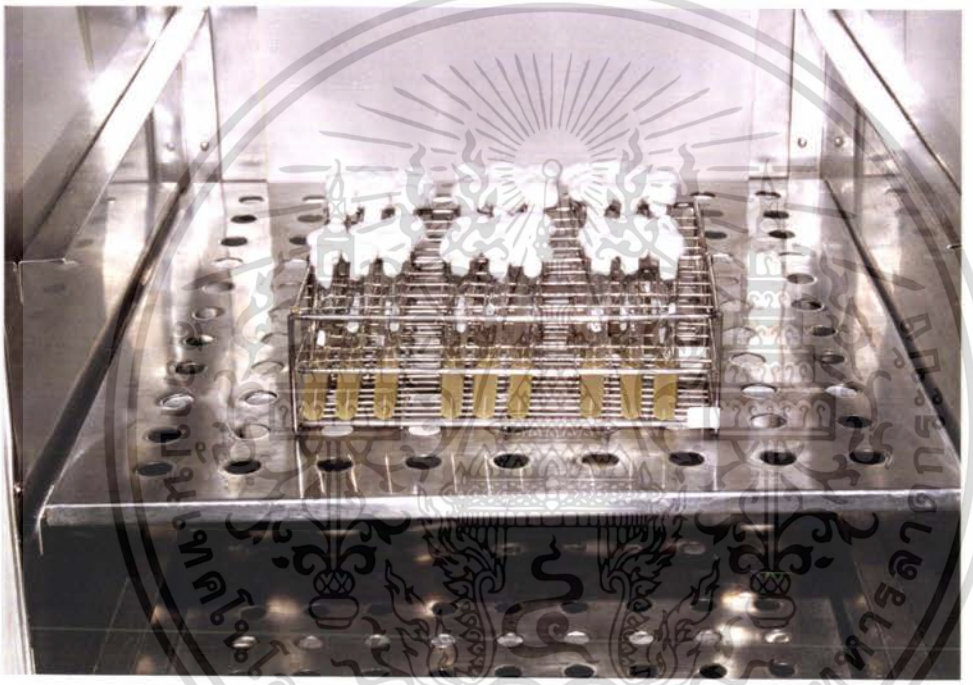
รูปที่ จ.5 แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ สภาวะ fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.6 แสดงเชื้อ Lactobacillus delbrueckii sp.lactis ในอาหาร Microinoculum broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.7 แสดง Sample assay tube เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. กิจจา ช.เจริญยิ่ง จิรัฐ นรเศรษฐธีรกุล ธเนศ เอิบอิ่มฤทธิ์. "การผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (ATTC) จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่" โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง , 2536.

2. จารุวรรณ วงศ์วรกุลกิจ เทอดไทย เอกา."การศึกษาผลของปัจจัยต่อการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii" โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง , 2537.

3. พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์."การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii sp.shermanii (ATTC 13673)โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2518.

4. พิณทิพย์ พุลโภคา."การคัดเลือกสายพันธุ์ Pseudomonas spp. และการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2523.

5. บุษบา ยงสมิทธ์ ทอรายา เฟตซูโอะ และยามาเน ชูเนโอะ."การผลิตวิตามินบี 12 โดยแบคทีเรียที่ใช้เมทธานอลเป็นวัตถุดิบ" รวบรวมเรื่องย่อสาขาพืช การประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยาครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2518.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

7. สุวิทย์ อารีกุล. "กรดโฟลิกและวิตามินบี 12" ภาควิชารังสีไอโซโทปเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล, 2522.

8. Association of Vitamin chemists , Inc. 1951, " Method of Vitamin assay" Interscience, New york.

9. American Type Culture Collection.1972,"The American Type Culture Colletion Cattalogue of Strains" , American Type Culture Collection, Maryland

10. Baker, H. and H.B.Rose. 1957, "Production of Vitamin B_{12} by thermophiles" U.S. Patent. 2,917,436, Dec. 15,1957.

11. Baron, A.1962, "Use of thickening agent" U.S. Patent3,067, 109,Dec.4,1962.In:Noyes,R,1969.Vitamin B_{12} manufacture, Noyes Development Corp., New Jersey.

12. Becher,E.: K.Bernhauer and G. Wilharm. 1962 ,"Use of Precursors"U.S.Patent 3,043,750, July 10,1962,In:Noyes Development Corp.,New Jersey.

13. Boretti,G.; A.di Marrco;L.Fuoco;M.P.Marnati, A.Migliacci and C. Spalla.1960, Biochem.Biophys.Acta 37:379.Cited in rainbow,C.and A.H.Rose.1963. Biochemistry of industry microorganism Acedimic Press,Inc.,London and New York

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. Borrows, W.; J.W.Monlder; R.M.lewart and J.W.Rippon.1968. Textbook of microbiology,Toppen Company limited,Tokyo ,Japan.

15. Buchanan, R.E.; N.E.Gibson; S.T.Cowan; J.G.Holt; J.liston; R.G.E.Murray;C.F.Nivinl;A.W.Ravin and R.Y.Stanier.1974. Bergey's Mannual of eterminative Bacteriology.8th ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore.

16. Bulkin,V.N. and G.V.Pronyakova;1960, "The Biosynthesis of vitamin B_{12} and porphyrin by Propionibacterium" J.biochem.

17. Casida, L.E.,Jr.1968, Industrial microbiology,John Wiley and sons,Inc.,New York,London and Sydney.

18. Cleasby, T.G.1963, "The feeding Value of Molasses,: S.A. SUGAR J. 47: 260-267.

19. Committee of Revision and Publiished by the Board of trusts.1965,The Pharmaacopeia of the United States of America,The United States Pharcopieal Convention,Inc. Washington D.C.

20. Darken , M.A. 1953. " Production of vitamin B_{12} by microorganism and its occurence in plant tissues. " Cited in Gleason, H.A. and E.H. Fulling, 1953, Boton. Rev.19:9-129.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21. David,B.D.and E.S.Mingioli.1950. J.Bact. 60:17 ,Cited in Sebrell,W.H. Jr. and R.S. Harris ,1968, The vitamin chemistry,Physiology,Pathlogy method.Acedimic Press, Inc.,New York and London.

22. Difco Laboratories , 1953 , Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures,Detroit,Michiigan.

23. Garibaldi,J.A.; I.Kosude; N.S.Shell and J.C.Lewis.1953, " Bacillus megaterium for biosynthesis of cobalmin " Ind.Eng.Chenm,45:838-846.

24. Garibaldi,E.A. and R.I.Suklomin.1963, Determination of potassium and sodium in molasses,Tr.Kievski.Technol. Inst. , Pishchevoi Prom.9 (27) : 55-60 , Abstract in Chemical Abstracts 61: 3286,1964.

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

26. Hall, H.H. 1951, "Method for the production of vitamin B_{12} by Streptomyces olivaceus" U.S.Patent 2,643,213. June 23,1953.

27. Hall, H.H.; R.G. Benedict; C.F. Wieson; C.E. Smith and R.W.Jackson.1953. "Vitamin B_{12} production by fermentation with Streptomyces olivaceus" Appl.Microbiol. 1:124-129.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28. Hall,H.H. and H.M.Tsuchita.1950."Method for producing vitamin B_{12}" U.S.Patent 2,561,364. July 24,1951.

29. Halbrook,E.R.; F.Cords;; A.R. Winter and T.S. Sutton. 1950 ," Vitamin B_{12} production by microorganism isolated from poultry hause litter and droppings " J.Nutritition. 41:555.

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

31. Hodge, H.M., C.T. Hanson and R.J.Allgeier.1952," Animal protein factor supplement produced by direct bacterial fermentation" Production and evaluation. Ind.Eng.Chem. 44:132-135.

32. Hesseltine, C.W. 1965. "A millennium of fungi food and fermentation." Mycologia 57 : 1-148.

33. Hodgin, D.C.; J.Pichworth; J.H.Roberton; K.N.Trueblood; R.J. Prosen; J.G. White; R. Bonnet; J.R. Cannon; A.W. Johnson; I.Sutherland; A.R. Todd and E.L. Smith.1955, Nature 176 : 325. Cited in Rainbow, C. and A.H. Rose. 1963 , Biochemistry of industrial microorganism . Acedimic Press, Inc., London and New York.

34. Hoogerheide, J.C. 1954, " Production of vitamin B_{12} by Agrobacterium radiobactor" U.S.Patent 2,798,840. July 9, 1957.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35. Holffmann, H.; W. Hardwick and R. Seeley 1961. " Use of precusors " U.S.Patent 3,013,948. Dec.19, 1961, In : Noyes,R.,1969. Vitamin B_{12} manufacture.Noyes Development Corp. New Jersey.

36. Kucheras, A.G. 1972."Effect of amino acids on cobalamide synthetic activity of Propionibacterium shermanii" R.V. Biochem. microbial , 8 : 341-346 . Abstract in Microbial Abstracts 7A:784.

37. Levin, A. and H.B. Funk and Tendler. 1954. " Vitamin B_{12} production by certain species of Rhizobiaceae. " Science. 120:784.

38. Leviton , A and R.E. Hargrove . 1952 . " Microbiological synthesis of vitamin B_{12} by propionic acid bacteria " Ind.Eng.chem. 44:2651-2655.

39. Lewis,J.C.; K.Ijichi; N.S.Snell and J.A.Garibaldi.1949, " Fermentation process for production of vitamin B_{12}" U.S.Dept. Agr., Bur.Agr. and Ind. chem., Mineographed Cire. Ser., AIC 254. Cited in Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959, Industrial microbiology.Mc Graw-Hill Book Co., Inc., Newyork, Toronto and London.

40. Lim, P.G. 1968. Glycine Additive. U.S.Patent 3, 411,991; November 19, 1968. In ; Noyes, R., 1969, Vitamin B_{12} manufacture. Noyes Development Corp, New Jersey.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

41. Manothirawat , N. 1973 , " Factor affecting vitamin B_{12} production by Bacillus megaterium(ATCC 13639)in waste water" Bangkok; M.S. Thesis, Kasetsart University.

42. Marco, A. di and C. Spalla. 1956 ," Process of producing cobalamins by fermentation dulture media with Norcadia rugosa" U.S. Patent 2,886,490. May 12, 1959.

43. Masao Yamamoto, Rokuro Okamoto, Taiji Inui." Application of a Marine-ultilizing Bacteria for Bioassay of vitamin B_{12} in sea water " Central Research laboratories , Sanrako Ocean Co.,Ltd.,Fujisawa 251.

44. Meyer, C., F. and W.H. de Vries. 1949 , "Preparation of vitamin B_{12} concentrates from Streptomyces griseus cultures" U.S. Patent 2,5958,159. Apr.29,1952.

45. Milner , M.1966 , General outlook for seed protein concentrates , P.52-59 In : Gould R.F. 1966 , World protein resources . Adv. in chem . Series. American chemical Social, Washington D.C.

46. Minot G.R. and W.P. Murphy. 1926. J.Am.Med. Assoc.87,470 cited in Sebrell, W.H. Jr. and R.S. Harris. 1968, The vitamins chemistry, physiology, pathology, methods. Acadimic Press,Inc., New York and London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47. Naomichi Nichio, Mitsuo Tanaka, Ryuichi Matsunu, Tadashi Kamikudo. " Production of vitamin B_{12} by Methanol - utilizing Bacteria , Pseudomonas AM-1 & Microcyclus eburneus" Department of Fermentation Technology , Faculty of Engineering , Hiroshima University , Hiroshima.

48. Napavarn Manothirawat." Factor affecting vitamin B_{12} production by Bacillus megaterium (ATCC 13639) in waste water " Thesis Mahidol University, 1973.

49. Neuberger, H.; R.Bray and J.B.Armitage.1963. Vitamin B_{12} (Cyanocobalamin).In Recent advances in bio-chemistry. Churchill Corp., London.

50. Noboru Hosoi, Chiharu Ozaki, Yutaka Kitamoto, Yoshio Ichikawa . "Purification and Properties of aldehyde dehydrogenase (acylating) from Propionibacterium freudenreichii"Faculty of Agriculture,Tottori University, Koyoma, Tottori 680.

51. Norris,J.R. and D.W.Ribbons.1971,Methods in Microbiology vol.5B. Acadimic press. New York.

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

53. Ohmori, H. , 1974, Studies on the biochemical role of vitamin B_{12} in photosynthetic bacteria. Tokyo : Ph.D. Thesis, Tokyo University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

54. Osman,H.G. and M.S.Chhenouda.68,"Biosynthesis of vitamin B_{12} by Propionibacterium shermanii III.Effect of some minerals , surface active agents and biochemical inhibitors on the biosynthesis of vitamin B_{12}"J.Chem. URA,11,363-371 (Nat.Res.centre cairo,URA) Abstract in microbial. Abstract Section A Industrial Microbiology.

55. Pagano, J.F. and G.Greenspan. 1954, U.S.Patent 2,695,864. Cited in Sebrel , W.H. Jr. and R.S. Harris. 1968, The vitamins chemistry, physiology, pathologym, methods. Academic Press, Inc. New York.

56. Peppler,H.J. 1967,Microbial Technology,Reinhold Publishing cororation.

57. Perlman, D.;J.B. Semar and W.B. Frazier.1960, Abst.138th Meeting Amer. chem. Soc. P.10 A.Cited in Rainbow , C. and A.H. Rose.1963. Biochemistry of industry microorganisms. Acadimic Press, Inc., London and New York.

58. Perlman , D. 1964 , Metal organic compounds. Adv. Appl. Microbial. 4:108-112.

59. Peterson , A. and H. Pope . 1952 , A comparison of the biosynthesis of vitamins and amino acids by Mycobacterium tuberculosis and its streptomycin resistant variant. J.Bact , 64:25.

60. Petty, M.A. 1948, Animal nutrition,U.S.Patent 2,515,135. July 11, 1950.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

62. Rainbow,C. and A.H. Rose.1963,Biochemistry of industrial microorganisms. Academic Press , Inc. , London and New York.

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

64. Rickes, E.L. ; N.G. Brink; F.R. Koniuszy; T.R. Wood and K.Falkers.1984, Crystalline vitamin B_{12}, Science. 107 : 396-397.

65. Rudy, H.; J.Rauch; K.R. Diietrich and C.Constabel. 1963 , Citric acid mycelium. U.S.Patent 3,085,049 ; April 9, 1964. In : Noyes, R., 969, Vitamin B_{12} manufacture , Noyes Development Corp, New Jersy.

66. Sebrell , W.H. Jr. and R.S. Harris. 1968 , The vitamins chemistry, physiology, pathology, methods . Academic Press, Inc., New York and london.

67. Smith, A.K.; A.M. Nash; A.C. Eldridge and W.J. Woff.1962. " Recovery of soybean whey proteins with edible gums and detergents."J. Agr. Food Chem. 10 : 302.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

68. Shorb , M.S. and G.M. Briggs . 1948 . " The effect of disscociation in Lactobacillus lactis culture on the requirement for vitamin B_{12}" J. Biol. Chem.176 : 1463.

69. Speedie, J.D.and G.W. Hall.1960," Vitamin B_{12} production by Propionibacterium shermanii" U.S.Patent 2,951,317. July 15,1963.

70. Sudasky. J.M. and R.A. Fisher . 1954 . " Improvement in production vitamin B_{12} produced by Propionibacterium freudenreichii " U.S.Patent 2.816,856. Dec.17,1957.

71. Tanner, F.W. Jr. 1958 , " Process for the production of cobalamins " U.S.Patent. 2,921,887. Jan.19,1960.

72. Toraya, T.B. Youngsmith, S.Honda ; A.Tanaka and S.Fukui. 1976. " Production of vitamin B_{12} from methanol-utilizing bacterium " J, Ferm. Tech. 54(2) : 102-108.

73. Vries, Wytske De; W.C. Wilhelmina van Wijek-kapkeijn and A.H. Stou thamer.1972, "Influence of oxygen on growth cytochromesynthesis and fermentation pattern in propionic acid bacteria" J. Gen. Microbial.Appl.Microbial. 17 : 648-649.

74. Willium, R.T. 1955 , The biochemistry of vitamin B_{12} Cambridge University Press.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

76. Zodrow, O.S. and W.Kaczmarck.1967, "Effect of incubation temperature on the content of different corrinoids in the cells of P. shermanii" Acta Microbial polon., 16, 223-226. Abstract in Microbial. Abstract 3.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้