สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาผลของปัจจัยต่อการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

นางสาวจารุวรรณ วงศ์วรกุลกิจ
นายเทอดไทย เอกา

2/ww
จ337ก
2537
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

b12548777

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2537

A study of Factor Efficiency to Vitamim B12 Production from Waste Water of Livestock Chicken Factory by Propionibacterium freudenreichii

Miss Jaruwan Wongworakunkit

Mr. Thoetthai Eaka

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

1994

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาผลของปัจจัยต่อการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii
โดย	นางสาวจารุวรรณ วงศ์วรกุลกิจ
	นายเทอดไทย เอกา
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

(อาจารย์อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร.เรียม เตชะโสภณมณี) กรรมการ

(รศ.สุขใจ ชูจันทร์) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาผลของปัจจัยต่อการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

โดย นายเทอดไทย เอกา
นางสาวจารุวรรณ วงศ์วรกุลกิจ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2537

บทคัดย่อ

การผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ที่เจริญในอาหารที่เป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไก่สดก่อนเข้าสู่ระบบบำบัด เปรียบเทียบกับการใช้ complete medium จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสม ใน complete medium คือ พีเอช เริ่มต้น เป็น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ในรูปของ O.D. ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ในสภาพ stationary flask เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ ส่วน ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไก่สด พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือสภาวะที่มีการเติม $CoSO_4 . 7H_2O$ ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซนต์ และ ยีสต์สกัด ที่ 5 เปอร์เซนต์ และนอกจากนี้ยังพบว่ามีการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii สูงกว่าใน complete medium อย่างไรก็ดีจากการตรวจเอกสารพบว่าการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii มีความสัมพันธ์กับการผลิตวิตามินบี 12

Special Project Title	A Study of Factor Efficiency to Vitamin B_{12} Production from Waste Water of Chicken Livestock Factory by Propionibacterium freudenreichii
Name	Mr Thoetthai Eaka Miss Jaruwan Wongworakunkit
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojan
Department	Applied Biology
Acedemic Year	1994

Abstract

Waste water from Chicken Livestock can productions was studied for cultivation of Propionibacterium freudenreichii for growth and vitamin B_{12} production. Optimization of growth condition was studied using complete medium. Maximal growth and growth yield, under condition of stationary flask were obtained when initial pH of medium was 7.0, temperature 30°C, initial O.D 0.5 at 660 nm.

Growth and vitamin B_{12} production experiments were performed using waste water supplemented with various chemicals.The results revealed that 2 milligrams per litre of $CoSO_4.7H_2O$ as cobalt source, glucose and yeast extract at 1.5 and 5 percent,respectively were the best for growth when compared with complete medium

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ ถ้าไม่ได้รับความอนุเคราะห์ ความร่วมมือและความช่วยเหลือของบุคคลดังต่อไปนี้

1. รศ.สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำและความรู้ซึ่งเป็นแนวทางสำหรับแก้ไขปัญหาต่างๆ ในโครงงานพิเศษ ตลอดจนอำนวยความสะดวก และให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ดำเนินโครงงานพิเศษจนสำเร็จ

2. ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต และ ดร.เรียม เตชะโสภณมณี ผู้ซึ่งให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาจุดบกพร่องต่างๆ ในโครงงานพิเศษ

3. บริษัทไก่สด ซี.พี. จำกัด ที่อนุเคราะห์น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตไก่สด

4. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

5. เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน

6. เพื่อนๆ น้องๆทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ ช่วยเหลือในการดำเนินโครงงานพิเศษ

จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2538

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
ลักษณะ รูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii	4
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii	12
อาหาร	12
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12	13
การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	15
การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์	23
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	30
ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) และน้ำหนักแห้งของเชื้อ (dry weight cell)	30
ผลการศึกษาอัตราการเจริญ (growth rate) และปริมาณเซลสูงสุด (maximum yield) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ และน้ำทิ้งเติมสารอาหารต่างๆ	30
ผลการเปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส	30
ผลการเปรียบเทียบปริมาณของ Yeast extract	30
ผลการเปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	38
ภาคผนวก	39
ภาคผนวก ก : อาหารเลี้ยงเชื้อ	39
ภาคผนวก ข : ตารางแสดงผลการทดลอง	41
ภาคผนวก ค : รูปประกอบการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง	53

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 propionic acid bacteria	8
2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่นๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria	8
2.3 แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria	9
2.4 แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria	9
2.5 แสดงกระบวนการและอาหารที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ในอุตสาหกรรม	22
ข.1 แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.0 เปอร์เซนต์ ใน complete medium	41
ข.2 แสดงผลระหว่างค่าความขุ่น (O.D) และน้ำหนักแห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium	42
ข.3 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลกลูโคสและยีสต์สกัดที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ เปรียบเทียบกับ complete medium	43
ข.4 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์	44
ข.5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของยีสต์สกัดในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudeneichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์	45
ข.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์	46

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการ dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย propionic acid bacteria	5
2.2	แสดง ribofalvin เป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12	14
2.3	Structure of vitamin B12 and related compounds	16
2.4	แสดงสมมติฐานของ biosynthesis pathway	17
2.5	แสดงการสังเคราะห์ corrin ring	18
4.1	แสดงการเจริญของ เชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ สภาวะ stationary flask	32
4.2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซล กับค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	33
4.3	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตางกลูโคสและยีสต์สกัดที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ เปรียบเทียบกับ complete medium สภาวะ stationary flask	34
4.4	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตางกลูโคสในปริมาณต่างๆ ที่มีต่อ การเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน น้ำทิ้งไก่ที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ สภาวะ stationary flask	35
4.5	แสดงผลการศึกษาอิทธิพล ของ yeast extract ในปริมาณต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ สภาวะ stationary flask	36
4.6	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ โคบอลท์ ในปริมาณต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ที่เติม น้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ สภาวะ stationary flask	37
ค.1	เปรียบเทียบน้ำทิ้งไก่ ก่อนกรอง และหลังกรอง	47
ค.2	ก แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium สภาวะ stationary flask ที่ 0 ชั่วโมง ข แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium สภาวะ stationary flask ที่ 96 ชั่วโมง	48

ค 3 ก แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน MRS agar ที่ 0 ชั่วโมง
ข แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน MRS agar ที่ 96 ชั่วโมง 49
ค.4 แสดง spectophotometer รุ่น UNICAM 8620 UV/VIS spectometer 50
ค.5 แสดงผลึกวิตามินบี 12 51

บทที่ 1
บทนำ

วิตามินบี 12 หรือ ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamin) เป็นวิตามินที่เป็นต้นกำเนิดของโคเอนไซม์บี 12 หรือ methylcobalamin ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกรดโฟลิค (folic acid) ซึ่งส่วนใหญ่มักอยู่ในรูป methyltratahydrofolate ให้เป็นสารอื่นๆที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้โคเอนไซม์บี12 ยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน methylmalonyl CoA ให้เป็น Succinyl CoA และพบว่าถ้าร่างกายขาดหรือไม่สามารถดูดซึมวิตามินบี 12 ได้ จะเป็นโรคโลหิตจางรุนแรงถึงเสียชีวิตที่เรียกว่า Pernicious anemia ผู้ป่วยจะมีอาการผิดปกติทางประสาท ร่วมกับความผิดปกติในการสังเคราะห์เม็ดเลือดแดง จากความสำคัญของวิตามินบี12 ดังกล่าวข้างต้น วิตามินบี 12 จึงเป็นที่ต้องการสูงมากในทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์

ในปัจจุบันการผลิตวิตามินบี 12 ในรูปที่ร่างกายสามารถนำมาใช้ได้ ได้มาจากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์เท่านั้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้แก่ แบคทีเรีย โดยเฉพาะ Propionibacterium freudenreichii และเมื่อพิจารณาประกอบกับสภาพอุตสาหกรรมในประเทศไทย พบว่าโดยส่วนใหญ่เป็นอุตสหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้ มีปริมาณสูงมาก ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่เมื่อพิจารณาในด้านความสมบูรณ์ของแหล่งอาหารจากน้ำทิ้งเหล่านี้ พบว่ามีความเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตวิตามินบี 12 เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์ ทั้งนี้ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งเพื่อช่วยลดปัญหามลภาวะของสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เหตุจูงใจในการทำโครงงานพิเศษ

1. วิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์เท่านั้น และปัจจุบันความต้องการวิตามินบี 12 ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์สูงมาก

2. เพื่อเป็นการนำน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเป็นการลดปัญหามลภาวะ

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ บริเวณน้ำทิ้งรวมของโรงงานก่อนที่จะนำไปบำบัด

วิธีการดำเนินงานโดยย่อ

การดำเนินการโครงงานพิเศษ แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่

ขั้นที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii

ขั้นที่ 3 การวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และจัดทำรายงาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับวิตามินบี 12 ต่อไป
2. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา เพื่อขยายขนาดให้เป็นการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรม
3. เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์
4. เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ให้สอดคล้องกับความต้องการในประเทศไทย

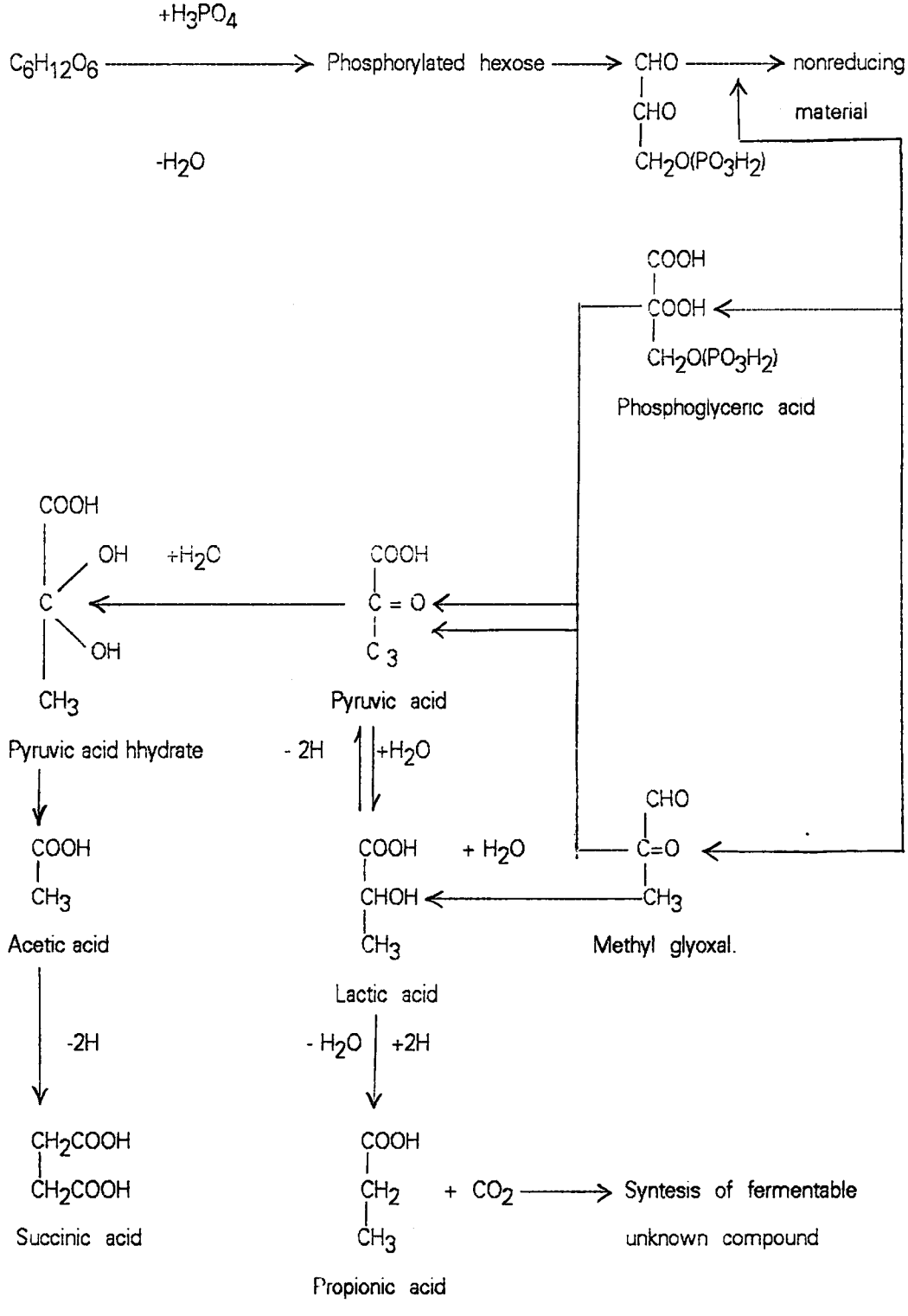
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. การศึกษาลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.

Propionibacterium freudenreichii (13) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่แยกได้จาก นมดิบ , ผลิตภัณฑ์นม และSwiss cheese เชื้อเจริญในสภาวะไร้อากาศ จะมีรูปร่างกลม และขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน มักอยู่เป็นคู่หรือสายสั้นๆ ส่วนการเจริญในสภาวะที่มีอากาศ รูปร่างอาจเป็น club-shaped และ branched หรือเป็นท่อนยาวที่ไม่เคลื่อนที่ มี metacromatic granules ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างสปอร์ ให้ผลบวกกับ catalase test เจริญในสภาวะไร้อากาศจนถึงสามารถเจริญได้ในที่มีอากาศ สามารถหมักกรดแลคติก กรดไพรูวิก คาร์โบไฮเดรต และ โพลีแอลกอฮอล์ ได้กรดโพรพิโอนิค และกรดอะซิติค คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้จากกระบวนการหมักในสภาพไร้อากาศ หรือต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการพ่นอากาศลงไปในถังหมักการเลือกใช้ propionic acid bacteria ในกระบวนการหมักจะมีประโยชน์มาก เพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นกรด เนื่องจากมีกรดโพรพิโอนิกเกิดขึ้น ทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อน ซึ่งมักจะเกิดกับการหมักธรรมดา การที่สามารถลดปนเปื้อน และติดเชื้อได้นั้น เพราะว่าระหว่างที่หมักในสภาพ ไร้อากาศ นั้น calcium propionate ทำหน้าที่เป็น bacteriostatic หรือ fungistic แต่ไม่เป็นพิษกับ Propionibacterium (46)

Wood et al. (64) ได้แสดงการ dissimilation ของน้ำตากลกลูโคสโดย propionic acid bacteria ตามแผนภาพดังนี้ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แสดง Dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย Propionic acid bacteria

Hargrove และ Leviton (27) ได้ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ propionic acid bacteria ที่สำคัญ คือ Propionibacterium freudenreichii และจาก Propionibacterium shermanii เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysate of casein	10.0	กรัม
L-Tryptophan	0.2	กรัม
L-Cystine	0.4	กรัม
Asparagin	0.2	กรัม
Xathine	0.02	กรัม
Adenine ,guanine ,uracil	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	50.0	มิลลิลิตร
Buffer pH	6.8	

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตรปรับพีเอชให้เป็น 6.8 โดยใช้ NaOH ปรากฏว่าให้วิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และจาก Prop. shermanii 3 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณต่ำจากมาตรฐานที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการทดลองค้นคว้าต่อไป เพื่อให้ได้วิตามินบี 12 มากขึ้น โดยการปรับความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกแหล่งคาร์บอน, ไนโตรเจน และอื่น 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 โดยใช้กรดแลคติก 10 กรัม แทน dextrose 20 กรัม บ่มที่

30 องศาเซลเซียส 14 วัน ได้วิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii และ Prop. shermanii เป็น 100 และ 68 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ

3. ศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติก โดยใช้อาหาร basal medium ที่ประกอบด้วย skim milk 1 ส่วน, whey solids 1 ส่วน , น้ำ 2 ส่วน และ $CoCl_2.6H_2O$ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน จะได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.1

4. ศึกษาอิทธิพลแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ การใช้อาหารประเภท rich medium ทำให้ได้สภาพที่เหมาะสม เป็นผลให้การหมักเกิดได้รวดเร็ว อาหาร basal medium ที่ใช้ N-Z amine type A (enzymatic digest of casein: Sheffield Farms, Inc .) 1 เปอร์เซนต์, yeast extract (Difco) 0.3 เปอร์เซนต์, $CoCl_2.6H_2O$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้ได้ใช้กรดแลคติกที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2 เปอร์เซนต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี12 คือ 1.5-2 เปอร์เซนต์ ซึ่งได้วิตามินบี 12 สูงถึง 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.2

5. ศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้อาหาร basal medium ซึ่งประกอบด้วย N - Z amine 1 เปอร์เซนต์ , yeast extract 0.3 เปอร์เซนต์ , sodium lactate 1 เปอร์เซนต์ และ $CoCl_2.6H_2O$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตรเติมเชื้อ Prop. freudenreichii บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน ปรับพีเอชทุกวัน ดังสภาพในตารางที่ 2.3 ปรากฏว่าสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อยได้วิตามินบี 12 มากที่สุด

6. อิทธิพลของ nitrogenous compound ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ yeast extract และ beef extract เป็นแหล่งวิตามิน และปัจจัยอื่น ๆ ที่จุลินทรีย์ต้องการอาหารที่ใช้เตรียม ดังตารางที่ 2.4 เติม $CoCl_2.6H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้กล้าเชื้อของเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 3 วัน 5 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชเท่ากับ7 บ่มเป็นเวลา 5 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.4 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ proteinaceous material เพิ่มขึ้น จะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น

ตารางที่ 2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	กล้าเชื้อ	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 (51 หน้า 139)

ตารางที่ 2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	percent lactate	กล้าเชื้อ	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 : (51 หน้า 139)

ตารางที่ 2.3 แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	สภาวะ	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	ไร้อากาศ	560
2	มีอากาศเล็กน้อย	800
3	มีอากาศ	23

ที่มา : (51 หน้า 139)

ตารางที่ 2.4 แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เปอร์เซนต์วิตามิน B_{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	-	0.3	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

ที่มา : (51 หน้า 139)

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่เติมสารนั้น

Sudasky และ Fischer (59) ได้ทำการผลิตวิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii โดยใช้ molasses เป็นแหล่งคาร์บอน และ waste brewer's yeast เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ครั้ง

ก ใช้ liquid waste brewer's yeast ใหม่ ๆ ในปริมาณ 6,000 แกลลอน ซึ่งมีส่วนที่เป็นของแข็ง 12.2 เปอร์เซนต์ แยกออกโดยใช้ที่กรองขนาด 100 mesh ได้เซลล์ยีสต์ 5,975 แกลลอน ให้

ความร้อน 44 องศาเซลเซียส และเก็บโดยการกวนอย่างช้า ๆ 10 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด autolysis จึงนำไปกรองผ่าน yeast separators จะได้ yeast autolysate ประมาณ 4,000 แกลลอน ประกอบด้วยของแข็ง 6 เปอร์เซนต์ นำไปผสมกับ beet molasses 8,000 แกลลอน และปรับปริมาตรเป็น 10,200 แกลลอน ปรับพีเอชเป็น 5.1 โดยเติม H_2SO_4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับ พีเอช ให้เป็น 7.0 โดยการเติม aqua ammonia แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 600 แกลลอน ลงไป และหมักต่อไป 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยการกวนอย่างช้า ๆ ปรับพีเอชให้เป็นระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7.0 ได้วิตามินบี 12 เป็น 17 มิลลิกรัมต่อแกลลอน

ข. ใช้ soluble autolyzed brewer's yeast extract ที่แห้ง เช่น yeastamin (Vico Product Company) และ beet molassas 120 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 5.0 โดยใช้ H_2SO_4 และเติม invertase 5 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ sucrose ใน beet molasses แตกตัวปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วย aqua ammonia ใช้ USP precipitated chalk 40 กรัม เติมลงไปเพื่อเป็น buffer เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร ทดลองในถังหมัก ขนาด 4 ลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ประมาณ 100 มิลลิลิตร หมักต่อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้า ๆ ได้วิตามินบี 12 เป็น 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hoffman et al.(30) ได้ทดลองใช้ Propionibacterium shermanii (select PS-B_1) เลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย molasses ที่มี dextrose 4 เปอร์เซนต์, corn steep liquor 8 เปอร์เซนต์ เติม dimethyl-benzimidazole 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดลองในถังหมัก ปรับพีเอชให้เป็น 6.5 ด้วย NH_4OH แล้วถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ หมักเป็นเวลา 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้วิตามินบี 12 เป็น 25.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง 143 กรัม หรือ 176.22 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

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

Becher et al. (11) ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Propionibacterium shermanii strain 33 หรือ ATCC 13673 ใช้อาหารที่ประกอบด้วย

glucose	10.0	กรัม
nitrogen in the form of a casien proteolyzate	1.5	กรัม
nitrogen in the form of a casienacid hydrolyzate	1.0	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม
K_3PO_4	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

ใช้กล้าเชื้อ10 เปอร์เซนต์ อายุ 3-5 วัน ทดลองที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ปรับพีเอช แต่ละวันเป็น 6.6 เมื่อปริมาณน้ำตาลลดต่ำลงกว่า 0.5 เปอร์เซนต์ เติมน้ำตาลกลูโคสที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว แต่ละวันเพื่อให้ความเข้มข้นเป็น 1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก รักษาระดับนี้ไว้ 10 วัน ในวันที่ 5 ของการทดลองเติม 5,6 dimethyl benzimidazole ในสารละลายอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ในปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงไปได้ 12 วัน ได้วิตามินบี 12 เป็น 18.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

Rudyet al.(55) ได้ทดลองใช้เส้นใยของ Aspergillus niger ที่ได้จากการผลิต citric acid โดยเติมเส้นใยกับ molasses ลงไปในถังหมัก เพื่อเลี้ยงเชื้อ Prop. shermanii พบว่าได้วิตามินบี 12 เป็น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากหมักไป 96 ชั่วโมง ต่อมาเมื่อมีการเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และเกลือโคบอลท์ พบว่าได้วิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นเป็น 2.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Lim (35) ได้ทดลองเพื่อศึกษาว่า กรดอะมิโนตัวใดที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii (ATCC 6207) โดยใช้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เช่น alanine, leucine, isoleucine, tyrosine, methionine, glutamic acid และอื่น ๆ ปรากฏว่า glycine ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 จึงทดลองเลี้ยง 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 0, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.30 ส่วน ได้วิตามินบี 12 เป็น 13.1, 15.6, 16.8, 23 และ 22 มิลลิกรัมต่อลิตร

Renz และ Wey henmeyer (53) ศึกษาการสังเคราะห์ dimethyl benzimidazole (5,6-DMBIA) จากวิตามินบี 2 (riboflavin) โดยใช้เชื้อ Prop. shermanii strian 33 ใช้แบคทีเรียอายุ 3 วัน ซึ่งมีน้ำหนักเปียก 0.35 กรัม ละลายใน phosphate buffer เข้มข้น 0.07 M พีเอช 7.0 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม 1-^{14}C - riboflavin ลงไปประมาณ 5 มิลลิกรัม นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 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

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium ssp.

2.1 อาหาร

แหล่งคาร์บอน มีหลายประเภทคือ ประเภทที่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น dextrose, maltose, xylose, invert sugar ,corn syrup , lactose ,sucrose , beet , cane molasses และ แป้ง และประเภทที่เป็นสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่นกรดแลคติก กรดกลูโคนิก กรดซิตริก และ glyceral โดยต้องใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณ 5-10 เปอร์เซนต์ (10)

จากการศึกษาของ Osman (48) พบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เหมาะสำหรับการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii ส่วน Hargrove และ Leviton (27) ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งอาจได้จากการเติมลงไปในอาหาร หรือได้จากขบวนการการหมักของน้ำตาลแลคโตสในนมโดย Lactobacillus casei ที่เจริญร่วมกับ Propionibacterium spp.

Speedie และ Hull (58) ศึกษาขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium โดยใช้วิธีการแบบ batch process พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคส หรือ แลคโตสซึ่งนิยมใช้ความเข้มข้น 8-10 เปอร์เซนต์

แหล่งไนโตรเจน เป็นพวกกรดอะมิโน หรือโปรตีนจากถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวโพด เนื้อสัตว์ 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 (48) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ จากเกลือแอมโมเนีย พบว่า แอมโมเนียมซิเตรท แอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii

Kucheras(31) ศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน จะได้วิตามินบี 12 น้อยกว่าที่ใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนบางอย่าง เช่น glycine, methionine, serine, glytamic, arginine และ alanine ช่วยเร่งการผลิตวิตามินบี 12 แต่ cysteine จะยับยั้งขบวนการนี้ Bulkin (14) ใช้ methionine ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 นอกจากนี้ยังพบว่า methionine ทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่ methyl

2.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12

สภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของ propionic acid bacteria อยู่ระหว่าง 6.8 - 7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 (52) จะต้องรักษาระดับพีเอชของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4 ถึง 9 (ที่เหมาะสม 6 - 7) เพราะพีเอช สูงหรือต่ำกว่านี้จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจาก cobalamin ไม่คงตัว หรือถูกทำลายได้ง่าย

อุณหภูมิ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในการหมัก ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่แบคทีเรียพวกนี้เจริญได้ดี (52) จึงเหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12 ด้วย Zodrow (65) ทดลองใช้อุณหภูมิต่าง ๆ ในการหมักโดยใช้เชื้อ Prop. shermanii พบว่าได้วิตามินบี 12 มากที่สุด ที่อุณหภูมิระหว่าง 18-21 องศาเซลเซียส

การให้อากาศ ศึกษาโดย Grant (22) ทดลองกับ Prop. freudenreichii ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมในการสร้างวิตามินบี 12 เมื่อถึงช่วงปลายของการหมัก อาหารจะขาดคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดเจริญได้จะต้องมีการให้อากาศ เพื่อให้เกิดฟองอากาศในอาหาร วิธีที่นิยมใช้คือการกวน และปรับพีเอชของอาหารให้สูงขึ้น จะช่วยเพิ่มปริมาณของวิตามินบี 12 ได้ด้วย

สภาวะไร้อากาศ (64) ทำได้โดยการผ่าน non-oxidizing gas เช่น ไนโตรเจน หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในอาหาร หรือ รักษาระดับแก๊ซเหนืออาหารให้สภาวะนี้ไม่ต้องกวน เพราะจะเป็นการนำออกซิเจนลงไปในอาหาร ต่อมาใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้นช่วยรักษาสภาพไร้อากาศ ของอาหารในการหมักธรรมดา ระยะเวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารสัมผัสกับอากาศ 70-80 ชั่วโมง ในระหว่างการหมักจะเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 มากแม้ว่าจะให้ออกซิเจนเพียง 24-50 ชั่วโมง เท่านั้น ก็ช่วยเพิ่มผลผลิต สภาวะไร้อากาศนิยมทำในช่วงมากกว่าครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ในการหมักเล็กน้อย เมื่ออาหารสัมผัสกับออกซิเจนเป็นการทำให้อยู่ในสภาพมีอากาศเพียงเล็กน้อย มากกว่าสภาวะที่มีอากาศ เพราะถ้าให้ออกซิเจนมากเกินไป จะทำให้ผลผลิตของ cobalamin น้อยลง

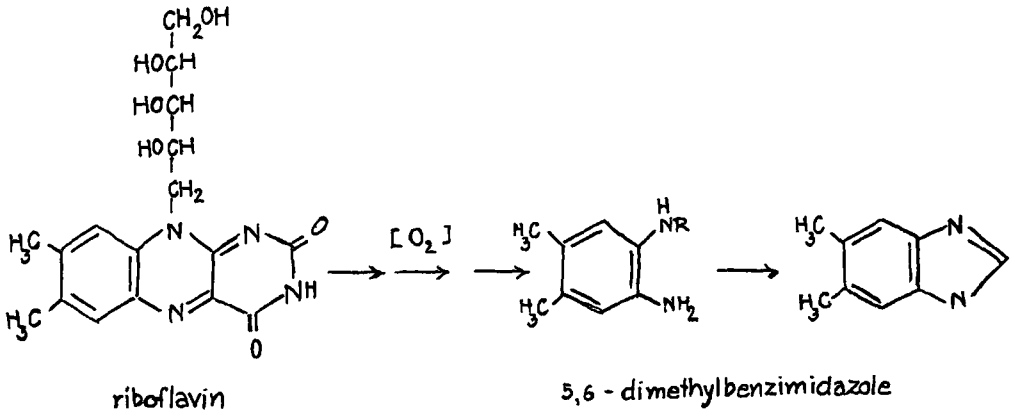
Batch process (58) ขบวนการผลิต cobalamin โดยเริ่มด้วยหมักอาหารเหลวด้วยเชื้อ Propionibacterium เป็นแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบี 12 ในสภาพไร้อากาศ และหลังจากนั้นให้อาหารสัมผัสกับออกซิเจน และเก็บเกี่ยววิตามินบี 12 ได้จากอาหารที่ใช้หมักใน batch culture อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของการหมัก เช่น องค์ประกอบของอาหาร อายุ และ ขนาดของกล้าเชื้อ อุณหภูมิ พีเอช และสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

Continuous process (58) การหมักแบ่งเป็น 2 ตอน ระยะแรกหมักในสภาพไร้อากาศ เรียกว่าตอนที่ 1 ระหว่างนี้จะมีการเติมสารอาหารลงไปจะหมักต่อไปถึงตอนที่ 2 ระยะนี้อาหารสัมผัสกับอากาศและเติมอาหารลงไปอีก อัตราในการเติมอาหารลงไปในตอนที่ 1 และ ที่ 2 จะต้องมีปริมาตร และความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งการผลิตวิตามินบี 12 จะเกิดขึ้นในการหมักตอนที่ 2

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ โคบอลท์ ไซยาไนด์ เหล็ก และแมกนีเซียม การเติมโคบอลท์ลงในอาหารเพื่อไปเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 แต่ถ้ามีโคบอลท์ในปริมาณที่สูงกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นพิษกับจุลินทรีย์ และมีผลต่อการสร้างวิตามินบี 12 อาจใช้โคบอลท์ในรูปของเกลือที่ละลายในน้ำได้ เช่น cobalt chloride, sulfate, nitrate หรือเกลือโคบอลท์อื่น ๆ (10) ไซยาไนด์ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารจะต้องเติมลงในปริมาณที่พอเหมาะ ไม่เกิน 0.1-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ไซยาไนด์ จะเติมในรูปของ ammonium cyanide, metal, alkali metal และ alkaline earth, metal cyanides, ferrocyanides, ferricyanidases หรือในรูป sodium, potassium, barium, calcium, strontium และรูปอื่น ๆ หรือในรูปของเหลว และแก๊ซ เช่น hydrocyanic acid, hydrogen cyanide (10)

เหล็ก (Fe) มีความสำคัญต่อการเจริญ และผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii ส่วนแมกนีเซียมมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ทองแดง (Cu) และบิสมัท (Bi) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ธาตุอื่น ๆ นอกจากที่กล่าวมาแล้วไม่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ขณะที่ผงซักฟอกจะยับยั้งการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งขบวนการ เมตาบอไลท์ ของจุลินทรีย์จะยับยั้งการเจริญ และการสร้างวิตามินบี 12 ของProp. shermanii (53)

วิตามินสำคัญที่ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 คือ วิตามินบี 2 จากการค้นคว้าของ Renz (53) พบว่าสามารถใช้วิตามินบี 2 แทน 5,6-dimethylbenzimidazole ซึ่งเป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12 Prop. shermanii สามารถเปลี่ยนวิตามินบี 2 เป็น 5,6-dimethylbenzimidazole ได้ มี วิถีดังรูปที่ 2.2 ต่อมา Renz และ Weyhenmeyer (53) สามารถสังเคราะห์ 5,6 - dimethylbenzimidazole ได้จากวิตามินบี 2 โดยเชื้อ Prop. shermanii strain 33



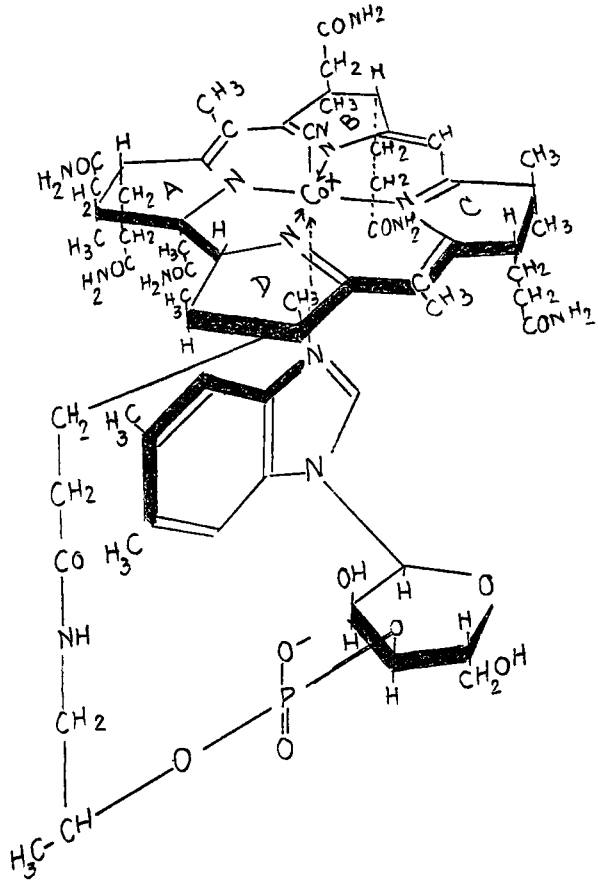
รูปที่ 2.2 แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญ

Baron (10) พบว่าเมื่อเติม thickening agent ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารนั้นโดยไม่ต้องมีการกวน และมีประโยชน์มากในแง่การเจริญ และ activity ของเซลในสภาพนี้ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นและได้ cobalamin เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ thickening agent ที่เติมลงไปทำให้แบคทีเรียมีความทนทาน หรือสามารถปรับตัวให้ทนต่อสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าสภาพธรรมดา เช่น การหมักในสภาพที่มี thickening agent จุลินทรีย์ทนต่อโคบอลท์และไซยาไนด์ออนได้ดีกว่าในสภาพปกติ จึงช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 และสามารถใช้ thickening agent เพื่อให้ได้สภาพที่มีอากาศเล็กน้อย และการเพิ่มความหนืดทำให้อาหารกลายเป็นกึ่งของแข็ง - กึ่งของเหลว ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ตกไปอยู่ที่ก้นภาชนะ thickening agent ที่ใช้ได้แก่ วุ้นมีความเข้มข้นในช่วง 0.1-2.0 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก corn strach ความเข้มข้น 1.0-10.0 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมี thickening agent อื่น ๆ ที่ใช้ได้ คือ methyl cellulose, carboxymethyl cellulose, carragenin, pectin, sodium alginate, gum tragacanth, polyvinyl pyrrolidone

3. การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1926 Minot และ Murphy (40) รายงานว่า ตับมีสารที่สามารถรักษาโรค pernicious anemia ได้ และสารนี้ถูกสกัดครั้งแรกออกจากตับในปี 1948 โดย Rickes et al. (54) และ Smith (73) สารนี้มีชื่อว่า วิตามินบี 12 ละลายน้ำได้ มีโมเลกุลใหญ่ น้ำหนัก 1350 เป็นผลึกรูปเข็มหรือปริมซึม สีแดงเข้ม สูตรเคมีคือ $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ (56) มีโครงสร้างสลับซับซ้อนยากแก่การศึกษา แต่Hodgin et al. (28) ก็ได้พยายามศึกษาต่อมา และในที่สุดก็เสนอสูตรโครงสร้างวิตามินบี12 ได้สำเร็จโดยใช้วิธี x-ray diffraction technique ช่วย ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าถูกต้อง

โมเลกุลของวิตามินบี 12 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ planar group และ nucleotide group ส่วนที่เป็น planar group เป็นส่วนกลางของโครงสร้าง เรียกว่า corrin ring ฉะนั้นสารประกอบวิตามินบี 12 เรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่า corrinoid ส่วนที่เป็น nucleotide group(benzimidazole ring) ซึ่งส่วนนี้จะตั้งอยู่ในแนวเกือบตั้งฉากกับ planar group โดยมีโคบอลท์เป็นแกนกลางเชื่อมกับ tetrapyrrole (corrin) ring (51,62) การเรียกชื่อสารนี้ขึ้นกับสูตรโครงสร้าง คำว่า cobalamin หมายถึงโมเลกุลของวิตามินบี 12 แต่ถ้าแกนของ planar group เป็นสารอื่น ก็มีวิธีการเรียกชื่อแตกต่างกันออกไป แสดงไว้ในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 Structure of vitamin B_{12} and related compounds

Triivial names and avvreviations are given in parentheses.

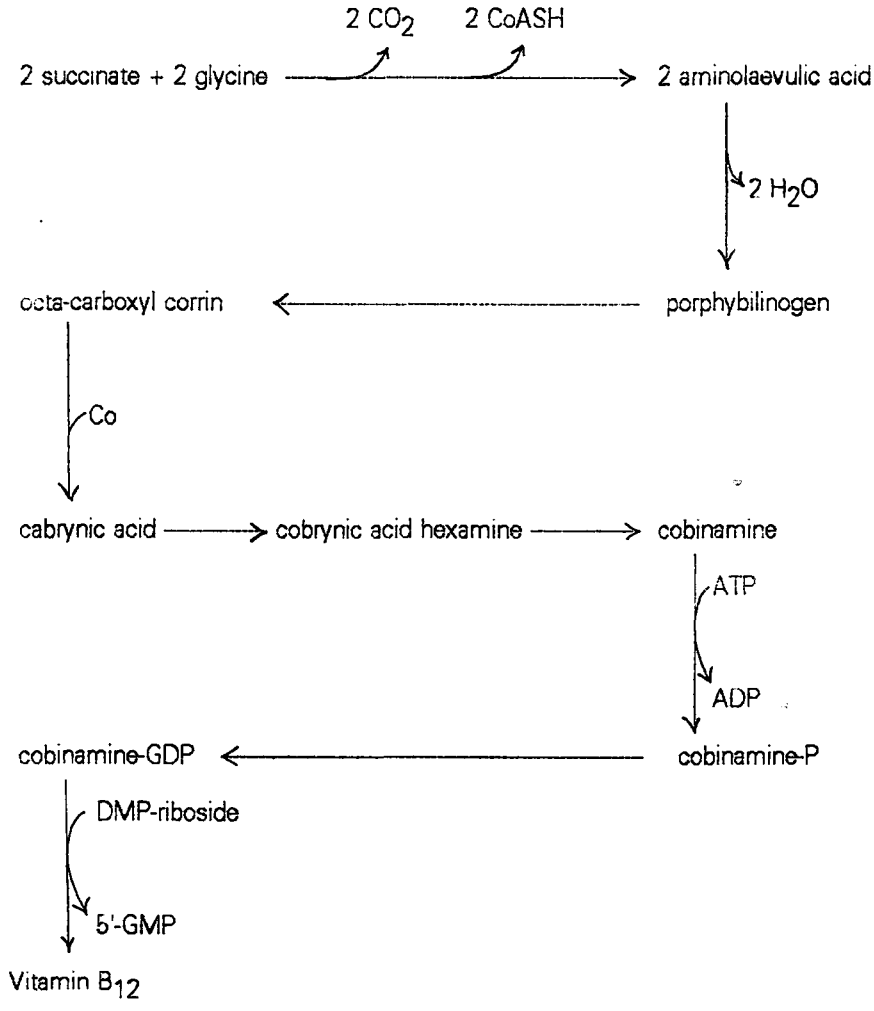
L = CN : 6 - (5,6-dimethylbenzimidazole) cobamide cyanide or cyanocobalamin (vitamin B_{12} : CNB_{12} ; cyano-B-12)

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

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

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

สมมติฐานวิถีการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางชีวภาพเสนอโดย Borett<u>i et al</u> (12) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงสมมติฐานของ biosynthesis วิถี ของวิตามินบี 12

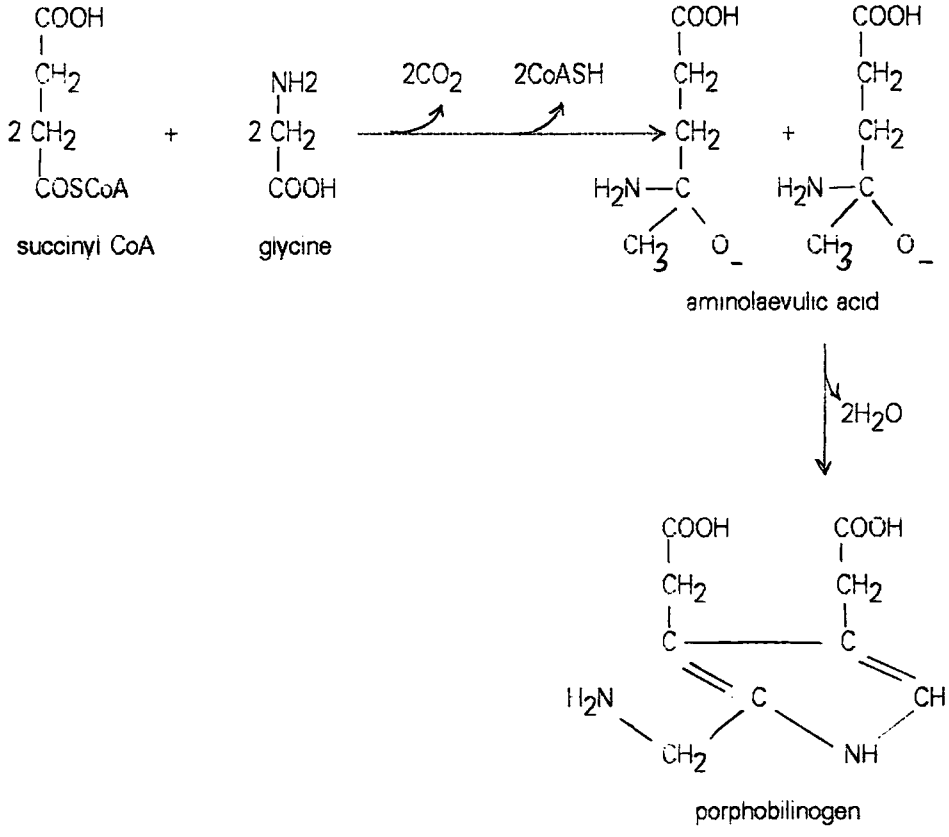
ADP = adenosine diphosphate ATP = adenosine triphosphate

GMP = guanosine monophosphate GTP = guanosine diphosphate

DMP-riboside = dimethylbenzimidazole-riboside

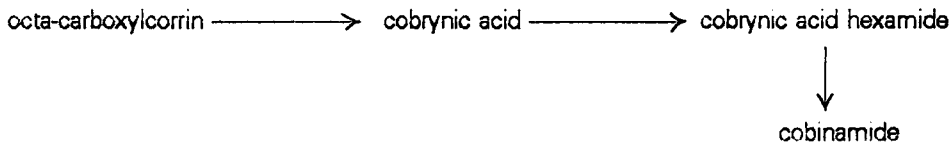
จากสมมติฐานวิถีสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางชีวภาพข้างบนนี้ สามารถแบ่งเป็น 4 ขั้น

1. Formation of the corrin ring . Neuberger et al. (43) แสดงให้เห็นว่า pyrrole ring เกิดจาก prophobilinogen และ prophobilinogen เปลี่ยนมาจาก succinate และ glycine ดังรูปที่ 2.5

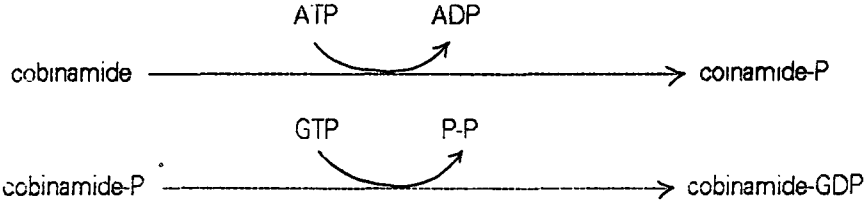


รูปที่ 2.5 แสดงการสังเคราะห์ corrin ring

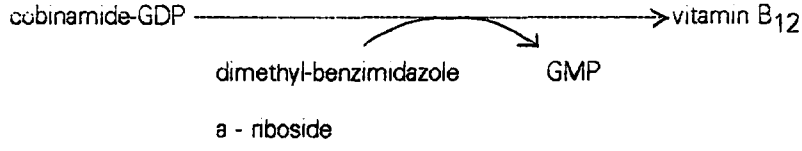
macroring อันดับแรกที่เกิดขึ้น คือ octacarboxylcorrin และจะเปลี่ยนต่อไปโดยการ methylation decarboxylation และ co-ordination ด้วยโคบอลท์ไปเป็น corynic acid และเปลี่ยนเป็น cobrynic acid hexamide และเปลี่ยนเป็น cobinamide ในที่สุด



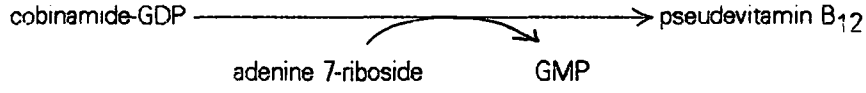
2 Incorporation of nucleotide residue Boretti et al. (18) กล่าวว่า cobinamide จะถูก activate ให้อยู่ในรูป cobinamide - GTP ซึ่งเป็น intermidiate ที่สำคัญใน biosynthesis ของวิตามินบี 12 ดังนี้



3. Formation of 5,6-dimethylbenzimideazole-riboside (DMR riboside) กลไกในการ form D-riboside linkage ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด



4. Formation of purine residue เป็นปฏิกิริยสุดท้ายของการสร้างวิตามินบี 12 หรือ vitamin B_{12} analogues



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

จุลินทรีย์สร้างวิตามินบี 12 ขึ้นภายในเซลและไม่ปล่อยออกมานอกเซล Perlman (63) พบว่าจุลินทรีย์สร้างวิตามินบี 12 ในรูปของ coenzyme ถึง 80 เปอร์เซนต์ และส่วนที่บริสุทธิ์ที่สุดที่เตรียมได้จากจุลินทรีย์มี cobinamide peptide อยู่ 23 เปอร์เซนต์ การสังเคราะห์ coenzyme B_{12} เกิดขึ้นเมื่อมีการเติม adenine nucleoside ให้กับวิตามินบี 12 แล้วจึงจะได้ coenzyme B_{12} ได้มีผู้สกัด coenzyme B_{12}จาก Propionibacterium shermanii และจาก Clostridium tetanomorphum ได้ cofactor ที่ใช้ในการสร้าง คือ glutathione, $NADH_2$, flavin, $MnCl_2$ และ ATP ใช้วิธี label 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 ของวิตามินบี 12 ก่อนที่จะสร้างเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์

จุลินทรีย์ที่ทราบว่าสามารถผลิตวิตามินบี 12 และสารที่มีกิจกรรมคล้ายกับวิตามินบี 12 ในปัจจุบันมี แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส(actinomycetes) ยีสต์ รา และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เช่น

แบคทีเรีย ได้แก่

Aerobacter aerogenes (52)
Agrobaccterium radiobacter (29)
Alcaligenes faecalis (30)
Azotobacter sp.(51)
Bacillus megterium (18,21,34,51,52)
B. subtilis (54)
B. stearothermophillus (9)
Butyribacterium rettgeri (51)
Clostridium butyricum (64)
Cl. cochlearium (64)
Cl. flabelliferum (64)
Cl. tetanomorphum (64)
Escherichia coli (26)
Flavobacterium acetylicum (18)
F. acidificum (18)
F. aquatile (18)
F. arborescens (18)
F. devorans (25)
F. osteroaromaticum (18)
F. flavescens (18)
F. solare (52)
F. suaveolens (18)
Lactobacillus arabinosus (55)
L. casei (57)
Propionibacterium freudenreichii (33)
Prop.shermanii (27)
Prop. zeae (18)
Proteus vulgaris (28)
Pseudomonas aeroginosa (54)
Ps. fluorescens (54)
Ps. lumichroma (54)
Ps. chloraraphis (54)
Ps. denitrificans (54)
Rhizobium trifolii (32)
Rh. meliloti (32)
Serratia marcescens (60)
Staphylococcus aureus (56)
Streptococcus faecalis (57)

แอคทิโนมัยซีส ได้แก่

Micromonospora รวมทั้ง 69 species ที่ไม่สามารถ classified และ identified species (64)

St.roseochromogenes (18)
Streptomyces sp.(18)
Micromonospora purpuria (63)
M. echinospora (63)
M. halophytica (63)
M. fusca (63)
M. chalcea (63)
M. carbonacea (63)
Mycobacterium phlei (18)
My. smegmatis (53)

My. tubercurosum (18)

Sreptomyces albidoflavus(18)

St. vinaces(18)

St. aureofaciens (30)

St. farinosus (18)

St griseus (30)

Norcardia rugosa (37)

St. antibioticus (18)

St. aureus (18)

St. colombiensis (18)

St. fradiae (18)

St. olivaceus (23,24,25)

ยีสต์ ได้แก่

Torula sp. (65)

รา ได้แก่

Penicillium lilacinum (60)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ได้แก่

Anabaena cylindrica (18)

Claothrix parietina (18)

Plectonema nostocorum (18)

สาหร่ายทะเล (marine algae) ได้แก่

Ceranium rubrum (18)

Champia parvula (18)

จุลินทรีย์ที่ผลิตวิตามินบี 12 ที่กล่าวมาแล้ว มีบางชนิดเท่านั้น ที่มีความสามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ปริมาณสูง และถูกนำมาผลิตวิตามินบี 12 ในอุตสาหกรรม ดังแสดงในตารางที่ 2.5 รวมทั้งวิธีการผลิต อาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้

ตารางที่ 2.5 Process and media used for industrial production of vitamin B_{12}

Microorganisms	Ingredients of medium	yield B_{12} (mg/litre)	Comments
Bacillus megaterium	Beet or can molasses ammonium phosphate cobalt salt inorganic salts	0.45	18 hour aerated fermentation
Propionibacterium freudenreichii	Cornsteep liquor glucose cobal t saltmaintained at pH 7 with NH_4OH	19	6-day batch fermentation(3 day anaerobic+3 day aerobic)
Propionibacterium shermanii	Cornsteep liqour glucose cobalt salt maintained at pH 7 with NH_4OH	23	7-day batch fermentation (3 day anaerobic + 4 day aerobic)
Streptomyces griseus	Glucose soybean meal cobaltsalt	0.3	6-day batch (aerated)
Streptomyces olivaceus	Glucose soybean meal distiller solubles cobalt salt inorganicsalts	3.3	6-day batch (aerated)
Streptomyces species	Soybean meal glucosecobalt salt K_2HPO_4	5.7	6-day batch (aerated)

ที่มา : (57 หน้า 139)

4. การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์ (Microbiological assay)

จุลินทรีย์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 (72) มี 4 ชนิด คือ Lactobacillus, Escherichia coli (mutant type), Euglena gracilis และ Orchromonas malhamensis

1. Lactobacillus species แรกที่ใช้ในการตรวจหาวิตามินบี 12 คือ L. lactis Dorner (LLD) เพราะพบว่าต้องการสารที่แยกได้จากตับ จากการศึกษาต่อมาได้ใช้ L. leichmannii (ATCC 4797) หรือ L. leichmannii (ATCC 7830) แทน เพราะพบข้อผิดพลาดจากการใช้ L. lactis Dorner 8000 ในการตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ความยุ่งยากในการใช้ Lactobacillus ตรวจหาปริมาณวิตามินบี12 พบในกรณีที่มีสารปฏิชีวนะอยู่ด้วย และจุลินทรีย์พวกนี้ยังตอบสนองต่อ deoxyriboside และ sensitive ต่อ sodium chloride ใน assay medium นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารที่คล้ายคลึงกับวิตามินบี 12 เช่น FactorA, pseudovitamin B_{12}, factor อื่น ๆ ที่พบใน rumen sewage sludge, intestine และ microbial fermentation การ assay โดยใช้ Lactobacillus มักใช้วิธี tube assay โดยการวัดความขุ่นหลังจากเชื้อเจริญ 18-40 ชั่วโมง หรือไตเตรทหาปริมาณกรดหลังจากเชื้อเจริญ แล้ว24 ชั่วโมง วิธีการ assay ที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป คือวิธีของ Association of vitamin chemists (7) และ U.S. Pharmacopeia (17)

2 Escherichia coli (mutant)

ในสภาพธรรมดาจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่ต้องการวิตามินบี 12 แต่ E. coli ที่ใช้ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 แยกได้โดย Davis และ Mingioli (19) เป็นพวก ultraviolet-induced stable mutant, No.113-3 ต้องการ methionine และวิตามินบี 12 ในการเจริญแต่ไม่ตอบสนองต่อ deoxyriboside อาจใช้ assay ด้วยวิธี tube assay โดยวัดความขุ่น แต่มีข้อบกพร่องที่ความสามารถในการใช้ประโยชน์มีขอบเขตจำกัด คือใช้ได้ดีกับกับ complex natural material วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คือ plate assay หรือ agar diffusion method

3 Euglena gracilis

Euglena gracilis var. bacillarus เป็นพวก green photosynthetic flagellate ที่ต้องการวิตามินบี 12 และ thiamine เป็น essential growth factor ใช้วิตามินบี 12 ได้ในรูปที่เป็นอิสระเท่านั้น ส่วนวิตามินบี 12 ที่ติดกับโปรตีนใช้ไม่ได้ มีคุณสมบัติต่างจาก Lactobacillus คือ ถ้าอาหารมี thymidine หรือ deoxyriboside ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะไม่เจริญเชื้อนี้สามารถใช้ hydroxycobalamin ได้โดยตรงดังนั้นจึงไม่ต้องใช้ cyanide ช่วย stabilize และยังตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ทุกแบบ การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ใช้วิธี turbidimetric หรือ ไตเตรทด่าง (alkali) ใช้เวลา 8 วัน แต่เมื่อมีการปรับปรุงอาหารและสภาวะการเจริญจึงสามารถลดเวลาลงเหลือ 5-6 วัน

4. Orchromonas malhamensis

Orchromonas malhamensis เป็นพวก photosynthetic chrysomonad ที่มีความต้องการวิตามินบี 12 โดยเฉพาะ และความต้องการคล้ายคลึงกับสัตว์ชั้นสูง O. malhamensis จะตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ที่แท้จริง (true vitamin B_{12}) ขณะที่ E. graciiis ตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ทั้งหมด (ทั้ง true vitamin B_{12} และ pseudovitamin B_{12}) การใช้ O. malhamensis ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12ในอาหารได้ค่ามากกว่าใช้ L. leichmannii

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

Propionibacterium freudenreichii ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นจัดเก็บในสภาพ stock culture ที่อุณหภูมิ ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ใน MRS Agar stab (ภาคผนวก ก)

วัสดุเหลือใช้

น้ำทิ้งจากการผลิตไก่สด ได้รับจากบริษัท ไก่สด ซี.พี. จำกัด มีนบุรี กรุงเทพมหานคร

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Suction pump
2. Autoclave
3 Incubator
4. Hot air oven
5. Centrifuge
6 Spectrophotometer
7. Quewett
8 pH meter
9. เครื่องชั่ง
10. เครื่องแก้วต่างๆ

สารเคมี

1. Glucose
2. Yeast extract
3. $CoSO_4.7H_2O$
4. Peptone
5. Tween 80
6. Sodium acetate
7. Tri-ammonium citrate
8. $MgSO_4$
9. $MnSO_4$
10. Biotin
11. $FeSO_4$
12. K_3PO_4
13. $MgCl_2.6H_2O$
14. NaH_2PO_4
15. Acid hydrolysis of casein
16. Pancreatic digest of casein

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารที่ใช้ผลิตวิตามินบี 12

1.1 การเตรียม Complete medium ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดในภาคผนวก ก.

1.2 การเตรียมน้ำทิ้งไก่ เพื่อการเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 แบ่งน้ำทิ้งใส่ขวดสีชาแช่แข็งไว้ เพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้

1.2.2 เมื่อจะนำมาใช้ให้ละลายโดยแช่ในอ่างที่มีน้ำหล่ออยู่

1.2.3 แยกเอาตะกอนที่แขวนลอยออก โดยการกรองด้วยเครื่องกรองแบบสูญญากาศ ของ Tokyo Rikakikia Co ; LTD. Type 4 - 35 โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 5 และ เบอร์ 1

1.2.4 เติมสารเคมีบางชนิดในปริมาณที่ต้องการศึกษาในแต่ละการทดลอง

1.2.5 ปรับพีเอชตามที่ต้องการด้วย NH_4OH 15 เปอร์เซนต์ หรือ HCl 15 เปอร์เซนต์

1.2.6 นำมานึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

2. การหาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด (Maximum yield)

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

2.1.1 ถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จาก Agar stab ลงใน Complete medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.1.2 บ่มฟลาสก์ในข้อ 2.1.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.1.3 เมื่อครบวันที่ 4 วัดความขุ่นของเชื้อเป็น Optical Dinsity (O.D.) ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 660 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer รุ่น UNICAM 8620 UV/VIS spectometet

2.1.4 ทำสารละลายของเชื้อให้เจือจางลงจนได้ O.D. เท่ากับ 0.5 โดยใช้ complete medium ในการเจือจาง ใช้ สารละลาย ที่ได้เป็นกล้าเชื้อ ในการทดลองแต่ละครั้ง

2.2 การเตรียมกล้าเชื้อโดยใช้น้ำทิ้งไก่

2.2.1 ถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จาก Agar stab ลงในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.2.2 บ่มที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.3 การวัด O.D ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

2.3.1 เตรียมอาหารที่จะศึกษาบรรจุลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร

2.3.2 เติมกล้าเชื้อ จากข้อ 2.1.4 ลงในฟลาสก์โดยทำ 2 ซ้ำ ทุก ๆ การทดลอง

2.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ 0 ,24 , 48 , 72 , 96 ,120 , 144 ชั่วโมง

2.3.4 นำแต่ละฟลาสก์มาวัดค่า O.D. โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันกับที่ทำการศึกษาเป็น blank

2.3.5 จดค่า O.D. สองซ้ำในระยะเวลาที่กำหนดหาค่าเฉลี่ย

2.4 ศึกษาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยเปรียบเทียบระหว่างกล้าเชื้อ 2 เปอร์เซนต์ และกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์

2.4.1 เติมกล้าเชื้อ จากข้อ 2.1 ลงใน complete medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.4.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.4.3 เปรียบเทียบการเจริญที่เวลา 12, 24 ,36, 48 ,60, 72 ,84 , 96,108 และ120 ชั่วโมง เพื่อหาขนาดของกล้าเชื้อที่มีการเจริญสูงสุด

2.5 การเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตโดยเขียนกราฟระหว่าง ค่า O.D. เฉลี่ย กับ ระยะเวลา โดยให้แกนตั้งของกราฟเป็นค่า O.D. และ แกนนอนเป็นช่วงเวลา

2.6 การหาการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด โดยอ่านผลจากกราฟแสดงการเจริญเติบโต ปริมาณเซลล์สูงสุด อ่านค่าได้จาก O.D. ที่มีค่าสูงสุด

3. การเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry weight cell)

3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหาร Complete medium จนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์สูงสุดประมาณ 4 วัน

3.2 เมื่อครบวันที่ 4 แบ่งใส่หลอด Centrifuge ปั่นด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 20-25 นาที

3.3 รินน้ำออก เติมน้ำกลั่นทำเป็น สารละลาย แล้วนำไปปั่นใหม่ทำเช่นนี้ 3 ครั้งเพื่อล้างเซลล์

3.4 เติมน้ำกลั่นแล้วนำไปวัดค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร

3.5 แบ่งใส่ในกระทงอะลูมิเนียมที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ

3.6 นำเข้าตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบอีก ทำซ้ำ 3 ครั้งจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง

3.7 ทำการเจือจาง สารละลาย ที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 1:0 ,1:1, 1:3, 1:5 นำไปวัดค่า O.D. แบ่งใส่กระทงอะลูมิเนียมที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว โดยปิเปตมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ

3.8 นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน ระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักแห้ง โดยให้ O.D. เป็นแกนตั้งและน้ำหนักแห้งเป็นแกนนอน สามารถใช้เปรียบเทียบหาน้ำหนักแห้งของเชื้อนี้ในอาหารอื่น ๆ จากค่า O.D. ที่อ่านได้

4. ศึกษาการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งไก่

4.1 เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่มีในอาหาร Complete medium ต่อน้ำทิ้งไก่

4.1.1 เติมน้ำทิ้งไก่-อย่างเดียว ลงในฟลาสก์ ที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.1.2 เติมสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนใน complete medium คือ yeast extract ปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ ลงในน้ำทิ้งปลาฟลาสก์ที่ 2

4.1.3 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงในน้ำทิ้งไก่ ฟลาสก์ที่ 3

4.1.4 เติมน้ำตาลกลูโคส และ yeast extract ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ และ 0.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับลงในน้ำทิ้งปลาฟลาสก์ที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณเซลสูงสุดของน้ำทิ้งไก่ทั้ง 4 สภาวะ และ complete medium เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.2 เปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน complete medium ,ในน้ำทิ้งไก่ ที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ และ น้ำทิ้งไก่ ที่เติมน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 0.5 , 1.0 ,1 .5, 2 .0, 2.5 แ ละ 3.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ พร้อมด้วย yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญ และ ปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.3 เปรียบเทียบปริมาณของ yeast extract

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน complete medium ,ในน้ำทิ้งไก่ ที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ และน้ำทิ้งไก่ที่เติม yeast extract ในปริมาณต่างๆ กันดังนี้ 0.0 , 0.1, 0.5, 0.6 , 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0,4.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับพร้อมด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.4 เปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งไก่ ไม่เติมสารอาหารใดๆ และ น้ำทิ้งไก่ที่ทเติมโคบอลท์ในปริมาณต่างๆ กันดังนี้ 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4 .

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) และน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry weight cell) ของเชื้อ Prop. freudenreichii

จากการทดลองได้กราฟมาตรฐาน ระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii เป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ในการทดลองต่อไปใช้กราฟมาตรฐานนี้เทียบกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จากค่า O.D. ที่อ่านได้

2. ผลการศึกษาการเจริญ และ ปริมาณเซลล์สูงสุด(maximum yield) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตไก่สด และน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium , น้ำทิ้งไก่, น้ำทิ้งไก่ ที่เติมกลูโคส , น้ำทิ้งไก่ ที่เติม ยีสต์สกัด ,น้ำทิ้งไก่ ที่เติมน้ำตาลกลูโคสและยีสต์สกัด ในปริมาณ ที่เท่ากับใน complete medium พบว่าน้ำทิ้งไก่ที่เติมทั้งน้ำตาลกลูโคสและยีสต์สกัดมีอัตราการเจริญของเซลและให้ปริมาณเซลล์สูงสุด และการเจริญใน complete medium จะมีการเจริญที่ต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนเพิ่มลงไปในน้ำทิ้งไก่จะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของเซลเพื่อให้ได้ปริมาณเซลสูงสุด

3. ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคส

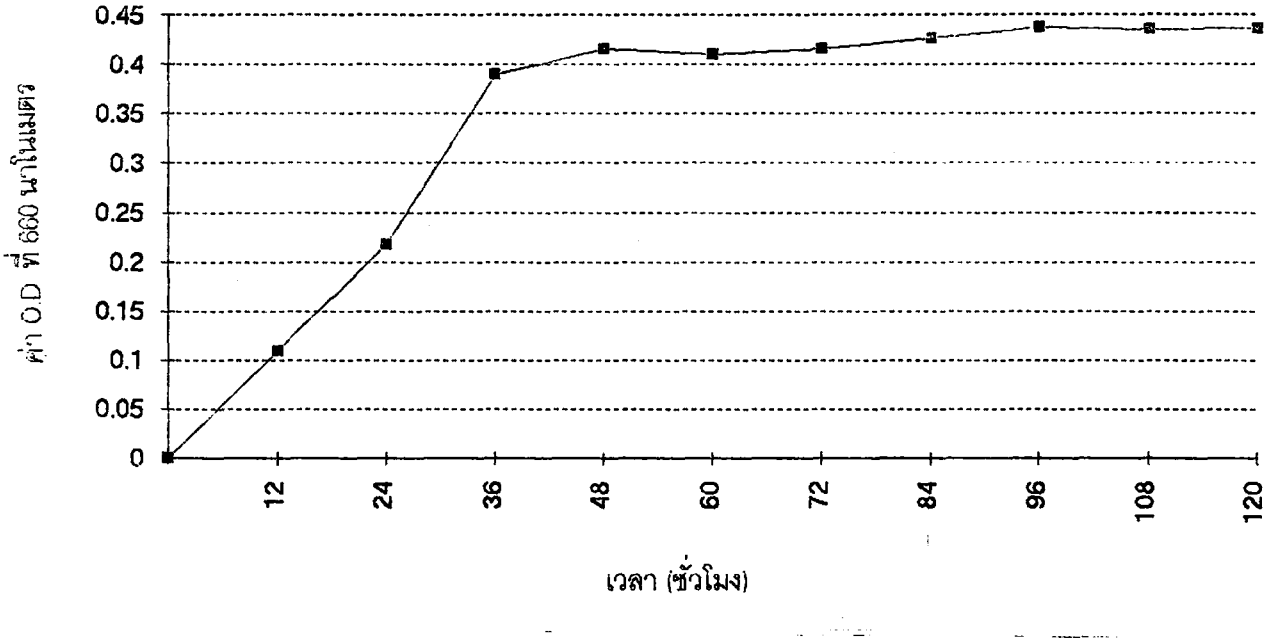
ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน น้ำทิ้งไก่ และน้ำทิ้งไก่ที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์แล้วเติมน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่างคือ 0.5 ,1.0 ,1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ พบว่าน้ำทิ้งไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซนต์ มีอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.4

4. ผลการเปรียบเทียบปริมาณ yeast extract

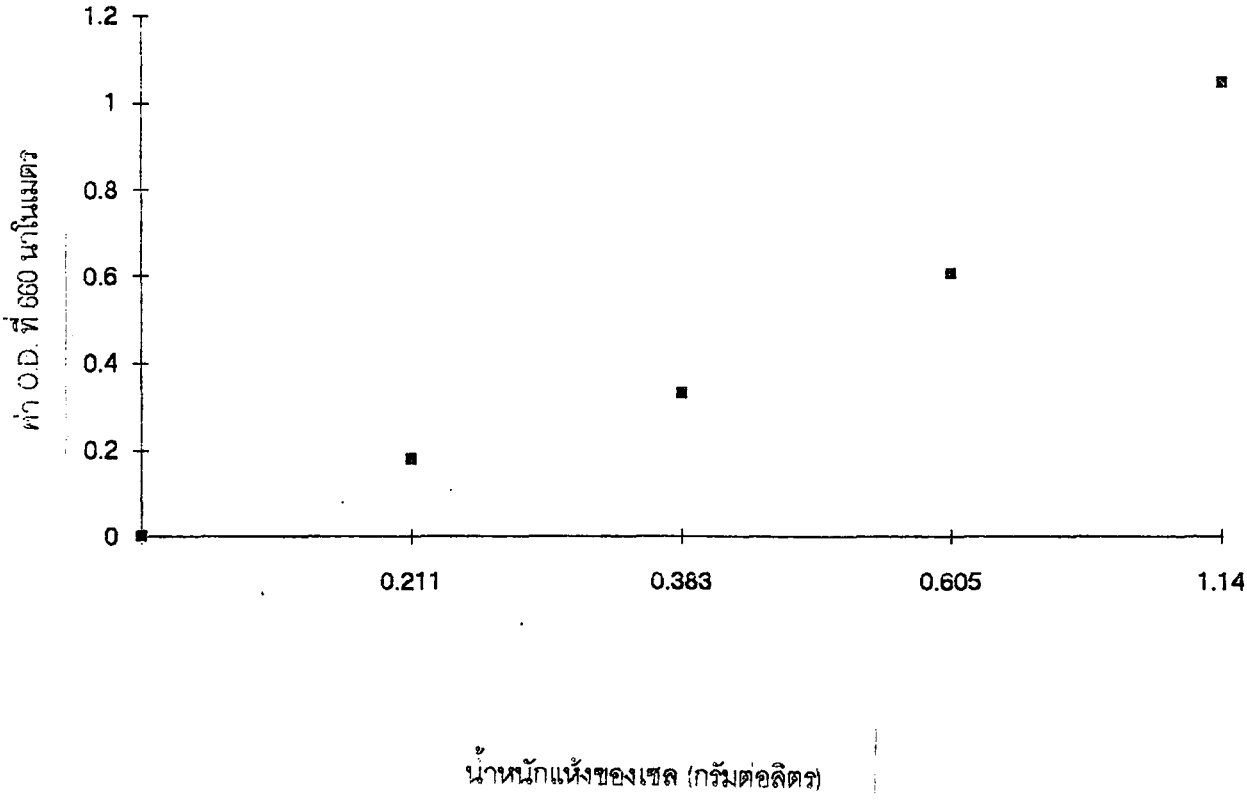
ผลการศึกษาปริมาณ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์และเติม yeast extract ในปริมาณต่างๆ กันคือ 0.0, 0 .1, 0 5,0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 เปอร์เซนต์พบว่ามีการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ที่เติมyeast extract 5 เปอร์เซนต์มีอัตราการเจริญสูงสุดดังแสดงในรูปที่ 4 5

5. ผลการเปรียบเทียบปริมาณโคบอลท์

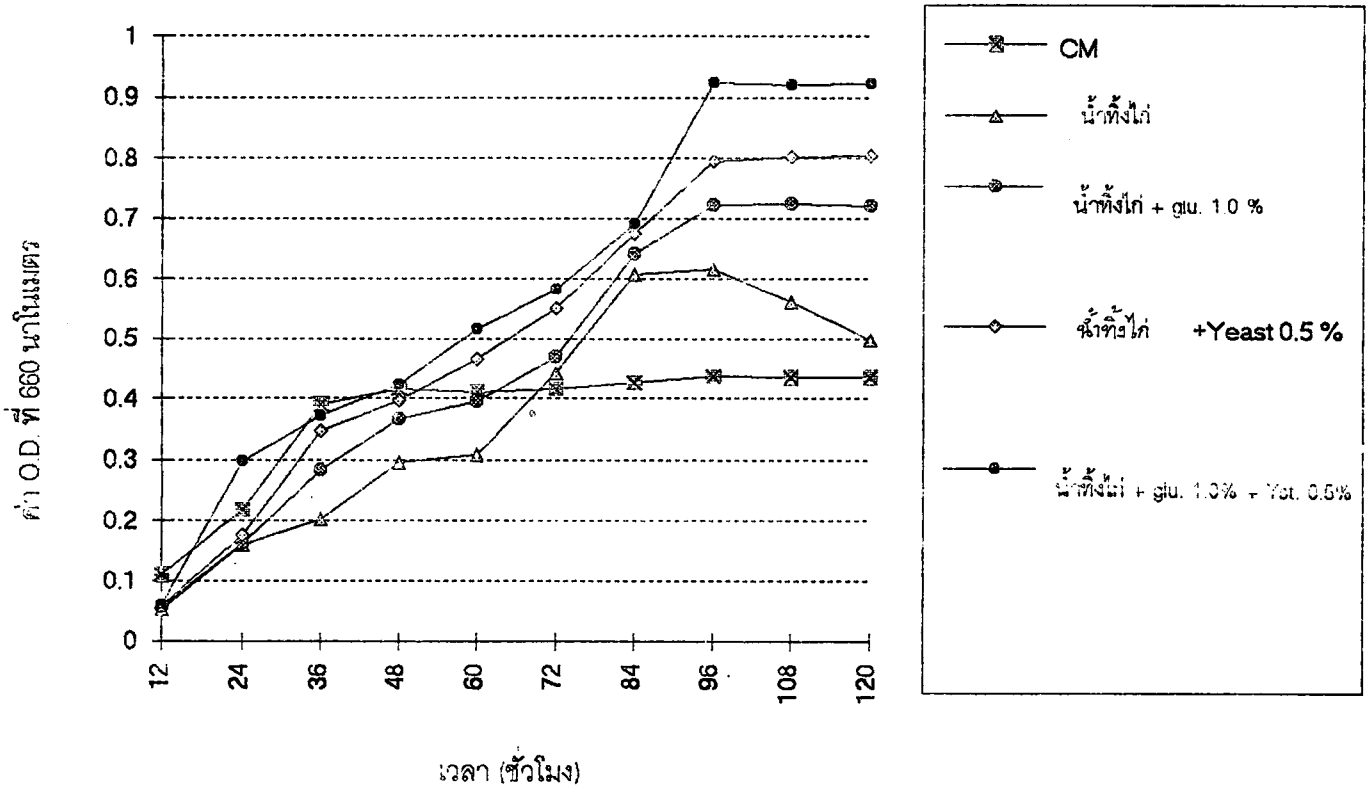
ผลการเปรียบเทียบปริมาณ $CoSO_4\ 7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ และน้ำทิ้งไก่ที่มีการเติม $CoSO_4.7H_2O$ ในปริมาณต่างคือ 0, 1, 2, 3 , 4, 6, 8, 12, 14, 16, 20 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii สูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.6



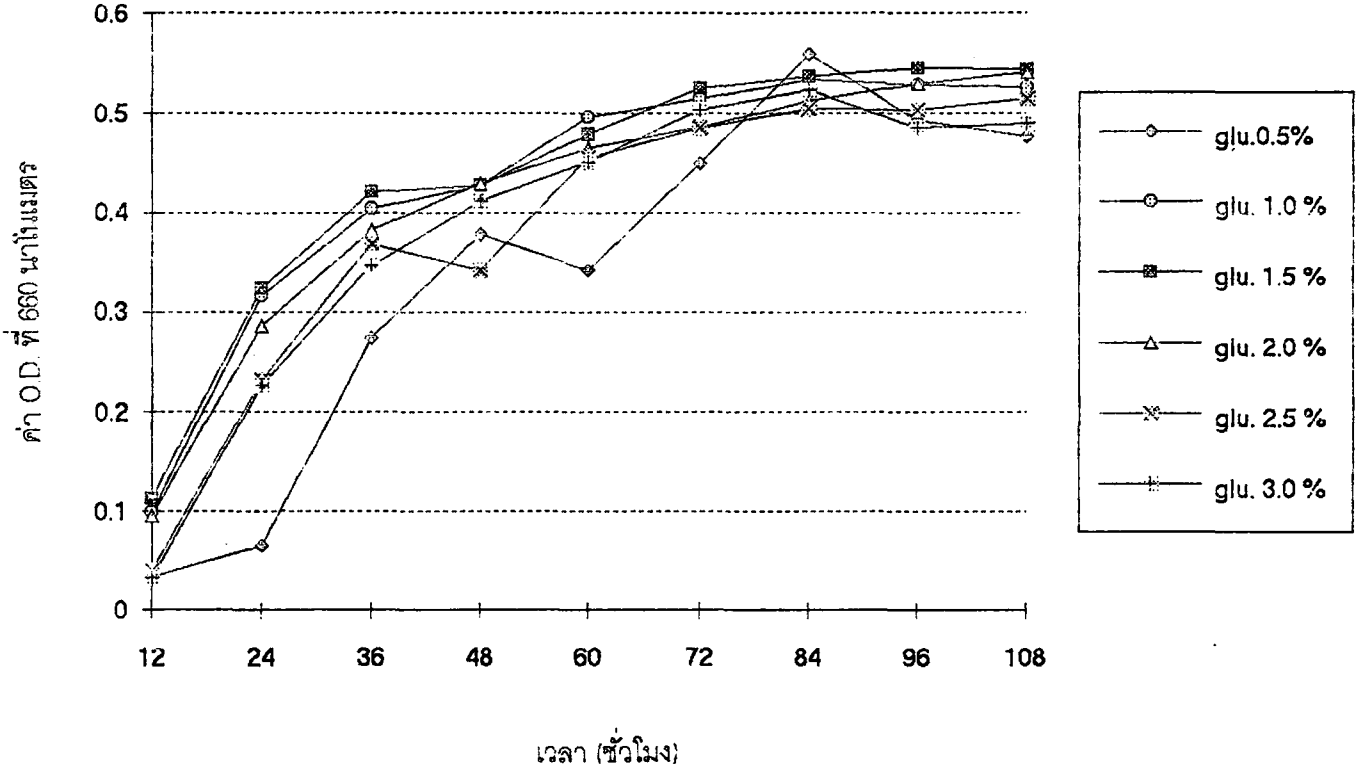
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium ณ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์



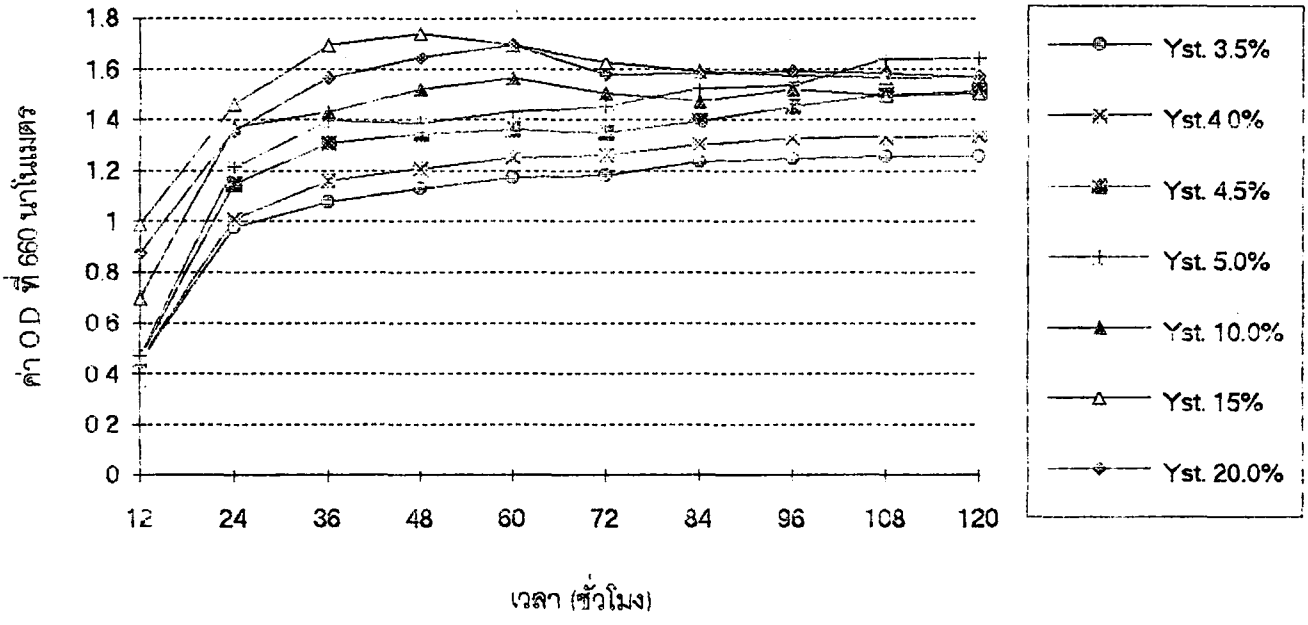
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii (กรัมต่อลิตร) กับค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร



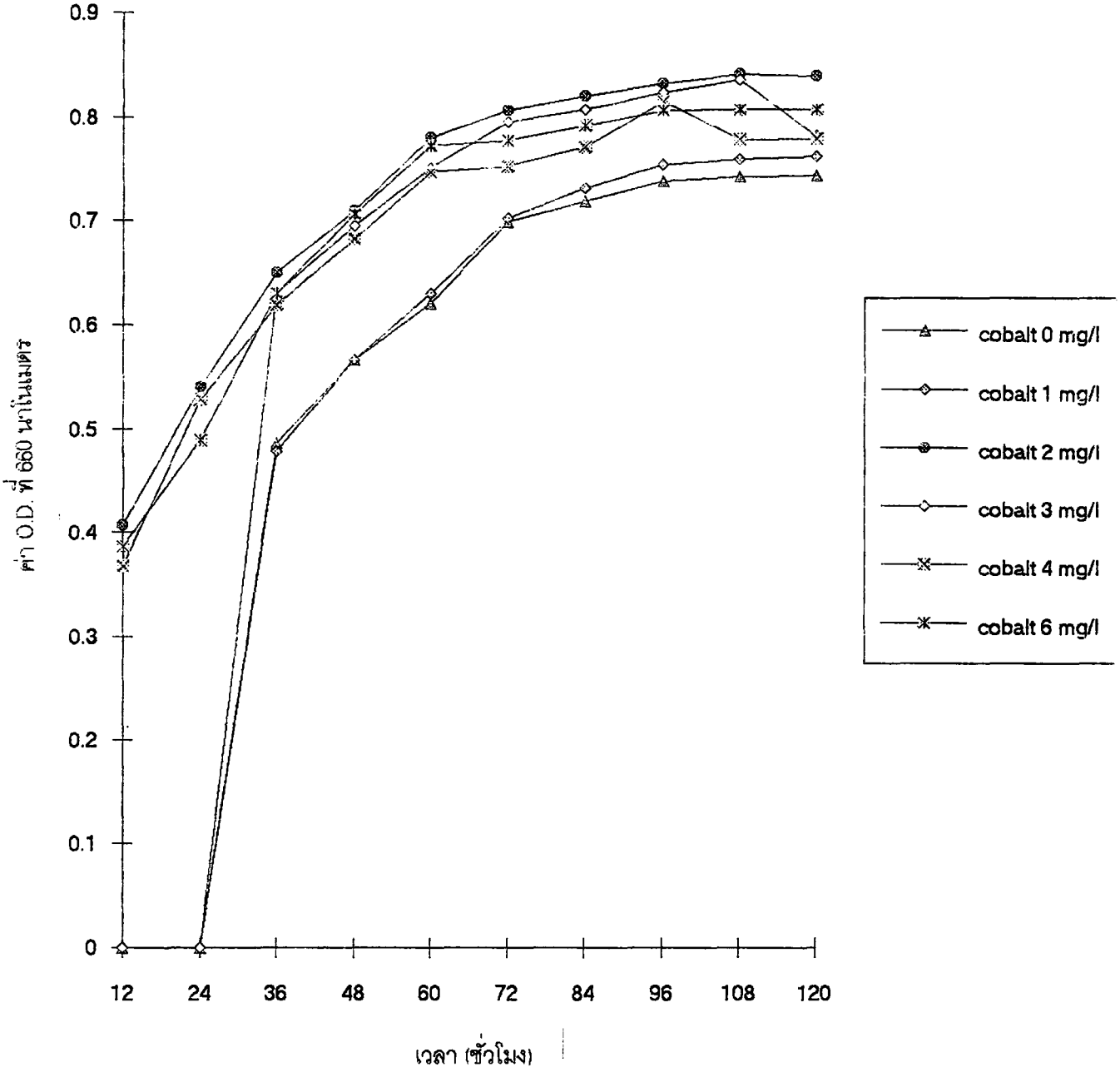
รูปที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลกลูโคสและยีสต์สกัดที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ เปรียบเทียบกับ complete medium ที่สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.4 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลกูโคสในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Yeast extract ในปริมาณต่างๆที่มีผลต่อ การเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ $CoSO_4 7H_2O$ ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซนต์ และ Yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ที่สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ในจุดก่อนที่จะเข้าสู่ระบบบำบัด เปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium โดยใช้สภาวะเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ใน complete medium คือที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.0 เปอร์เซนต์ เป็นสภาวะมาตราฐาน เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ คือ สภาวะที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซนต์ ,ยีสต์สกัด 5.0 เปอร์เซนต์ และโคบอลท์ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในน้ำทิ้งดังกล่าว พบว่ามีการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii สูงกว่าใน complete medium จากการทดลองพบว่า การเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ มีความต้องการปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงกว่าใน complete medium เพียงเล็กน้อย คือมากกว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ใน complete medium 0.5 เปอร์เซนต์ และมีความต้องการปริมาณโคบอลท์เพียง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าใน complete medium ซึ่งใช้ปริมาณโคบอลท์ถึง 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งดังกล่าว มีความต้องการยีสต์สกัด 5.0 เปอร์เซนต์ ซึ่งสูงกว่าใน complete medium มาก โดยใน complete medium ใช้ปริมาณยีสต์สกัดเพียง 0.5 เปอร์เซนต์เท่านั้น แสดงว่าน้ำทิ้งดังกล่าวขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน แต่มีความสมบูรณ์ในด้านแหล่งคาร์บอนและ Growth factor เมื่อมีการเติมสารอาหารลงไปในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ในปริมาณที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น เชื้อจะมีการเจริญสูงกว่าใน complete medium ดังนั้นจึงสามารถนำน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่มาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii เพื่อการผลิตวิตามินบี 12 แทนการเลี้ยงเชื้อใน complete medium ได้ เพื่อลดต้นทุนในการผลิตและเป็นการนำน้ำทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงที่สุด

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก : อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทำ stock culture

1.1 อาหาร MRS medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
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
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

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

1.2 อาหาร MRS agar ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ MRS medium แต่ต้องเติมวุ้น 1.5 เปอร์เซนต์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตวิตามินบี 12

อาหาร complete medium มีส่วนประกอบดังนี้

Acid Hydrolysis of casein	1.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	1.5	กรัม
Pancreatic acid	4.0	มิลลิกรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	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
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.6

ภาคผนวก ข : ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ข.1 แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ ใน complete medium สภาวะ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
12	0.112	0.11	0.111
24	0.218	0.218	0.218
36	0.345	0.332	0.389
48	0.411	0.421	0.416
60	0.432	0.45	0.41
72	0.397	0.434	0.416
84	0.406	0.446	0.426
96	0.415	0.458	0.437
108	0.416	0.454	0.435
120	0.416	0.456	0.436

ตารางที่ ข.2 แสดงผลระหว่างค่าความขุ่น (O.D.) และน้ำหนักแห้ง (Dry Weight Celll) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium สภาวะ stationary flask ชั่วโมงที่ 96

ความเจือจาง	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)			ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1:05	0.21	0.212	0.211	0.18	0.182	0.181
1:03	0.384	0.382	0.383	0.33	0.328	0.329
1:01	0.586	0.642	0.605	0.591	0.618	0.6045
1:00	1.299	0.998	1.14	1.024	1.005	1.0145

ตารางที่ ข.3 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสและ Yeast extract ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ เปรียบเทียบกับ complete medium ในสภาวะ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	CM	น้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่	น้ำทิ้ง+glucose 1%	น้ำทิ้ง+yeast ext. 0.5%	น้ำทิ้ง+glucose 1%+yeast ext. 0.5%
12	0.11	0.054	0.056	0.058	0.06
24	0.218	0.159	0.161	0.176	0.298
36	0.389	0.202	0.283	0.347	0.372
48	0.416	0.295	0.366	0.396	0.424
60	0.41	0.308	0.395	0.466	0.516
72	0.416	0.442	0.469	0.551	0.583
84	0.426	0.608	0.641	0.674	0.69
96	0.437	0.616	0.723	0.795	0.924
108	0.435	0.561	0.725	0.802	0.921
120	0.436	0.497	0.721	0.804	0.922

ตารางที่ ข.4 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ ที่เติม Yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาวะ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร					
	glucose 0.5%	glucose 1%	glucose 1.5%	glucose 2.0%	glucose 2.5%	glucose 3%
12	0.034	0.099	0.113	0.096	0.04	0.033
24	0.065	0.316	0.323	0.286	0.232	0.227
36	0.274	0.404	0.421	0.372	0.368	0.347
48	0.378	0.428	0.428	0.43	0.342	0.411
60	0.342	0.496	0.479	0.465	0.455	0.451
72	0.45	0.514	0.525	0.487	0.485	0.504
84	0.456	0.534	0.537	0.512	0.505	0.523
96	0.493	0.528	0.546	0.529	0.504	0.486
108	0.477	0.526	0.545	0.541	0.514	0.49

ตารางที่ ข.5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Yeast extract ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาวะ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ 660 นาโนเมตร					
	yeast ext. 2%	yeast ext. 2.5%	Yeast 3.0%	Yeast 3.5%	Yeast 4.0%	Yeast 4.5%
12	0.483	0.453	0.509	0.451	0.457	0.464
24	0.823	0.884	0.971	0.975	1.011	1.150
36	0.922	0.997	1.073	1.076	1.161	1.307
48	0.963	1.025	1.096	1.136	1.206	1.346
60	0.988	1.056	1.125	1.172	1.254	1.363
72	0.984	1.082	1.144	1.183	1.264	1.352
84	1.097	1.149	1.206	1.236	1.304	1.396
96	1.074	1.174	1.231	1.250	1.330	1.451
108	1.108	1.188	1.237	1.258	1.335	1.501
120	1.110	1.201	1.245	1.260	1.340	1.510

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร			
	Yeast 5.0%	Yeast 10.0%	Yeast 15.0%	Yeast 20.0%
12	0.472	0.695	0.987	0.875
24	1.217	1.374	1.462	1.358
36	1.396	1.432	1.693	1.565
48	1.390	1.519	1.741	1.647
60	1.433	1.565	1.695	1.692
72	1.434	1.505	1.624	1.580
84	1.524	1.474	1.592	1.583
96	1.537	1.522	1.574	1.592
108	1.638	1.496	1.565	1.582
120	1.641	1.505	1.569	1.569

ตารางที่ ข.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ในปริมาณต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และ Yeaxt extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาวะ stationary flask

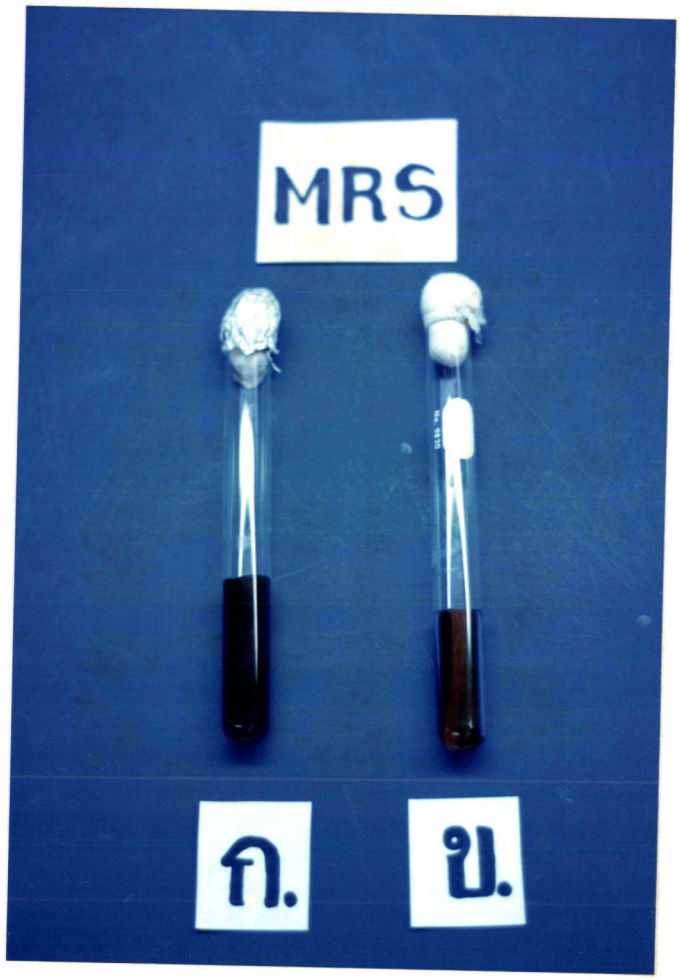
ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ 660 นาโนเมตร					
	cobalt 0 mg/l	cobalt 1 mg/l	cobalt 2 mg/l	cobalt 3 mg/l	cobalt 4 mg/l	cobalt 6 mg/l
12			0.407		0.368	0.387
24			0.541		0.529	0.490
36	0.487	0.479	0.650	0.630	0.619	0.630
48	0.567	0.567	0.710	0.695	0.982	0.706
60	0.621	0.630	0.781	0.752	0.747	0.773
72	0.699	0.702	0.807	0.796	0.753	0.778
84	0.719	0.732	0.821	0.808	0.772	0.93
96	0.739	0.755	0.833	0.824	0.816	0.807
108	0.743	0.760	0.841	0.826	0.779	0.808
120	0.744	0.763	0.840	0.782	0.780	0.808

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร					
	cobalt 8 mg/l	cobalt 12 mg/l	cobalt 14 mg/l	cobalt 16 mg/l	cobalt 20 mg/l	cobalt 24 mg/l
12	0.397	0.400	0.367	0.374	0.375	0.335
24	0.538	0.550	0.536	0.533	0.558	0.502
36	0.652	0.647	0.643	0.625	0.671	0.601
48	0.668	0.699	0.685	0.696	0.762	0.638
60	0.765	0.754	0.759	0.716	0.765	0.680
72	0.773	0.767	0.783	0.734	0.761	0.647
84	0.815	0.781	0.782	0.722	0.759	0.662
96	0.800	0.788	0.806	0.758	0.767	0.682
108	0.818	0.827	0.811	0.758	0.802	0.701
120	0.816	0.829	0.811	0.760	0.807	0.703

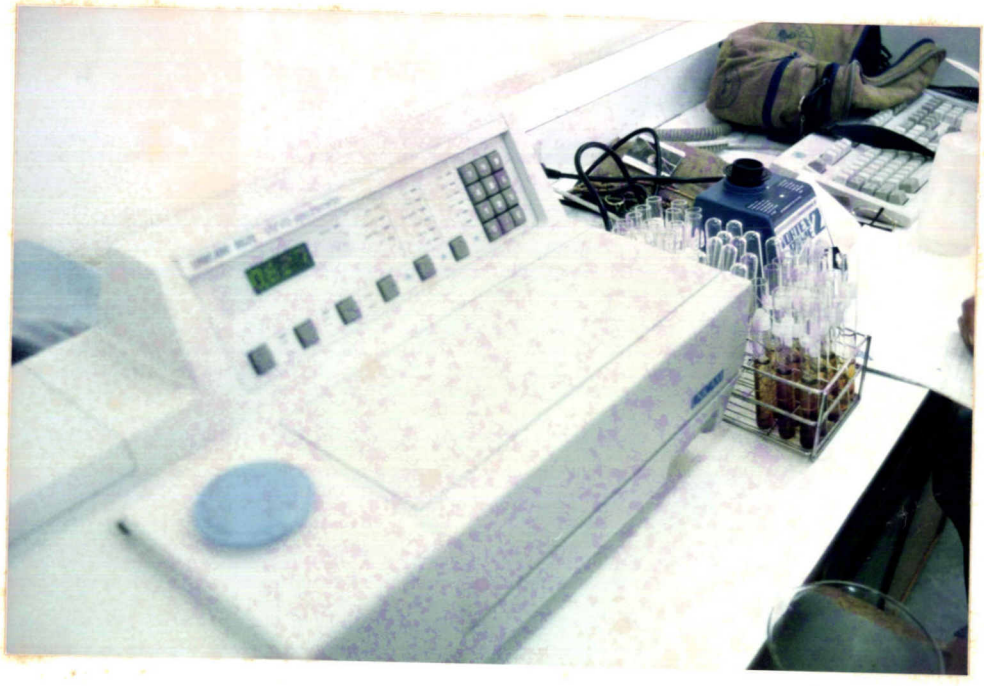
ภาคผนวก ค : รูปประกอบการทดลอง

รูปที่ ค.1 เปรียบเทียบน้ำทิ้งไก่ก่อนกรองและหลังกรอง

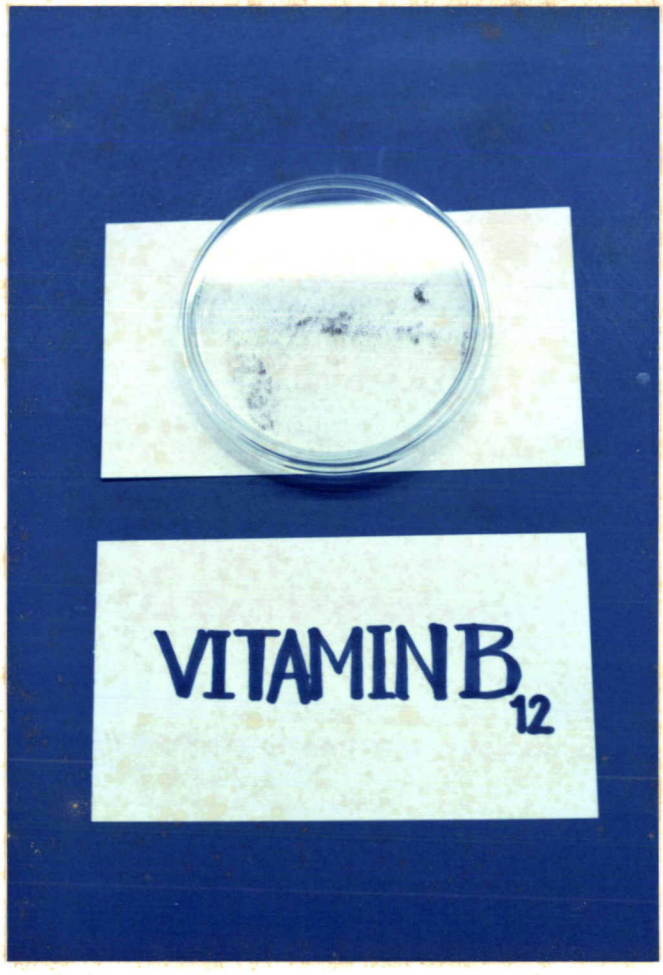
รูปที่ ค. 2 ก.แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium ที่ 0 ชั่วโมง
ข.แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium ที่ 96 ชั่วโมง



รูปที่ ค.3 ก.แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน MRS agar ที่ 0 ชั่วโมง
ข.แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน MRS agar ที่ 96 ชั่วโมง



รูปที่ ค.4 แสดง spectrophotometer รุ่น UNICAM 8620 UV/VIS spectrometer



รูปที่ ค.5 แสดงผลึกวิตามินบี 12

เอกสารอ้างอิง

1. กิจจา ช.เจริญยิ่ง จิรัฐ นรเศรษฐธีรกุล ธเนศ เอิบอิ่มฤทธิ์ "การ . ผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii " โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2536
2. พิณทิพย์ พูลโภคา. " การคัดเลือกสายพันธุ์ Pseudomonas spp. และการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12. " วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2523.
3. เพ็ญพันธ์ ชุณหฤทธิ์ " การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากถั่วเหลืองเลี้ยงเชื้อ Bacillus megaterium (ATCC 13639) เพื่อเป็นแหล่งอาหารโปรตีนและวิตามินบี 12. " วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2519.
4. พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์. " การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propioibacterium frerudenrechii subsp. shermanii (ATCC 13673) โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ. " วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์. 2518.
5. บุษบา ยงสมิทธ์ ทอรายา เฟ่ตซูโอะ และ ยามาเน ทซูเนโอะ. " การผลิตวิตามินบี 12 โดยแบคทีเรียที่ใช้เมธานอลเป็นวัตถุดิบ " รวบรวมเรื่องย่อสาขาพืช การประชุมทางการเกษตรและชีววิทยา ครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ 2518.
6. เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชน สถาบันวิจัยวิทยศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย. 2518.
7. สุวิทย์ อารีกุล. " กรดโฟลิกและวิตามินบี 12 " ภาควิชารังสีไอโซโทปเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. 2522.
8. Association of vitamin ghemists, inc. 1951. " Methods of vitamin assay " Interscience, New York.

9. APHA AWWA and WPCF. 1971 Standard methods for the examination ofwater and waste water. 13th editon,American Public Health Association,Newyork.

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. Patent 3 , 067 , 109 , Dec. 4,1962. In : Noyes , R.,1969. Vitamin B_{12} manufacture, Noyes Development Corp, Newjersey.

12. Becher, E. . K. Bernhauer and G. Wilharm 1962. "Use of Precursors." U.S Patent 3 , 043 , 750. July 10, 1962. In : Noyes, R. , 1969. Vitamin B_{12} manufacture, Noyes Development,New jersey

13. Boretti, G. , A. di Marco ; L.Fuoco ; M P Marneti, A Migliacci and C. Spalla. 1960. Biochim. Biophys. Acta 37 . 379. Cited in Rainbow , C. and A. H. Rose. 1963. Biochemistry of industrial microorganism. Academic Press, Inc., London and New York.

14. Buchanan, R . E. , N E . Gibbson ; S T Cowan ; J.G. Holt ; J. Liston. R G . E . Murry , C.F. Nivin , A.W. Ravin and R.Y Stanier. 1974 Bergy's Mannual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Willkins Company , Baltimore.

15. Bulkin, V.N. and G.V. Pronyakova ; 1960. "The biosysthesis of vitamin B_{12} and porphyrin by Propionibacterium." J. Biochem. 47:781-789.

16. 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 : 99 - 129.

17. David, B.D. and E.S. Mingioli. 1950. J.Bact. 60 : 17. Citedin Sebrell,W.H. Jr.and R.S. Harris.1968. The vitamin chemistry , physiology methods. Academic Press, Inc.,New York and London.

18. Garibaldi, J.A . , N.S. Snell and J.C. Lewis. 1953. "Bacillus megaterium for biosynthesis of cobalamin " Ind. Eng. Chem. 45 : 838 - 846

19. Grant, D.1960. Oxygen addition U.S.Patent 2,956,932 ; October 18 ,1960. In : Noyes ,R., 1969. Vitamin B12 manufactures , Noyes Development Corp, New Jersey.

20. Hall, H.H. 1951."Method for the production of vitamin B12 by Streptomyces olivaceus." U.S. Patent 2 , 643 , 213. June 23, 1953.

21. Hall, H.H. , R.G. Benedict ; c.f. Wieson , C.E. Smith and R.W. , Jackson.1953. " Vitamin B12 production by fermentation with Steptomyces olivaceus. " Appl. Microbiol. 1:124-129

22. Hall, H.H. and H.M. Tsuchita. 1950. " method for producing vitamin B12 ." U.S. Patent 2 , 561 , 364. July 24 , 1951.

23. Halbrook, E.R.; F.Cords; A.R. Winter and T.S. Sutton. 1950. " Vitamin B12 production by microorganism isolated from poultry hause little and droppings. " J. Nutrition. 41:555

25. Hargrove, R.E. and A. Leviton. 1951. " Process for the manufacture of vitamin B12." U.S. Patent. 2,715,602 August 16, 1955.

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

27. Hodgkin, D.C ; J. Pichworth; J.H. Roberton;K.N. Treublood; R.J. Proson; 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 microorganisms. Academic Press, Inc., London and New York.

28. Hoogerheide, J.C.1954 " Production of vitamin B12 by Agrobacterium radiobacter. " U.S. Patent 2,798,840. July 9, 1957.

29. Hoffman, H. ; W. Hardwick and R. Seeley 1961. " Use of Precursors. " U.S. Patent 3 , 013 , 948 Dec 19, 1969. Vitamin B12 manufacture. Noyes Development Corp, New Jersey.

30. Kucheras, A.G. 1972. " Effect of amino acids on cobamide synthetic activity of Propionibacterium shermanii " R.V. Biochem. microbial. Abstracts. 7A:784

31. Levin, A.P. , H.B. Funk and Tendler. 1954. " Vitamin B12 production by certain species of Rhizobiaceae. " Science. 120 : 784

32. Leviton , A. and R.E. Hargrove. 1952. " microbiological synthesis of vitamin B12 by propionic acid bacteria." Ind. End. Chem. 44 ; 2651-2655

33. Lewis, J.C.; K. Ijichi; N.S Snell and Garbildi.1949 "Fermentation process for production of vitamin B12." U.S. Dept. Agr , Bur. Agr and Ind. Chem , Mimeographed Cire. Ser., AIC 254. Cited in Prescott, S.C. and C.G. Dunn.1959. Industrial Microbiology. Mic Graw-Hill Book Co., Inc., New York , Toronto and London

34 Lim, P.G. 1968 Glycine Additive U.S. Patent 3, 411, 991; November 19, 1968 In Noyes, R., 1969 Vitamin B12 manufacture. Noyes Development Corp, New Jersey.

35. Manothirawat, N. 1973. " Factor affecting Vitamin B12 Production by Bacillus Megaterium (ATCC 13639) in waste water. " Bangkok; M.S. Thesis, Kasetsart University.

36 Marco, A. di and c Spalla. 1956 " Process of producing cobalamins by fermentation culture media with Norcardia rugosa

37. Masao Yamamoto, Rokuro Okamoto, Taiji Inui. " Application of a Marine-utilizing Bacteria for bioassay of vitamin B12 in Sea Water. " Central Research Laboratories, Sanrako - Ocean Co., Ltd., Fujisawa 251

38. Meyer, C.F. and W.H. de Vries. 1949 " Preparation of vitamin B12 concentrates from *Streptomyces* griseus cultures." U.S. Patent 2,595,159 Apr 29, 1952.

39. 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 vitamin chemistry , physiology , patholog. methods. Academic Press, Inc., New York and London .

40. Naomichi Nichio , Mitsuo Tanaka, Ryuichi Matsunu, Tadashi Kamikubo "Production of vitamin B12 by Methanol utilizing Bacteria, Pseudomonas AM-1 and Microcyclus eburneus" Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Hiroshima.

41. Napavarn Manothirawat. " Factor Affecting vitamin B12 Production by Bacillus megaterium (ATCC 13639) in waste water " Thesis Mahidol University. 1973

42. Neuberger, H , R. Bray and J.B. Armitage. 1963 Vitamin B12 (Cyanocobalamin) In recent advances in bio-chemistry. Cherchill Corp., London

43. Noyes, R., 1969 . Vitamin B12 manufacture. Noyes Development Corp, New Jersey.

44. Ohmori, H. . 1974 Studies on the biochemical role of vitamin B12 in photosynthethic bacteria. Tokyo : Ph.D Thesis, Tokyo University

45. Osman,H.G. and M.S Chhencuda 1968. Biosynthesis of vitamin B12 by Propionibacterium

shermanii II The suitability of different carbon and nitrogen sources as wel as the effect of vitamins , purines and pyrimidines on the growth and vitamin B12 synthesis. J. chem. UAR. 11,53-361. Abstract in Microbiol. Abstracts section A Industrial Microbiology.

46 Osman, H.G. and M.S. Cheneuda. 1968. Biosynthesis of vitamin B12 by Propionibacterium shermanii. III. Effect of some minerals, surface active agents and biochemical inhibitors on the biosynthesis of vitamin B12. J. Chem. URA, 11,363-371 (Nat. Res. Centre Cairo, URA) Abstract in Microbiol. Abstract secsion A Industrial Microbiology.

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

48. 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 inqustrial microorganisms. Academic Press, Inc , London and New York.

49. Perlman, D. 1964. Metal organic compounds. Adv. Appl. Microbiol. 4 108-112.

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

51 Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. The production of vitamin B12. Mc Graw-Hill Book Co , New York, Toronto and London.

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

53. Renz. P.1970. Riboflavin as precursor in the biosynthesis of the 5,6-dimethylbenzimidazole -moniety of vitamin B12 FEBS Letters. 6(3) : 187-189

54. Rickes, E.L. ; N.G. Brink ; F.R. Koniuszy ; T.R. Wood and k. Falkers. 1984. Crysatlline vitamin B12 Science 107 . 396-397.

55. Rudy, H. , J. Rauch , K.R. Dietrich and C. Constabel. 1963. Citric acid mycelium. U.S. Patent 3,085,049 ; April 19, 1964. In : Noyes, R., 1969, Vitsmin B12 manufacture. Noyes Development Corp, New Jersey

56. Sebrell, W.H. Jr and R.S. Harris 1968 The vitamins chemistry, psysiology, pathology.