สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาผลของปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (TISTR 446)

นาย เทพสิทธิ์ ผดุงโยธี
นาย ธีรยุทธ หอมทอง
นางสาว ศิริเพ็ญ เชิญชัยวชิรากุล

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

ปว.
ท633ก
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30617
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study of Factor Efficiency to Vitamin B_{12} Production from Waste Water of Soybean Sauce Factory by Propionibacterium freudenreichii (TISTR 446)

Mr. Teppasidh Phadungyotee
Mr. Teerayut Homthong
Miss Siripen Chernchaivachirakul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (TISTR 446)

โดย นาย เทพสิทธิ์ ผดุงโยธี

นาย ธีรยุทธ หอมทอง

นางสาว ศิริเพ็ญ เชิญชัยวชิรากุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

..... กรรมการ

(รศ . สุขใจ ชูจันทร์)

..... กรรมการ

(ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (TISTR 446)
โดย	นาย เทพสิทธิ์ ผดุงโยธี
	นาย ธีรยุทธ หอมทอง
	นางสาว ศิริเพ็ญ เชิญชัยวชิรากุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

จากการนำน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง มาเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เพื่อศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสม ต่อการเจริญของเชื้อ ในการผลิตวิตามินบี 12 โดยหาปริมาณที่เหมาะสมของสารอาหาร เปรียบเทียบกับการใช้ complete medium (อาหารควบคุม) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง วัดโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 โดยใช้จำนวน 5 เปอร์เซนต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสภาพ stationary flask พบว่าปริมาณสารอาหารที่เติมลงไปในน้ำทิ้ง ซึ่งทำให้อัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด คือ กลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซนต์ และโคบอลท์ซัลเฟต ($CoSO_4$) 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และนอกจากนี้ยังพบว่า ในน้ำทิ้งที่มีการเติมสารอาหารทั้งสามชนิด การเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จะสูงกว่าใน complete medium ถึง 308 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	A Study of Factor Efficiency to Vitamin B_{12} Production of Soybean Sauce Factory by Propionibacterium freudenreichii (TISTR 446)
Name	Mr. Teppasidh Phadungyotee
	Mr. Teerayut Homthong
	Miss Siripen Chernchaivachirakul
Special Project advisor	Associate Professor Sukjai Choojan
Department	Applied Biology
Academic Year	1997

Abstract

Waste water from soybean sauce factory was used for cultivate Propionibacterium freudenreichii in order to find the culture's growth result and optimum growth conditions. We finding sufficient amount of food source (Nitrogen Carbon and Cobolt) . The experiment was conducted under conditions of stationary flask at temperature of 30 degree Celsius , initial pH 7 and inoculum starter culture was 5 % (by optical density at 660 nanometer was 0.5) .

From the experiment growth conditions was performed using waste water with various chemicals . The result revealed that 2 milligram per liter of $CoSO_4.7H_2O$ as cobolt source , glucose and yeast extract were 0.5 % and 2 % . Respectively are the best for growth and vitamin B_{12} production of Propionibacterium freudenreichii . And in waste water that add three nutrients with this result the growth related was 306 % over than complete medium .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและช่วยเหลือของบุคคลดังต่อไปนี้

1. รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้ความรู้ และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขเอกสารให้
2. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่อนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง
3. บริษัท ง่วนเชียงอุตสาหกรรม จำกัด ที่เอื้อเฟื้อน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง
4. เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และ เจ้าหน้าที่ธุรการภาค ทุกท่านที่ให้ความสะดวกต่างๆ

และขอขอบคุณเพื่อนๆ น้องๆ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษรวมถึงการจัดพิมพ์เอกสารจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

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	3
1. ลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และ ประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium spp.	3
2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium spp.	10
อาหาร	10
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12	12
3. การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	19
4. การวิเคราะห์วิตามินบี 12	26
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	30
บทที่ 4 ผลการวิจัย และวิจารณ์	35
1. ผลการศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งกระบวนการผลิตซอสถั่วเหลืองและน้ำทิ้งเติมสารต่างๆ	35
2. ผลการเปรียบเทียบปริมาณ กลูโคส	35
3. ผลการเปรียบเทียบปริมาณยีสต์สกัด	35
4. ผลการเปรียบเทียบปริมาณโคบอล์	36
5. ผลการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆ ความเข้มข้นที่เหมาะสมกับ complete medium	36
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	46
ภาคผนวก	47
ภาคผนวก ก : อาหารเลี้ยงเชื้อ	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
ภาคผนวก ข : ตารางแสดงผลการทดลอง	49
ภาคผนวก ค : รูปประกอบการทดลอง	50
ภาคผนวก ง : แผนภาพแสดงกระบวนการผลิตซีอิ๊ว (แหล่งเก็บน้ำทิ้ง)	62
เอกสารอ้างอิง	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	แสดงอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	7
ตารางที่ 2.2	แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนและปัจจัยอื่นๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	7
ตารางที่ 2.3	แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	8
ตารางที่ 2.4	แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	8
ตารางที่ 2.5	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 จาก Propionibacterium freudenreichii ATCC 13673	18
ตารางที่ 2.6	การผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ	25
ตารางที่ 2.7	วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12	29
ตารางที่ ข.1	แสดงการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ใน complete medium สภาพ stationary flask	49
ตารางที่ ข.2	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสและยีสต์สกัดที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับ complete medium ในสภาพ stationary flask	50
ตารางที่ ข.3	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask	51
ตารางที่ ข.4	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของยีสต์สกัด ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ ข.5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของยีสต์สกัด ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask 53

ตารางที่ ข.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask 54

ตารางที่ ข.7 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask 55

ตารางที่ ข.8 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน น้ำทิ้ง น้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆในปริมาณที่เหมาะสมกับ complete medium ในสภาพ stationary flask 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	แสดง dissimilation ของน้ำตาลกลูโคสโดย Propionic acid bacteria	4
รูปที่ 2.2	แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญ	12
รูปที่ 2.3	structure of vitamin B_{12} are related compound	20
รูปที่ 2.4	เส้นทางทั่วไปสำหรับชีวสังเคราะห์วิตามินบี 12	22
รูปที่ 2.5	โครงสร้างสารสำคัญในเส้นทางสังเคราะห์วิตามินบี 12	23
รูปที่ 2.6	กระบวนการแยกวิตามินบี 12 ให้บริสุทธิ์	28
รูปที่ 4.1	แสดงการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ใน complete medium สภาพ stationary flask	37
รูปที่ 4.2	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสและ yeast extract ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับ complete medium ในสภาพ stationary flask	38
รูปที่ 4.3	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask	39
รูปที่ 4.4	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask	40
รูปที่ 4.5	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 4.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask 42

รูปที่ 4.7 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask 43

รูปที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ กลูโคส ยีสต์สกัด และโคบอลในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเติม กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ และ $CoSO_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรในสภาพ stationary flask 44

รูปที่ 4.9 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ กลูโคส ยีสต์สกัด และโคบอลในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเติม กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ และ $CoSO_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเปรียบเทียบกับ complete medium และน้ำทิ้งในสภาพ stationary flask 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

วิตามินบี 12 หรือ โคบาลามิน (Cobalamins) เป็นผลึกสีแดงคล้ำในรูป ของปริซึม มีสูตรโมเลกุล $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ มีชื่อทางเคมีว่า 5,6-dimethyl benzimidazale cobamide cyanide ในธรรมชาติพบอยู่ในรูปของโคเอนไซม์ในแบคทีเรีย ในรูปโคเอนไซม์จะไม่คงทนต่อแสงและอุณหภูมิ แต่คงตัวถ้าเก็บที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียสในสารละลายน้ำคงตัวที่พีเอช 4 - 6 แต่ไม่คงตัวต่อ วิตามินซี สารไทออล (thiols) และรังสีแกมมา มีความสำคัญต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงในไขกระดูก ถ้าร่างกายขาดหรือไม่สามารถดูดซึม วิตามินบี 12 ได้ จะเป็นโรค เพอนิเซียส อนิเมีย (pernicious anemia) ผู้ป่วยจะมี เม็ดเลือดแดงไม่สมบูรณ์ มีอาการซีด และมีอาการทางระบบประสาท วิตามินบี 12 จึงเป็น สารอาหารที่มีความสำคัญต่อร่างกาย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายวงการ เช่น ในทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร

การผลิตวิตามินบี 12 ในปัจจุบัน ได้มาจากการสังเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เนื่องจากการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางเคมียังไม่ประสบความสำเร็จ มีราคาสูง และอยู่ในรูปที่ร่างกายมนุษย์และสัตว์ ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย Propionibacterium freudenreichii เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตวิตามินบี 12 สามารถเจริญได้ในแหล่งอาหารที่มีปริมาณ คาร์บอน ไนโตรเจน และโคบอลท์ ที่เพียงพอ ซึ่งพบว่า ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทย ที่เป็นอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร มีความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารมากพอที่จะนำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบี 12 และพบว่า การนำน้ำทิ้งมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เป็นการช่วยลดมลภาวะที่ปะปนมากับน้ำทิ้งได้ จึงเป็นการช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งมาทำให้เกิดประโยชน์ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตวิตามินบี 12 ที่มีความสำคัญต่อชีวิตมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุจูงใจในการทำโครงงานพิเศษ

1. วิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อ ทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นวิตามินที่สามารถผลิตได้ จากจุลินทรีย์เท่านั้น
2. เป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์
3. เป็นการลดปัญหามลภาวะ ที่เกิดจากการระบายน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมทางการเกษตร

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารอาหาร ที่จำเป็นต่อการเจริญ และสร้างวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง

วิธีการดำเนินงานโดยย่อ

การดำเนินงานแบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาการเจริญของเชื้อPropionibacterium freudenreichii ใน complete medium

ขั้นที่ 2 ศึกษาการเจริญของเชื้อPropionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง

ขั้นที่ 3 ศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมของอาหาร ที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อ

ขั้นที่ 4 ทำการวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และจัดทำรายงาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา และวิจัยเกี่ยวกับวิตามินบี 12
2. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา เพื่อขยายขนาดการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรม
3. เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และปศุสัตว์
4. เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

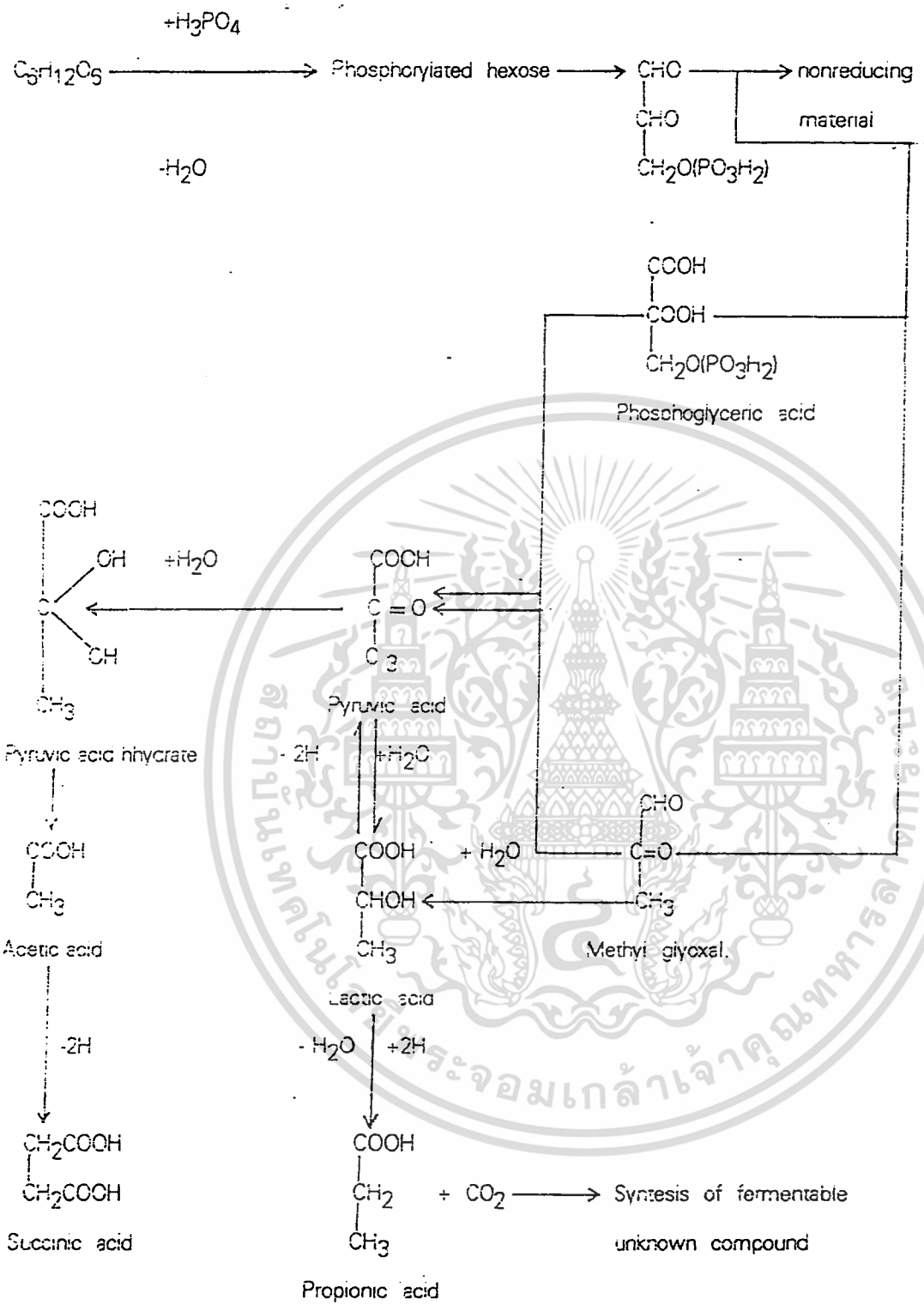
บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. การศึกษาลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.

Propionibacterium freudenreichii (Buchanan et al.,1974) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จาก dairy product , นมดิบ และ Swiss cheese เมื่อเชื้อเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic) จะมีรูปร่างกลม และขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน มักอยู่เป็นคู่หรือสายสั้น ๆ ส่วนในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic) รูปร่างอาจเป็น club - shaped และ branched หรือเป็นท่อนยาว ที่ไม่เคลื่อนที่มี metacromatic granules ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างสปอร์ให้ผล catalase - positive เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จนถึง aero - tolerent สามารถหมักกรดแลคติก กรดไพรูวิก คาร์โบไฮเดรต และ โพลีแอลกอฮอล์ได้กรดโพรพิโอนิค และ กรดอะซิติก คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในสภาพที่ไม่มีอากาศ หรือ microaerophillic fermentation ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการพ่นอากาศลงไปในถังหมัก การเลือกใช้ propionic acid bacteria ในกระบวนการหมักมีประโยชน์มาก เพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นกรด เนื่องจาก มี propionic acid เกิดขึ้นทำให้สามารถป้องกันการ contamination ซึ่งมักจะเกิดกับการหมักธรรมดา การที่สามารถลด contamination และ infection ได้นั้นเพราะว่าระหว่างหมักในสภาพที่ไม่มีอากาศนั้น calcium propionate ทำหน้าที่เป็น bacteriostatic หรือ fungistic แต่ไม่เป็นพิษกับ Propionibacterium (Neyes, 1969)

Wood et al. (1937) 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 (1951) ได้ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ propionic acid bacteria ที่สำคัญคือ Propionibacterium freudenreichii และจาก Propionibacterium shermanii เลี้ยงในอาหารที่มี ส่วนประกอบดังนี้

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, 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
K_2HPO_4 , KH_2PO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0.4	กรัม
NaCl , $FeSO_4$, $MnSO_4$	0.02	กรัม
N/5 phosphate	50	มิลลิกรัม
Buffer pH	6.8	

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 โดยใช้ NaOH ปรากฏว่าให้วิตามินบี 12 จาก Propionibacterium freudenreichii 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และจาก Propionibacterium Shermanii ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณต่ำจากมาตรฐานที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการทดลองค้นคว้าต่อไป เพื่อให้ได้วิตามินบี 12 มากขึ้น โดยการปรับความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเลือก แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และอื่น ๆดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2. ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้กรดแลคติก 10 กรัม แทน dextrose 20 กรัม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน ได้วิตามินบี 12 จาก Propionibacterium freudenreichii และ Propioibacterium shermanii เป็น 100 และ 68 ไมโครกรัมต่อลิตร

ศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ และ กรดแลคติก โดยใช้ basal medium ที่ประกอบด้วย skim milk 1 ส่วน , whey solids 1 ส่วน , น้ำ 2 ส่วน และ $CoCl_2.6H_2O$ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร inoculate และ inoculum ดังตารางที่ 2.1 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.1

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 เปอร์เซนต์ , yeast extract (Difco) 0.3 เปอร์เซนต์ , $CoCl_2.6H_2O$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้ได้ใช้กรดแลคติกที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2 เปอร์เซนต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 10 วัน พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 คือ 1.5 - 2 เปอร์เซนต์ ซึ่งได้วิตามินบี 12 สูงถึง 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.2

1. ศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ basal medium ซึ่งประกอบด้วย N-Z amine 1 เปอร์เซนต์ , yeast extract 0.3 เปอร์เซนต์ , sodium lactate 1 เปอร์เซนต์ และ $CoCl_2.6H_2O$ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร inoculate Prop. Freudenreichii บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 8 วัน ปรับ pH ทุกวัน ดังสภาพในตารางที่ 2.3 ปรากฏว่าสภาพ microaerophilic ได้วิตามินบี 12 มากที่สุด

2. อิทธิพลของ nitrogenous compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยใช้ yeast extract และ beef extract เป็นแหล่งวิตามิน และปัจจัยอื่น ๆ ที่จุลินทรีย์ต้องการ อาหารที่ใช้เตรียม ดังตารางที่ 2.4 เติม $CoCl_2.6H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เชื้อเริ่มของเชื้อ Prop. Freudenreichii อายุ 3 วัน 5 เปอร์เซนต์ ปรับ pH เท่ากับ 7 บ่ม 5 วัน ได้วิตามินบี 12 พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ proteinaceous material จะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เชื้อเริ่มต้น	ปริมาณวิตามินบี12 (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. thermophillus	175
8	Prop. shermanii + Hasen lactic starter	350

ที่มา : Perlman et al. , 1960

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 : Perlman et al. , 1960

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 : Perlman et al., 1960

ตารางที่ 2.4 แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เปอร์เซนต์วิตามินบี 12				ไมโครกรัมต่อลิตร (mg/l)
	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
5	-	0.6	1.0	1.0	440
6	-	1.0	1.0	1.0	460
7	-	-	1.0	1.0	80
8	0.5	-	1.0	1.0	440
9	1.0	-	1.0	1.0	450
10	1.5	-	1.0	1.0	460

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่เติมสารนั้น

ที่มา : Perlman et al., 1960

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sudasky และ Fischer (1954) ได้ทำการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium freudenreichii โดยใช้ molasses เป็นแหล่งคาร์บอน และ waste brewer's yeast เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ครั้ง

1. ใช้ liquid waste brewer's ใหม่ๆ ในปริมาณ 6,000 แกลลอน ซึ่งมีส่วนที่เป็นของแข็ง 12.2 เปอร์เซนต์ แยกเอาออกโดยใช้ที่กรองขนาด 100 mesh ได้ยีสต์ 5,975 แกลลอน ให้ความร้อน 44 องศาเซลเซียส และเก็บโดยการกวนอย่างช้าๆ 10 ชั่วโมงเพื่อให้เกิด autolysis จึงนำไปกรองผ่าน yeast separators จะได้ yeast autolysate ประมาณ 4,000 แกลลอน ประกอบด้วยของแข็ง 6 เปอร์เซนต์ นำไปผสมกับ beet molasses 8,000 แกลลอน และปรับปริมาตรเป็น 10,200 แกลลอน ปรับ pH เป็น 5.1 โดยเติม H_2SO_4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับ pH ให้เป็น 7.0 โดยการเติม aqua ammonia แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 600 แกลลอนลงไป และหมักต่อไป 96 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้าๆ ปรับ pH ระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7.0 ได้วิตามินบี 12 เป็น 17 มิลลิกรัมต่อแกลลอน

2. ใช้ soluble autolyzed brewer's yeast extract ที่แห้ง เช่น yeastamin (Vico Product Company) และ beet molasses 120 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นให้เป็น 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 แตกตัว ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย aqua ammonia ใช้ USP precipitated chalk ขนาด 40 กรัม เติมลงไปเพื่อเป็น buffer เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร ทดลองใน fermentor ขนาด 4 ลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ประมาณ 100 มิลลิลิตร หมักต่อ 96 ชั่วโมง ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้าๆ ได้วิตามินบี 12 เป็น 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Becher et al. (1962) 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 casien acid hydrolyzate	1.0	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
เติม น้ำกลั่นให้ครบ	1.0	ลิตร

ใช้เชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซนต์ อายุ 3-5 วัน ทดลองที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ปรับ pH แต่ละวันเป็น 6.6 เมื่อปริมาณน้ำตาลลดต่ำลงกว่า 0.5 เปอร์เซนต์ เติมน้ำตาลกลูโคส ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในแต่ละวัน เพื่อให้ความเข้มข้นเป็น 1 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก รักษาระดับนี้ไว้ 10 วัน ในวันที่ 5 ของการทดลอง เติม 5,6-dimethylbenzimidazole ในสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ในปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงไปได้ 12 วัน ได้วิตามินบี 12 เป็น 18.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium ssp.

1. อาหาร

แหล่งคาร์บอนมีหลายประเภทคือ ประเภทที่เป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น dextrose , maltose , xylose , invert sugar ,corn syrup , lactose , sucrose , beet หรือ cane molasses และ lactic acid , glucomic acid , citric acid และ glycerol โดยต้องใช้แหล่งคาร์บอน ในปริมาณ 5-10 เปอร์เซนต์ (Baker และ Rose ,1957)

จากการศึกษาของ Osman (1968) กล่าวว่า น้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เหมาะสำหรับการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii ส่วน Hargrove และ Leviton (1951) ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งอาจได้จากการเติมลงไป ในอาหาร หรือได้จากขบวนการ fermentation ของน้ำตาลแลคโตสในนมโดยเชื้อ Lactobacillus casei ที่อยู่ร่วมกับ Propionibacterium spp. และ symbiosis Speedie และ Hall (1960) ศึกษาขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium โดยใช้วิธีการแบบ batch process พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลแลคโตส ซึ่งนิยมใช้ความเข้มข้น 8 - 10 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งไนโตรเจน มักเป็นพวกกรดอะมิโน 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 (1968) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ จากเกลือแอมโมเนีย พบว่าแอมโมเนียซิเตรท แอมโมเนียมฟอตเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii

Kucheras (1972) ศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน จะได้วิตามินบี 12 น้อยกว่าที่ใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนบางอย่าง เช่น glycine , methionine , serine , glutamic , arginine และ α - alanine ช่วยเร่งการผลิตวิตามินบี 12 แต่ cysteine จะยับยั้งขบวนการนี้ Bukin (1960) ใช้ methionine ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 นอกจากนี้ยังพบว่า methionine ทำหน้าที่ methylation

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ โคบอลท์ ไซยาไนด์ และเหล็ก

โคบอลท์ (Co) ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้ามีโคบอลท์ ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม คือ สูงเกินไป จะเป็นพิษกับจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะใช้โคบอลท์ในอาหารได้ในช่วงไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ จะมีผลไปถึงการสร้างวิตามินบี 12 อาจใช้โคบอลท์ในรูปของเกลือที่ละลายในน้ำได้ เช่น cobalt chloride, cobalt sulfate , cobalt nitrate หรือเกลือโคบอลท์อื่น ๆ (Baron , 1962)

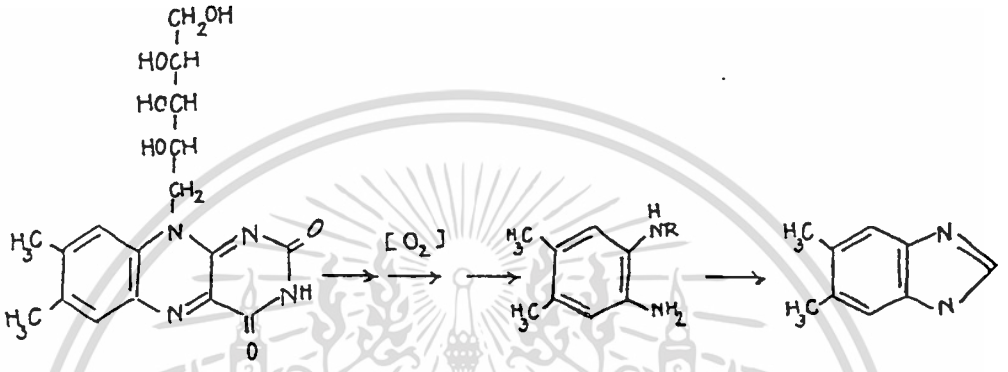
ไซยาไนด์ ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารจะต้องเติมลงในปริมาณที่พอเหมาะไม่เกิน 0.1 - 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ไซยาไนด์จะเติมในรูปของ ammonium cyanide , metal, alkali metal & alkaline earth, metal cyanides , ferrocyanides , ferricyanidases หรือในรูป sodium, potassium, barium , calcium , strontium และรูปอื่นๆ หรือในรูปของเหลว และแก๊ส เช่น hydrocyanic acid, hydrogen cyanide (Baron , 1962)

เหล็ก (Fe) มีความสำคัญต่อการเจริญ และผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii ส่วนแมกนีเซียม มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ทองแดง (Cu) และบิสมัท (Bi) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ธาตุอื่น ๆ นอกจากที่กล่าวมาแล้วไม่มีผลต่อการเจริญ และการผลิต วิตามินบี 12 ขณะที่ผงซักฟอก จะยับยั้งการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 สารที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติในการยับยั้งขบวนการ metabolic ของจุลินทรีย์จะยับยั้งการเจริญ และการสร้างวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii (Petty , 1948)

วิตามินสำคัญที่ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 คือ วิตามินบี 2 จากการค้นคว้าของ Renz (1970) พบว่าสามารถใช้วิตามินบี 2 แทน 5,6-dimethylbenzimidazole ซึ่งเป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12 โดย Propionibacterium shermanii สามารถเปลี่ยนวิตามินบี 2 เป็น 5,6-dimethylbenzimidazole ได้ ซึ่งมี pathway ดังนี้



Prop. shermanii

riboflavin 5,6-dimethylbenzimidazole

รูปที่ 2.2 แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญ

ต่อมา Renz และ Weyhenmeyer (1970) สามารถสังเคราะห์ 5,6-dimethylbenzimidazole ได้จากวิตามินบี 2 โดยเชื้อ Propionibacterium shermanii

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12

สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร ที่เหมาะสมในการเจริญของ Propionic acid bacteria อยู่ระหว่าง 6.8 - 7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 (Prescott และ Dunn ,1959) จะต้องรักษาระดับ pH ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4 ถึง 9 (ที่เหมาะสม 6 ถึง 7) เพราะ pH สูงหรือต่ำกว่านี้ จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจาก cobalamin ไม่คงตัว หรือถูกทำลายได้ง่าย

อุณหภูมิ โดยทั่วไปใช้อุณภูมิในการหมักประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่แบคทีเรียพวกนี้เจริญได้ดี (Prescott และ Dunn , 1959) จึงเหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12 ด้วย Zodrow (1967) ทดลองใช้อุณหภูมิต่างๆ ในการหมักโดยใช้เชื้อ Propionibacterium shermanii พบว่า ได้วิตามินบี 12 มากที่สุดที่อุณหภูมิระหว่าง 18 - 21 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การให้อากาศ ศึกษาโดย Grant (1960) ทดลองกับ Propionibacterium freudenreichii ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหาร ที่ช่วยส่งเสริมในการสร้างวิตามินบี 12 เมื่อถึงช่วงปลาย ของการหมัก อาหารจะขาดคาร์โบไฮเดรต ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดเจริญได้จะต้องมีการ oxygenation หรือ aeration เพื่อให้เกิดฟองอากาศในอาหาร วิธีนี้นิยมใช้ mechanical agitation และปรับ pH ของอาหารให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มปริมาณของวิตามินบี 12 ได้ด้วย

การหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Wood et al. ,1967) ทำได้โดยการผ่าน non - oxidizing gas เช่น ไนโตรเจน หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในอาหาร หรือ รักษาระดับแก๊สเหนืออาหาร ให้สภาวะนั้นไม่ต้องกวน เพราะจะเป็นการนำออกซิเจนลงไปในอาหาร ต่อมาใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้นช่วยรักษาสภาพที่ไม่มีอากาศของอาหาร ในการหมักแบบธรรมดา ระยะเวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารสัมผัสกับอากาศ 70 - 80 ชั่วโมงในระหว่างการหมัก จะเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 มาก แม้ว่าจะให้ออกซิเจนเพียง 24 - 50 ชั่วโมงเท่านั้น ก็ช่วยเพิ่มผลผลิต สภาวะที่ไม่มีอากาศ นิยมทำในช่วงมากกว่าครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ในการหมักเล็กน้อย เมื่ออาหารสัมผัสกับออกซิเจนเป็นการทำให้อยู่ในสภาพ microaerophilic มากกว่าสภาวะที่มีอากาศ เพราะถ้าออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ผลผลิตของ cobalamin น้อยลง

การหมักแบบครั้งคราว (Batch process) (Speedie และ Hall ,1960) ขบวนการผลิต cobalamin โดยเริ่มด้วยหมักอาหารเหลวด้วยเชื้อ Propionibacterium เป็นแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบี 12 ในสภาพที่ไม่มีอากาศ จากนั้นให้อาหารสัมผัสกับออกซิเจน และ recovery วิตามินบี 12 ได้จากอาหารที่ใช้ในการหมักแบบครั้งคราว อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของการหมัก เช่น องค์ประกอบของอาหาร อายุและขนาดของเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิ pH และ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous process) (Speedie และ Hall ,1960) การหมักแบ่งเป็น 2 ตอน ระยะแรกหมักในสภาพไม่มีอากาศ เรียกว่าตอนที่ 1 ระหว่างนี้จะมีการเติมสารอาหารลงไป จะหมักต่อไปถึงตอนที่ 2 ระยะนี้อาหารสัมผัสกับอากาศและเติมอาหารลงไปอีก อัตราในการเติมอาหารลงไปในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 จะต้องมีปริมาตร และความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งการผลิตวิตามินบี 12 จะเกิดขึ้นในการหมักตอนที่ 2

Baron (1962) พบว่าเมื่อเติม thickening agent ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารนั้นโดยไม่ต้องมีการกวน และมีประโยชน์มากในแง่การเจริญและ activity ของเซลล์ ในสภาพนี้ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นและได้ cobalamin เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ thickening agent ที่เติมลงไปทำให้แบคทีเรียมีความทนทาน หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารพิษ ที่มีความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าสภาพธรรมดา เช่น การหมักในสภาพที่มี thickening agent จุลินทรีย์ทนต่อโคบอลท์ และ ไซยาไนด์ออออน ได้ดีกว่าในสภาพปกติ จึงช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 และสามารถใช้ thickening agent เพื่อให้ได้สภาพ microaerophilic และการเพิ่มความหนืด ทำให้อาหารกลายเป็น semi-solid ช่วยป้องกัน ไม่ให้เซลล์ตกไปอยู่ที่ก้นภาชนะ และยิ่งกว่านั้นพบว่าในสภาพที่มีสาร thickening agent เหล่านี้ เราอาจเพิ่มโคบอลท์ได้สูงกว่าขีดที่เหมาะสมได้ เช่นเพิ่มโคบอลท์จาก 20 พีพีเอ็ม เป็น 60 พีพีเอ็ม โดยที่โคบอลท์ไม่มีพิษต่อเซลล์ และยังทำให้ผลผลิตสูงขึ้นด้วย thickening agent ที่ใช้ ได้แก่ วุ้นมีความเข้มข้นในช่วง 0.1 - 0.2 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก corn strach ความเข้มข้น 1.0 - 10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมี thickening agent อื่นๆ ที่ใช้ได้ คือ methyl cellulose, carboxymethyl cellulose, carragenin, pectin, sodium alginate , gum tragacanth , polyvinyl pyrrolidone

ที่ควรระวังอีกเรื่องในการผลิตวิตามินบี 12 ก็คือปกติวิตามินบี 12 เป็น วิตามินที่อยู่ในเซลล์ (intracellular vitamin) ฉะนั้น ถ้าจะให้ได้สมบูรณ์จริงๆ ต้องทำให้เซลล์ เกิดย่อยสลายตัวเอง ถ้าเก็บเซลล์ช้าไปส่วนของวิตามินที่หลุดออกมาจะสลายตัวได้

จากโครงงานพิเศษของคุณกิจจา ช. เจริญยิ่ง และคณะ (2536) ได้ทำการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ ซึ่งศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งอาหารคาร์บอน ไนโตรเจน และโคบอลท์ โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ยีสต์สกัด และโคบอลท์ซัลเฟต เป็นตัวแทนของแหล่งอาหารดังกล่าวตามลำดับ ทำการทดลองโดยเติมสารที่ต้องการทดสอบ หาปริมาณที่เหมาะสมลงไปในน้ำทิ้ง โดยใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชของอาหารให้ได้ 7.0 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างมาวัดอัตราการเจริญ และหาปริมาณเซลล์สูงสุดโดยการวัดความขุ่นของเชื้อโดย Spectrophotometer ที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 144 ชั่วโมง โดยสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้เป็นดังนี้

1. ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

   สูตรอาหารที่ใช้คือ น้ำทิ้งไก่ + น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.5 , 1.0 ,1.5 , 2.0 , 2.5 , 3.0 , 3.5 และ 4.0 เปอร์เซนต์ + ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์

2. ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

   สูตรอาหารที่ใช้คือ น้ำทิ้งไก่ + ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5 , 2.0 , 2.5 , 3.0 , 3.5 และ 4 เปอร์เซนต์ + น้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ปริมาณแหล่งโคบอลท์ที่เหมาะสม

สูตรอาหารที่ใช้คือ น้ำทิ้งไก่ + โคบอลท์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 4 , 6 , 8 , 10 , 12 , 14 , 16 ,18 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลกลูโคส 0.5* เปอร์เซนต์ + ยีสต์สกัด 2* เปอร์เซนต์

* เป็นความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองข้อ 1 และ 2

พบว่าปริมาณแหล่งอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้ได้อัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด คือ น้ำตาลกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซนต์ และโคบอลท์ซัลเฟต ที่ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร

น้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่เมื่อนำมาเติมแหล่งอาหารต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นที่ได้จากการทดลอง นำมาเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เพื่อผลิตวิตามิน บี 12 พบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 238.44 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 96 เมื่อเลี้ยงในสภาวะ stationary flask ซึ่งเมื่อเทียบกับการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Complete medium เป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อ จะได้ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 39.78 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำมาเลี้ยงใน Fermentor โดยใช้ complete medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้วิตามินบี 12 59.69 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งน้อยกว่าการใช้น้ำทิ้งที่เติมสารถึง 77.74 เปอร์เซนต์ ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้คือ 245.73 ไมโครกรัมต่อลิตร

การเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เพื่อการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่สามารถปริมาณ BOD ในน้ำทิ้งจาก 29.4 กรัมต่อลิตร ให้เหลือเพียง 9.76 กรัมต่อลิตร

จากโครงงานพิเศษของคุณณัฐวุฒิ สุรณัฐกุล และคณะ (2536) ได้ทำการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง ซึ่งศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งอาหารคาร์บอน ไนโตรเจน และโคบอลท์ โดยใช้น้ำตาลกลูโคส ยีสต์สกัด และโคบอล์ซัลเฟต เป็นตัวแทนของแหล่งอาหารดังกล่าวตามลำดับ ทำการทดลองโดยเติมสารที่ต้องการทดสอบ หาปริมาณที่เหมาะสมลงไปในน้ำทิ้ง โดยใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอช ของอาหารให้ได้ 7.0 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างมาวัดอัตราการเจริญ และหาปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์สูงสุด โดยการวัดความขุ่นของเชื้อโดย Spectrophotometer ที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 - 144 ชั่วโมง โดยสูตรอาหารและความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ เป็นดังนี้

1. ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

   สูตรอาหารที่ใช้คือ น้ำทิ้งปลา + น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 , 1.0 ,1.5 , 2.0 , 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ + ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์

2. ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

   สูตรอาหารที่ใช้คือ น้ำทิ้งปลา+ ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0, 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ + น้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์

3. ปริมาณแหล่งโคบอลท์ที่เหมาะสม

   สูตรอาหารที่ใช้คือ น้ำทิ้งปลา + โคบอลท์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2 , 4 , 6 , 8 , 10 ,12 , 14 , 16 ,20 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลกลูโคส 1 .0 เปอร์เซนต์ + ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์

พบว่าปริมาณแหล่งอาหารที่เหมาะสม ที่ทำให้ได้อัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด คือ น้ำตาลกลูโคส 0 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 0 เปอร์เซนต์ (น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง มีปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนที่มากเพียงพอ) และโคบอลท์ซัลเฟตที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาทูน่ากระป๋อง เมื่อนำมาเติมโคบอลท์ซัลเฟต 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและเติมสารเพื่อช่วยในการผลิตวิตามินบี 12 คือ methionine 2 มิลลิกรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เพื่อผลิตวิตามินบี 12 พบว่า ได้ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 4.25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 48 เมื่อเลี้ยง ในสภาวะ stationary flask ซึ่งเมื่อเทียบกับการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Complete medium เป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อ จะได้ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 0.64 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 84.94 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาเลี้ยงใน Fermentor โดยใช้ complete medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจะได้วิตามินบี 12 0.6 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งน้อยกว่าการใช้น้ำทิ้งที่เติมสารถึง 85.62 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้คือ 4.59 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จากการวิเคราะห์ค่า BOD ของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องและน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ ในปริมาณที่เหมาะสม พบว่ามีค่า BOD เท่ากับ 34,650 และ 61,000 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เพื่อการผลิตวิตามินบี 12 แล้ว ค่า BOD ลดลงเป็น 97,050 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii สามารถลดค่า BOD ของน้ำทิ้งปลาและน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆได้ 71.86 และ 84.02 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3.สารเริ่มต้น

ความรู้ด้านชีวสังเคราะห์โมเลกุลวิตามินบี 12 พบว่าสารเริ่มต้น (precursors) หลายตัวที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 เช่นหมู่อัลคิล ($-CH_3$) ซึ่งเป็นแขนของโมเลกุลคลอรีนได้จากการเติมเมไทโอนีน (Bray และ Shemin , 1963 ; Shemin และ Bray , 1964 ; Demain และ White ,1971) การเติมสารเบสทาอีน หรือโคลีน (Demain และคณะ ,1968 ;White และ Demain , 1971 ; Ansbacher และคณะ , 1949) มีผลต่อการสังเคราะห์ขั้นแรกๆของคอร์ริน

4.วัตถุดิบ

วัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรีย โพรพิโอนิก คือ น้ำแช่ข้าวโพด ส่วนของแบคทีเรีย Pseudomonas denitrificans คือ กากน้ำตาล น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเต้าหู้ (soybean curd whey) พบว่าเป็นแหล่งที่ดีของการสร้างวิตามินบี 12 ของแบคทีเรีย Propionibacterium freudenreichii ATCC 13673 และ Streptomyces olivaceus เช่นกัน (Yongsmith และคณะ ,1978; Yongsmith และคณะ ,1982 ; Yongsmith และ Apiraktivongse ,1983) วิตามินบี 2 หรือ ไรโบฟลาวินที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (50 ไมโครกรัมต่อลิตร) ทำให้แบคทีเรียโพรพิโอนิก สร้างปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้น (Yongsmith และ Apiraktivongse ,1983) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
30617

ตารางที่ 2.5 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii ATCC 13673

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

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

[a] Flask culture under statical condition

[b] Batch fermentation

ที่มา :Yongsmith และ Apiraktivongse (1983)

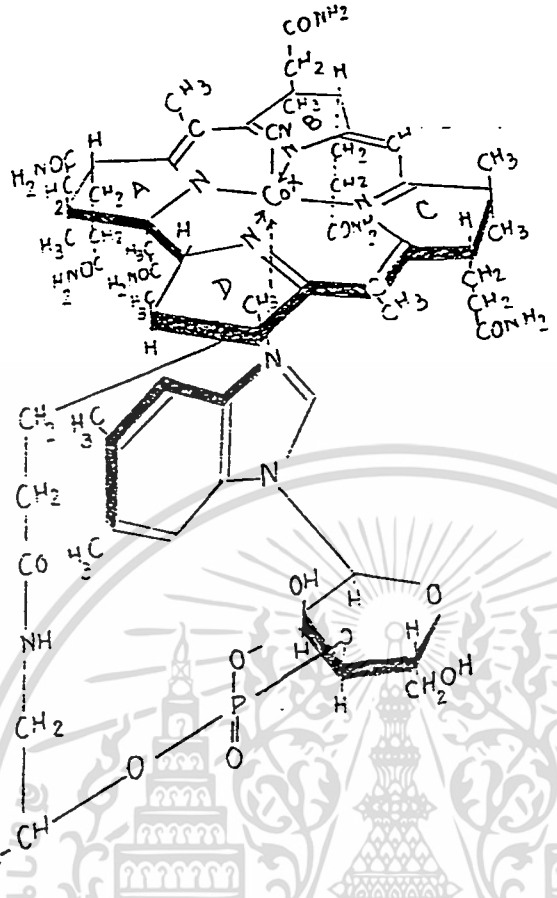
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1962 Minot และ Murphy รายงานว่าตับมีสารที่สามารถรักษาโรค pernicious anemia ได้ และสารนี้ถูกสกัดครั้งแรกออกจากตับในปี 1948 โดย Rickes et al. และ Smith สารนี้มีชื่อว่า วิตามินบี 12 ละลายน้ำได้ มีโมเลกุลใหญ่น้ำหนัก 1350 เป็นผลึกรูปเข็มหรือปริซึม สีแดงเข้ม สูตรเคมีคือ $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ มีโครงสร้างสลับซับซ้อนยากแก่การศึกษา แต่ Hodgkin et al. ก็ได้พยายามศึกษาต่อมา และในที่สุดก็เสนอสูตรโครงสร้างวิตามินบี 12 ได้สำเร็จโดยใช้วิธี x-ray diffraction technique ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าถูกต้อง

โมเลกุลของวิตามินบี 12 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ 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) การเรียกชื่อสารนี้ขึ้นกับสูตรโครงสร้าง คำว่า cobalamin หมายถึงโมเลกุลของวิตามินบี 12 แต่ถ้าแกนกลางของ planar group เป็นสารอื่น ก็มีวิธีการเรียกชื่อแตกต่างกันออกไป แสดงไว้ในรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Trivial names and abbreviations are given in parentheses

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

L = 5'deoxyadenosyl group 6 - (5,6-dimethylbenzimidazolyl)- Co-5'-deoxyadenosylcobamide or 5'-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})

รูปที่ 2.3 structure of vitamin B_{12} are related compound

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีวสังเคราะห์วิตามินบี 12

ชีวสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้มีผู้ศึกษามากมายในเชื้อ Streptomyces olivaceus (Sato และคณะ,1971,1977) Propionibacterium shermanii และ Pseudomonas denitrificans (Ansbacher และคณะ,1949 ; Bray และ Shemin,1963 ; Demain และคณะ ,1968 ; Demain และ White ,1971 ; Friedman และ Cagen , 1970 ; McDaniel 1961 ;Miller และ Rosenbaum , 1960 ;Shemin และ Bray , 1964)

ดังภาพแสดงในภาพที่ 2.4 และ 2.5 จะเห็นว่าในขั้นตอนแรกเริ่มคือ ขั้นการสร้างวงแหวนคอร์ริน (corrin ring) จากสารเริ่มต้น ซัคซินิลโคเอ (succinyl CoA) และ ไกลซีน (glycine) รวมกันได้ กรดเดลตาอะมิโนลีวูลินิก (δ-aminolaevulinic acid) โดยมีการสร้างส่วนต่างๆคือ A ,B ,C และ D โดยที่แต่ละส่วนนี้เรียกว่า พอร์ฟอบิลิโนเจน (porphobilinogen) ซึ่งจะมาจับกันโดยเอนไซม์ดีอามิเนส (deaminase) และไอโซเมอเรส (isomerase) ได้สาร ยูโรไฟริโนเจน III (urophyrinogen III) และเกิดปฏิกริยาต่างๆ พอสรุปได้ว่า

1. มีการเชื่อมต่อระหว่างวงแหวน (ring) โดยตรง ระหว่าง A และ D โดยปฏิกริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) และไอโซเมอไรเซชัน (isomerization)

2. เกิดเมทิลเลชัน (methylation) โดยเมทิโอนีน (methionine) ในอาหารจะเติมหมู่ $-CH_3$ กับนิวเคลียสคอร์ริน 7 จุด สารที่ให้หมู่เมทิล (methyl donor) ดังกล่าวอาจเป็นเมทิโอนีน โคลีน (choline) หรือเบทะอีน (betaine)

3. ปฏิกริยา decarboxylation ที่วงแหวน C เปลี่ยน A จาก CH_2-COOH เป็น CH_3 group

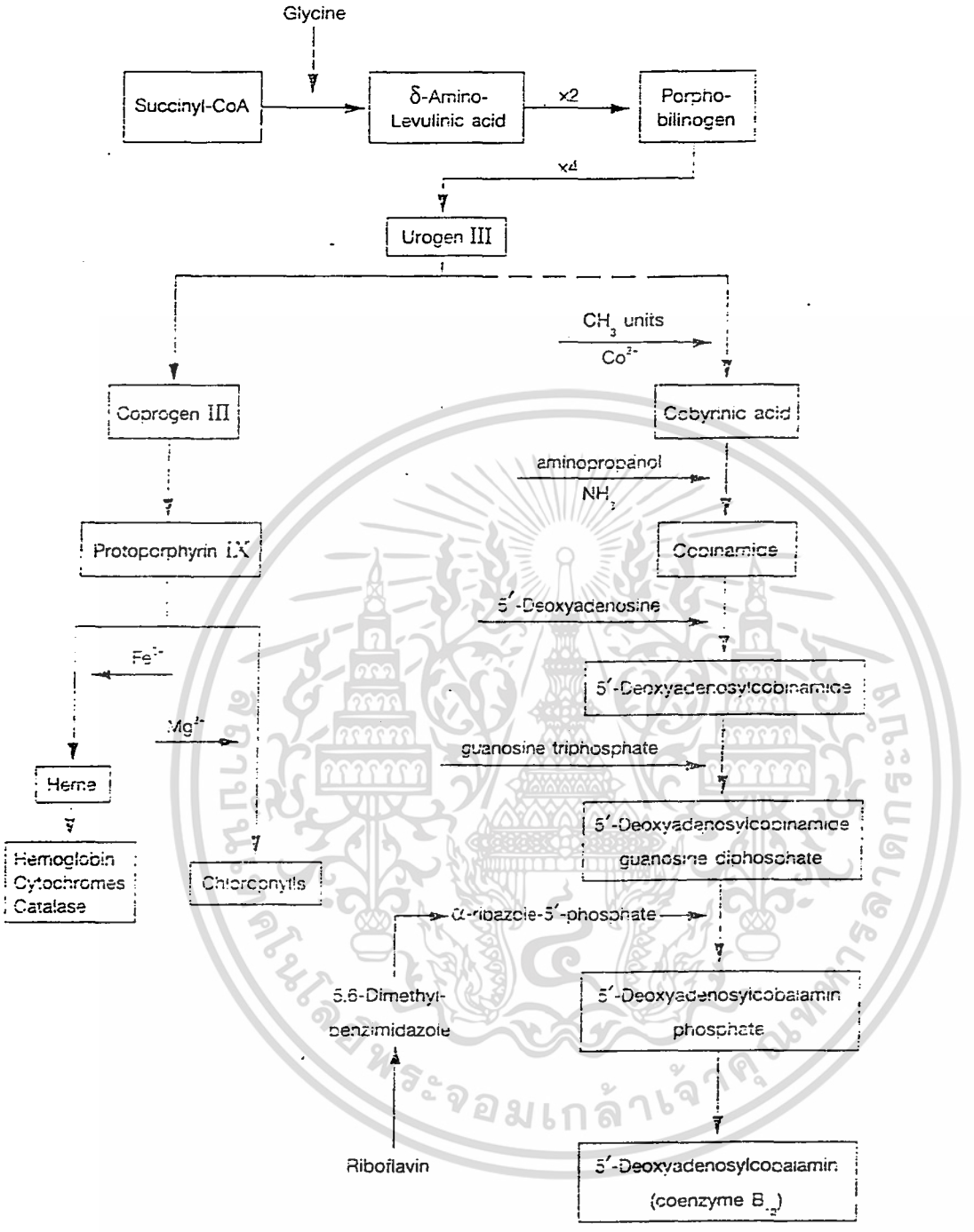
4. โคบอลท์จะเข้าไปรวมที่ศูนย์กลาง ถึงขั้นนี้นิวเคลียสคอร์รินจะสมบูรณ์

ขั้นถัดไปเป็นการเชื่อมของส่วน upper ligand เช่น 5'-deoxyadanosyl จะเข้าไปเป็น upper ligand ของโมเลกุลโดยต่อกับโคบอลท์

ขั้นสุดท้ายเป็นการเชื่อม lower ligand เข้าไปต่อกับโคบอลท์ที่ส่วนล่าง โดยผ่านกระบวนการที่มีการสร้างสิ่งต่างๆดังนี้ การเชื่อมของ nucleotide residue การสร้าง 5,6-dimethylbenzinmidazoleriboside (DMR riboside) และการสร้างเพียวรีน

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

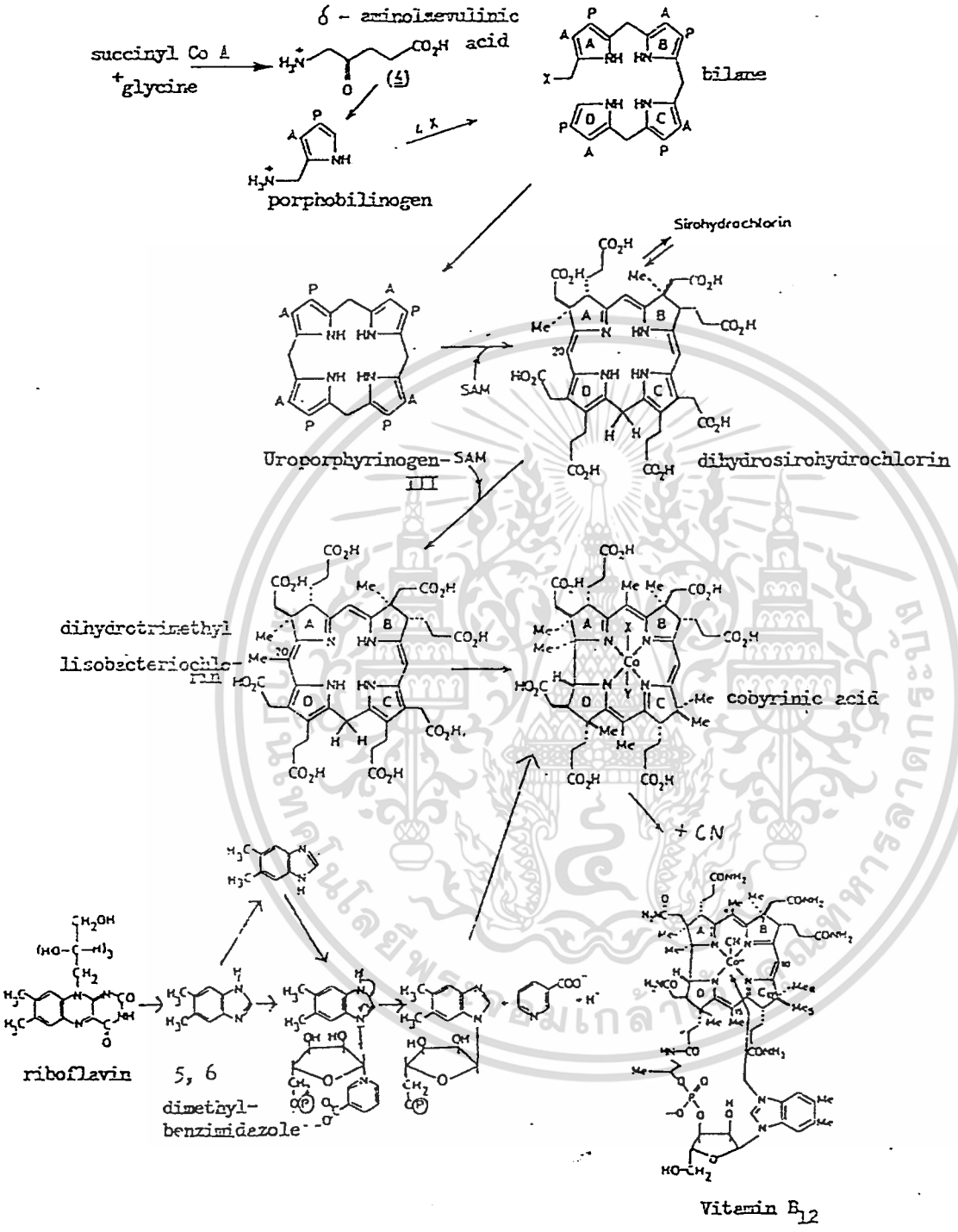
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 เส้นทางทั่วไปสำหรับชีวสังเคราะห์วิตามินบี 12

ที่มา : Florent และ Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 โครงสร้างสารสำคัญในเส้นทางสังเคราะห์วิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12

แบคทีเรียเป็นแหล่งสำคัญของการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ถัดไปคือ สาหร่าย ส่วนเชื้อรา และ ยีสต์ ยังไม่พบรายงานว่าเป็นแหล่งผลิตวิตามินบี12 แบคทีเรียที่สามารถผลิตมีหลายสกุล เช่น Bacillus , Clostridium , Pseudomonas , Streptomyces , Proteus , Escherichia , Flavobacterium , Rhizobium , Azobacter , Serratia , Staphylococcus เป็นต้น Actinomyces บางสายพันธุ์ เช่นสกุล Micromonospora , Mycobacterium , Nocardia , Streptomyces สาหร่าย เช่นสกุล Chlorella , Scenedesmus , Anabaena , Calothrix , Plectonema , Ceraniur , Chambia และ Spirulina

เริ่มแรกวิตามินบี 12 ที่ใช้รักษาโรคของคนและเป็นอาหารเสริมของสัตว์ ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น สเตรปโตมัยซิน ผลิตโดย Streptomyces griseus (Smith และ Ball, 1953) นีโอมัยซินโดย S. fradiae (Jackson และ คณะ, 1951) คลอเตตตราไซคลินโดย S. aureofaciens (Pierce และคณะ,1950) ฯลฯ โดยมีการนำน้ำหมักไปสกัดเอาสารปฏิชีวนะ ส่วนกากเซลล์จะมีทั้งสารปฏิชีวนะ และวิตามินบี 12 ก็นำมาสกัดแยกใช้ต่อไป แต่ที่จัดเป็นพันธุ์อุตสาหกรรมสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้มาก มีเพียงไม่กี่เชื้อ มีชื่อดังนี้คือ Bacillus megaterium , Pseudomonas denitrificans , Streptomyces olivaceus และ /หรือ S. griseus และ Propionibacterium shermanii ซึ่งแหล่งอาหารคาร์บอนและปริมาณที่ผลิตได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.6

การวิจัยการผลิตวิตามินบี 12

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

1. ต้องการความรู้ที่ดีขึ้นในเส้นทางชีวสังเคราะห์ เพื่อช่วยในการศึกษาทางชีวเคมี และพันธุกรรม
2. เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ที่มีประโยชน์เช่น แบคทีเรียโพรพิโอนิก และ Pseudomonas
3. เพื่อหาแหล่งสารอาหารราคาถูก
4. เพื่อปรับปรุงการสกัดวิตามินบี 12 และการทำให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 การผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์	แหล่งอาหารคาร์บอน	ปริมาณวิตามินบี 12 (มิลลิกรัม/ ลิตร)
Micromonospora sp.	Glucose	11.5
Nocardia rogusa	Glucose -cane molasses	14.0
Propionibacterium freudenreichii	Glucose	26.0
Propionibacterium shermanii	Glucose	23.0
Propionibacterium shermanii	Glucose	28.0
Propionibacterium shermanii	Glucose	39.0
Propionibacterium vannielli	Glucose	25.0
Pseudomonas denitrificans	Beet molasses	59.0
Streptomyces olivaceus	Glucose-lactose	8.5
Mixed methanogenic bacteria	Methanol	35.0
Bacterium FM- 02T	Methanol	2.6
Methanobacillus omelianskii	Methanol	8.8
Protaminobacter ruber	Methanol	2.5
Corynebacterium and Rhodopseudomonas	n-Paraffin	2.3
Nocadia gardneri	Hexadecane	4.5

ที่มา : Florent และ Ninet (1979)

อย่างไรก็ตามปัจจุบันโรงงานผลิตวิตามินบี 12 บางแห่งในสหรัฐอเมริกาใช้วิวแตนท์ของแบคทีเรีย Pseudomonas denitrificans ซึ่งให้วิตามินบี 12 สูงถึง 60 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเก็บเกี่ยววิตามินบี 12

การแยกวิตามินบี 12 จากเซลล์และอาหารหมักได้มีการปรับปรุงหลายครั้งหลายคราว ในช่วง 30 ปี โดยทั่วไปมีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้ : การละลายโคบาลามิน และเปลี่ยนรูปเป็นไซยาโนโคบาลามีน โดยการเติมโพแทสเซียมหรือ โซเดียมไซยาไนด์และแยกผลิตภัณฑ์หยาบที่มีความบริสุทธิ์ 80 เปอร์เซนต์ (นำไปใช้เป็นสารเสริมอาหารสัตว์โดยตรง) หลังจากนั้นขั้นต่อไป คือ การทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 95 -98 เปอร์เซนต์ (ใช้ในทางการแพทย์) เริ่มต้นการสกัดอาจใช้น้ำหมักที่มีเซลล์ปนอยู่ด้วย หรือเฉพาะเซลล์ก็ได้นำมาผ่านความร้อนขนาด 80 -120 องศาเซลเซียสนาน 10 -30 นาที ที่พีเอช 4.6 - 6 โดยมีสารไซยาไนด์ในรูปของเกลือโพแทสเซียมหรือกำมะถันอยู่ด้วย เพื่อให้วิตามินบี 12 ที่สังเคราะห์ภายในเซลล์เปลี่ยนมาอยู่ในรูปไซยาโนโคบาลามินที่คงตัวกว่าให้หมด กระบวนการสกัดวิตามินบี 12 แสดงดังในภาพที่ 2.6 เป็นวิธีที่รับรองกันว่าดี มีประสิทธิภาพและราคาถูก

วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12

วิตามินบี 12 วิเคราะห์ได้หลายวิธีได้แก่ วิธีทางเคมีและฟิสิกส์ (Spallaและคณะ ,1989) และทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ละเอียดกว่า ดังแสดงในตารางที่ 2.7

Mjcrobiological assay เป็นเทคนิคทางจุลชีววิทยาที่ใช้จุลินทรีย์เป็นตัวทดสอบหาสารต่างๆ โดยมีหลักเกณฑ์ว่า จุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นตัวทดสอบนั้นจะต้องมีความต้องการจำเพาะต่อสารนั้นในการเจริญจริงๆ ถ้าหากไม่มีสารตัวนั้นแล้ว จุลินทรีย์นั้นจะไม่สามารถเจริญได้เลย หรือถึงได้ก็เจริญเติบโตได้น้อยมาก จนเห็นความแตกต่างได้อย่างแน่ชัด

การวัดผลการทดสอบ

แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ

1. Tube method ใช้เลี้ยงเชื้อในหลอดทดสอบ อ่านผลจาก
    1.1 Turbidimetric method อ่านผลจากความขุ่นของเซลล์ หากตัวทดสอบเจริญดีเพราะมีสารมาก ความขุ่นก็มากตาม ถ้าสารนั้นน้อยมากการเจริญเติบโตก็ลดต่ำลง ความขุ่นของเซลล์ก็บางลง
    1.2 Titration method อ่านผลจากปริมาณกรดที่จุลินทรีย์ทดสอบสร้างขึ้นมาถ้ากรดมากก็แสดงว่ามีสารทดสอบมาก ถ้ากรดน้อยก็แสดงว่าจุลินทรีย์เจริญเติบโตต่ำสร้างกรดน้อย
2. Plate method หรือบางแห่งเรียกว่า Cup - plate method เลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อดูผลจาก Growth zone

ข้อแตกต่างบางประการของจุลินทรีย์ที่ตัวทดสอบหาวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Lactobacilli

นิยมใช้กันมากมี L. lactis ใช้หาปริมาณวิตามินบี 12 มาตั้งแต่ต้น ต่อมาพบ L. leichmanii ซึ่งไวต่อการหาวิตามินบี 12 มากกว่า L.lactis มักใช้ในการวัดการเจริญเป็นความขุ่นของเซลล์แบบ tube method โดยใช้เวลา 24 ชั่วโมง แต่ถ้าอ่านด้วยการไตเตรตต้องบ่มเชื้อไว้ 3 วัน

2. Escherichia coli (mutant type)

ปกติ Escherichia coli ไม่ต้องการวิตามินบี 12 ต่อมามีผู้ใช้แสงยูวี ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สายพันธุ์Escherichia coli มีคุณสมบัติ met B_{12} นิยมใช้กับการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อเทคนิคไม่ดีเกิด back mutation ได้เสมอ

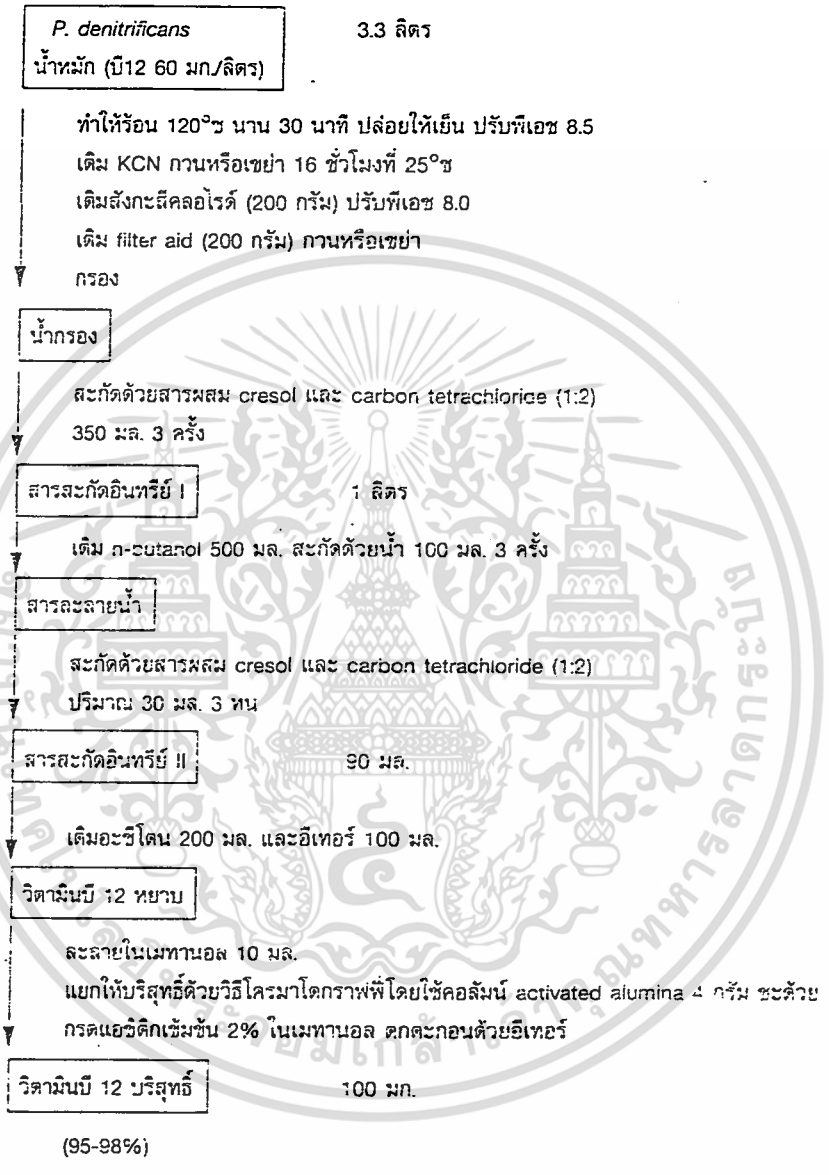
3. Euglena gracillis

ใช้วิธี tube method อ่านความขุ่นของเซลล์ แต่ต้องระวังเพราะว่ามักจะมีเชื้ออื่นปะปนง่าย เพราะว่าเชื้อยูกลีนา โตช้า ต้องใช้เวลานาน 5 - 8 วัน จึงจะอ่านผลได้

4. Ochromonas malhamenis

เชื้อนี้ไวต่อวิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin และโคเอนไซม์ แต่เจริญได้ช้า เวลาใช้ต้องระวังแบคทีเรียอื่นเข้าปะปนได้ อาจต้องใช้ตู้เขี่ยเชื้อ แยกต่างหาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 กระบวนการแยก วิตามินบี12 ให้บริสุทธิ์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Merck and Co. Inc. (1971) และ Florent and Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12

จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์	วิธีการ	รูปวิตามินบี 12 วิเคราะห์ได้	เอกสารอ้างอิง
bacteria				
Lactobacillus lactis	(Dorner strain)	T,A	cobamides	Shorb (1947,1948)
Lact. Leichmanii	ATCC 4797 ATCC7830	T, A		Skeggs และคณะ (1948)
Escherichia coli	ATCC 9637 มิวแตนท์ สายพันธุ์ 113-3		Cobinamides Cobamindes	Davis และ Mingiola (1950)
protozoa				
Euglena gracillis			Coenzyme B_{12}	Hutner และคณะ (1949)
Ochromonas malhamensis			Coenzyme B_{12}	Ford (1953)

หมายเหตุ T = วัดความขุ่นของการเจริญ (turbidity)

A = วัดปริมาณกรดที่เกิด (acidity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

Propionibacterium freudenreichii ใช้ในการศึกษา ได้รับจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นนำมาทำ stock culture เก็บรักษาไว้ภายใต้ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใน MRS agar stab (ภาคผนวก ก.)

วัสดุเหลือใช้

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซอสถั่วเหลือง จากโรงงาน ง่วนเชียงอุตสาหกรรมอาหาร จำกัด ตั้งอยู่ที่ พระประแดง กรุงเทพมหานคร

อปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Autoclave
2. Flask 250 ml
3. Hot air oven
4. Larminar air flow
5. Pipett 1 ml , 5 ml , 10 ml
6. Plate
7. Spectrophotometer (รุ่น DR/ 4000 ของ Hach Company , 1996)
8. Suction Pump
9. Cuvette
10. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

สารเคมี

1. Acid Hydrolysis of casein
2. Pancreatic digest of casein
3. Pancreatic acid
4. Biotin
5. Glucose
6. Yeast extract
7. NaH_2PO_4
8. K_3PO_4
9. $MgCl_2.6H_2O$
10. $FeSO_4$
11. $CoSO_4.7H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการทดลอง

ขั้นแรก ทำ Growth curve ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (ใน Complete medium ; CM) และหาเวลาที่เชื้อใช้ในการเจริญให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับการเจริญในน้ำทิ้ง

ขั้นที่สอง ทำการศึกษาหาความอุดมสมบูรณ์ของน้ำทิ้ง (หาปริมาณสารอาหาร) โดยจะทำการศึกษาธาตุอาหารหลักที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์คือ คาร์บอน และ ไนโตรเจน ซึ่งทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เพื่อทำ Growth curve ในอาหารดังนี้

- น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองเดี่ยวๆ
- น้ำทิ้งเติมกลูโคส 1 % (ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ใน CM)
- น้ำทิ้งเติมยีสต์สกัด 0.5 % (ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ใน CM)
- น้ำทิ้งเติมกลูโคส 1 %และยีสต์สกัด 0.5 %

ขั้นที่สาม ศึกษาหาปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้ง

- ปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม โดยจะทำการเติมกลูโคสที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พร้อมด้วยยีสต์สกัด 0.5 %ในน้ำทิ้ง นำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำ Growth curve เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณที่เหมาะสม
- ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยจะทำการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พร้อมด้วยกลูโคส 1 %ในน้ำทิ้ง นำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำ Growth curve เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณที่เหมาะสม
- ปริมาณ COBALT ที่เหมาะสม โดยจะทำการเติม $CoSO_4$ ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน พร้อมด้วยกลูโคส 1 % และยีสต์สกัด 0.5 % ในน้ำทิ้งนำไปเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำ Growth curve เพื่อเปรียบเทียบหาปริมาณที่เหมาะสม

ขั้นสุดท้าย เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่างๆและหาปริมาณธาตุอาหารหลัก และปริมาณ COBALT ที่เหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12

1.1 การเตรียม Complete medium ศึกษาการเตรียมและรายละเอียดในภาคผนวก ก.

1.2 การเตรียมน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง เพื่อการเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 แบ่งน้ำทิ้งใส่ขวดสีชาแช่แข็งไว้ เพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้

1.2.2 เมื่อจะนำมาใช้ให้ละลายโดยแช่ในอ่างที่มีน้ำหล่ออยู่

1.2.3 แยกเอาตะกอนที่แขวนลอยออก โดยการกรองด้วยชุดกรองต่อกับ Suction pump ของ MFG CORP. Model U523-V4-G21DX โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ เบอร์ 5 ตามลำดับ

1.2.4 เติมสารเคมีบางชนิดในปริมาณที่ต้องการศึกษาในแต่ละการทดลอง

1.2.5 ปรับพีเอชตามต้องการด้วย NH_4OH 15 % HCl 15 %

1.2.6 นำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.การหาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดใน Complete medium

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

2.1.1 ถ่ายเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จาก Agar stab ลงใน Complete medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุใน Flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.1.2 บ่ม Flask ในข้อ 2.1.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน

2.1.3 เมื่อครบวันที่ 4 นำมาวัดปริมาณเซลล์โดยวัดความขุ่นของเชื้อ (Optical density ; OD.) โดยใช้ Complete medium เป็น Blank ที่ความยาวคลื่น 660 nm ด้วย Spectrophotometer รุ่น DR / 4000 ของ Hach Company ,1996

2.1.4 ทำสารละลายของเชื้อให้เจือจางจนได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.5 โดยใช้ Complete medium ในการเจือจาง ใช้สารละลายที่ได้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองแต่ละครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การเลี้ยงเชื้อใน Complete medium

2.2.1 เตรียม Complete medium บรรจุใน Flask ขนาด 250 มิลลิลิตร Flask ละ 50 มิลลิลิตรเติมกล้าเชื้อ (ใช้กล้าเชื้อ 5 %) จากข้อ 2.1.4 ลงใน Flask โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.2.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บผลที่ระยะเวลาต่างๆกันดังนี้คือ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120

2.2.3 นำแต่ละ Flask มาวัดค่า OD. ที่ระยะเวลาดังกล่าว โดยใช้ Complete medium เป็น Blank

2.2.4 บันทึกค่า OD. ที่ได้ หาค่าเฉลี่ยในแต่ระยะเวลาที่กำหนด

2.2.5 วาดกราฟแสดงการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นกราฟระหว่าง ค่า OD. เฉลี่ย กับ ระยะเวลา โดยให้แกนตั้งของกราฟเป็นค่า OD. และแกนนอนเป็นช่วงเวลา

2.2.6 หาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด โดยอ่านผลจากกราฟแสดงการเจริญเติบโต ปริมาณเซลล์สูงสุดอ่านค่าได้จาก OD. ที่มีค่าสูงสุด

3. ศึกษาการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง

3.1 เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่มีใน Complete medium ต่อน้ำทิ้ง

3.1.1 เติมน้ำทิ้งอย่างเดียวลงใน Flask ที่1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.1.2 เติมยีสต์สกัด ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาณ 0.5 % ลงในน้ำทิ้งเป็น Flask ที่ 2

3.1.3 เติมน้ำตาลกลูโคส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณ 1 % ลงในน้ำทิ้งเป็น Flask ที่ 3

3.1.4 เติมน้ำตาลกลูโคสและยีสต์สกัด ปริมาณ 1 %และ 0.5 % ตามลำดับลงในน้ำทิ้ง เป็น Flask ที่ 4

3.1.5 ทำการหาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในการหาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดใน Complete medium โดยใช้นำทิ้งทั้ง 4 สภาวะเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.6 เปรียบเทียบการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดของน้ำทิ้งทั้ง 4 สภาวะ และ Complete medium จาก Growth curve

4. ศึกษาหาปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้ง

4.1 เปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน Complete medium ในน้ำทิ้งที่ไม่เติมสารอาหารใดๆและน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส ในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 % ตามลำดับ พร้อมด้วยยีสต์สกัด 0.5 % ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.2

4.2 เปรียบเทียบปริมาณของยีสต์สกัด

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน Complete medium ในน้ำทิ้งที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ และน้ำทิ้งที่เติมยีสต์สกัดในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 10.0, 15.0 และ 20.0 %ตามลำดับ พร้อมด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 % ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจิญและปริมาณเซลล์สูงสุดเช่นเดียวกับข้อ 2.2

4.3 เปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน Complete medium ในน้ำทิ้งที่ไม่เติมสารอาหารใดๆและน้ำทิ้งที่เติม โคบอลท์ในรูป $CoSO_4$ ในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 14.0, 16.0 และ 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.2

4.4 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งที่เติม กลูโคส ยีสต์สกัด และโคบอลท์ ในปริมาณที่เหมาะสม

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน complete medium และในน้ำทิ้งที่เติมกลูโคส ยีสต์สกัด และโคบอลท์ในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ ปรับพีเอชของอาหารให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดเช่นเดียวกับในข้อ2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

1.ผลการศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซอสถั่วเหลือง และน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน complete medium , น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง , น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส, น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมยีสต์สกัด และ น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมทั้งกลูโคสและ ยีสต์สกัด ในปริมาณที่เท่ากับใน complete medium พบว่า น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมทั้งกลูโคสและยีสต์สกัด มีอัตราการเจริญและให้ปริมาณเซลล์สูงสุด และการเจริญของเชื้อใน น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ มีอัตราการเจริญที่ต่ำที่สุด ส่วนการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคสและน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมยีสต์สกัดจะมีอัตราการเจริญที่ใกล้เคียงกัน แต่ยังต่ำกว่าการเจริญของเชื้อใน complete medium ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ยังมีความต้องการในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอยู่ เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด

2. ผลการเปรียบเทียบปริมาณกลูโคส

ผลการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.0 , 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ พร้อมด้วย ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ พบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส ปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ จะมีอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุด ดังรูปที่ 4.3

3. ผลการเปรียบเทียบปริมาณยีสต์สกัด

ผลการศึกษาปริมาณยีสต์สกัด ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆคือ 0.1 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 4.0 , 10.0 , 15.0 และ 20.0 เปอร์เซนต์ พร้อมด้วยกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ พบว่าในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมยีสต์สกัด 2.0 เปอร์เซนต์มีอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดดังแสดงในรูปที่ 4.4 และ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

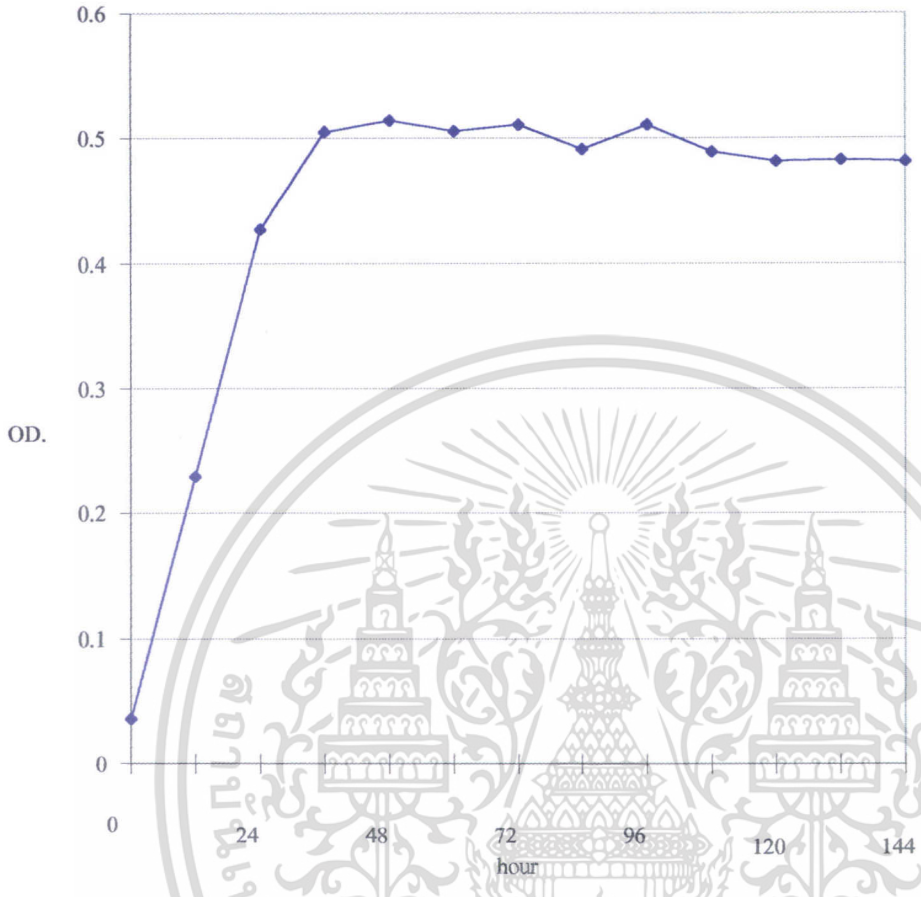
4. ผลการเปรียบเทียบปริมาณโคบอลท์

ผลการศึกษาปริมาณโคบอลท์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติม โคบอลท์ที่ความเข้มข้น 0 , 2 , 4 , 6 , 8 , 12 , 14 ,16 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมด้วยกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และ ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ พบว่าปริมาณ $CoSO_4$ ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรมีการเจริญของเชื้อสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7

5.ผลการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์สูงสุด และอัตราการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงเชื้อใน complete medium น้ำทิ้ง ในน้ำทิ้งที่เติมกลูโคส ยีสต์สกัด และ โคบอลท์ ในปริมาณที่เหมาะสม คือ กลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซนต์ และ $CoSO_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

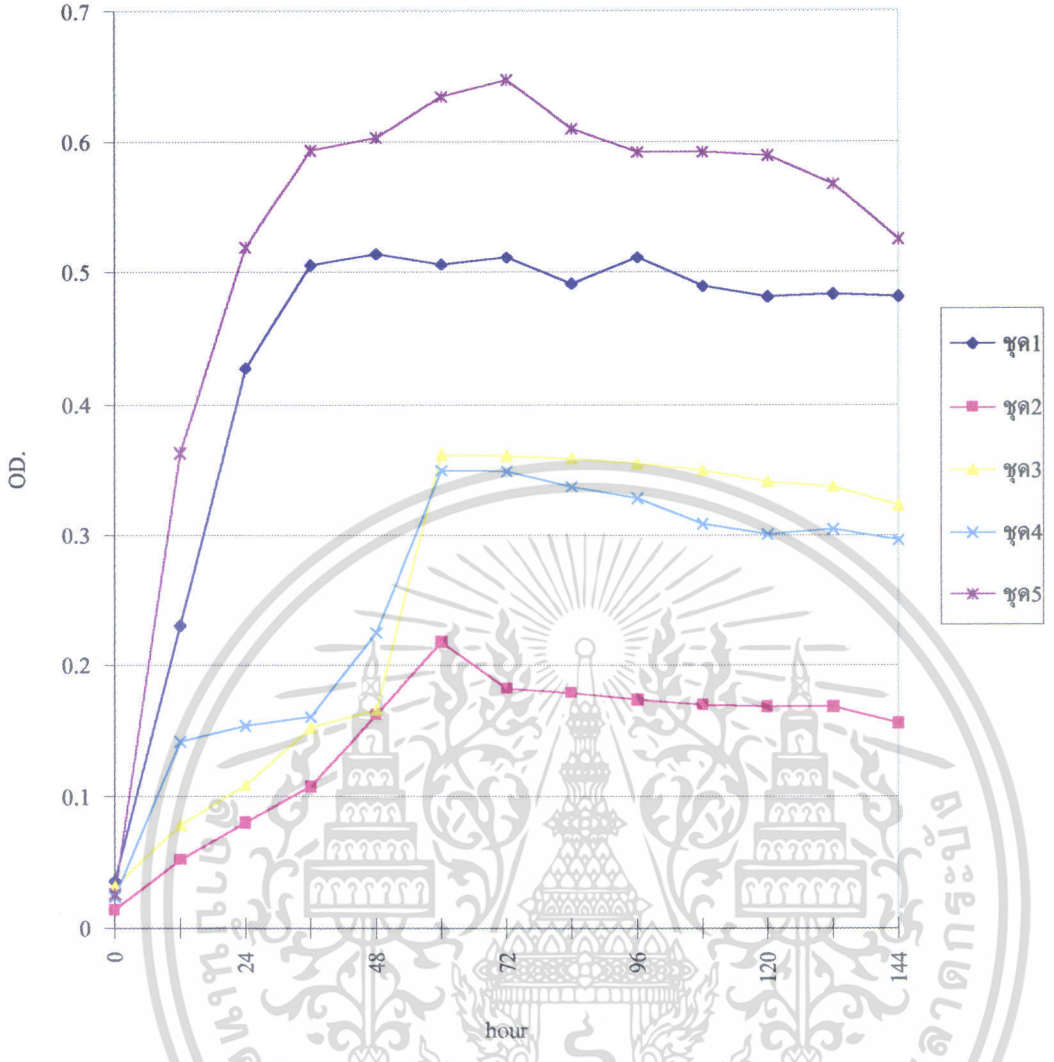
ผลการทดลองพบว่า ในน้ำทิ้งที่มีการเติมสารอาหารทั้ง สามชนิดในปริมาณที่เหมาะสม อัตราการเจริญของเชื้อ จะสูงกว่าการเจริญใน complete medium ถึง 306เปอร์เซนต์ และมีอัตราการเจริญสูงกว่าในน้ำทิ้งธรรมดาถึง 719เปอร์เซนต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร complete medium เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - complete medium

ชุดที่ 2 - น้ำทิ้ง

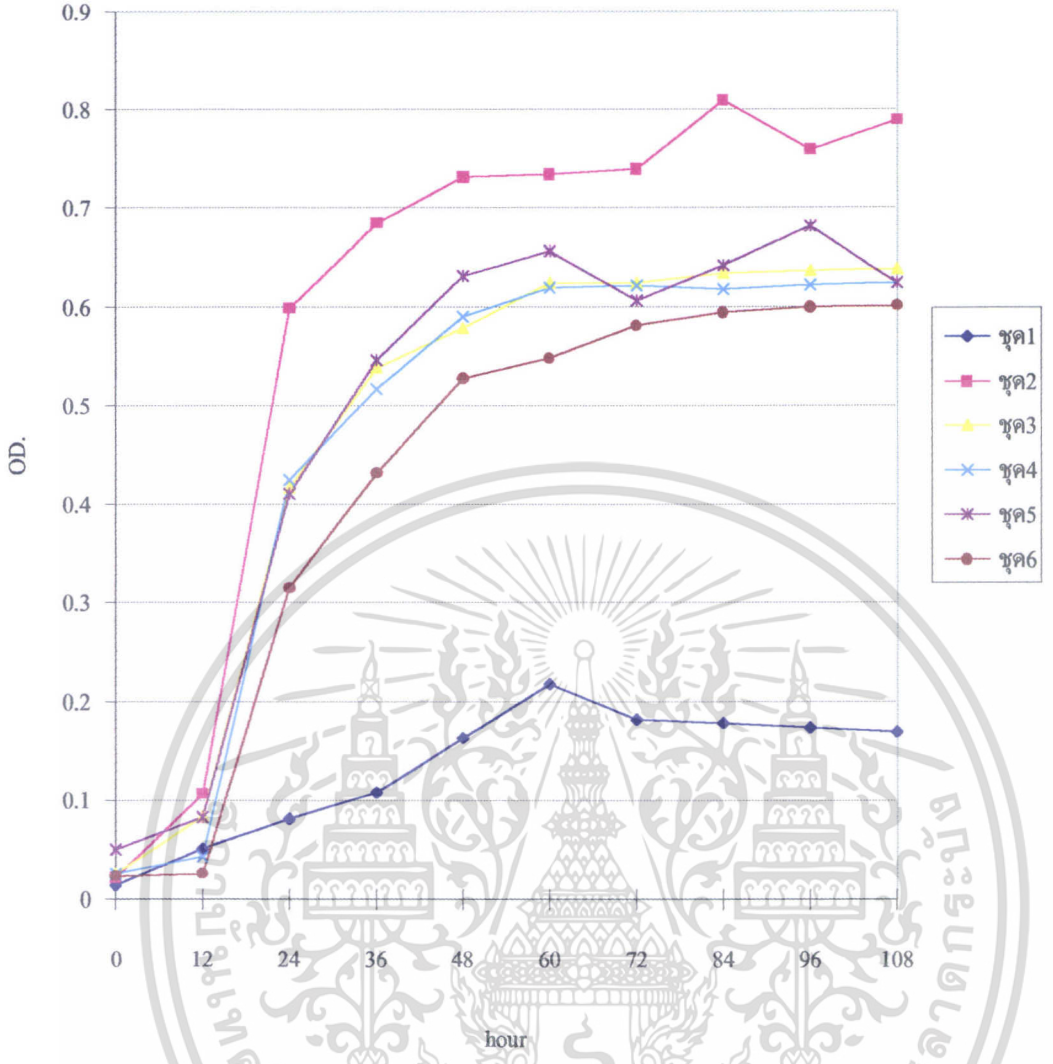
ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์

ชุดที่ 4 - น้ำทิ้ง + yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์

ชุดที่ 5 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ + yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์

รูปที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคส และ yeast extract ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับ complete medium ในสภาพ stationary flask

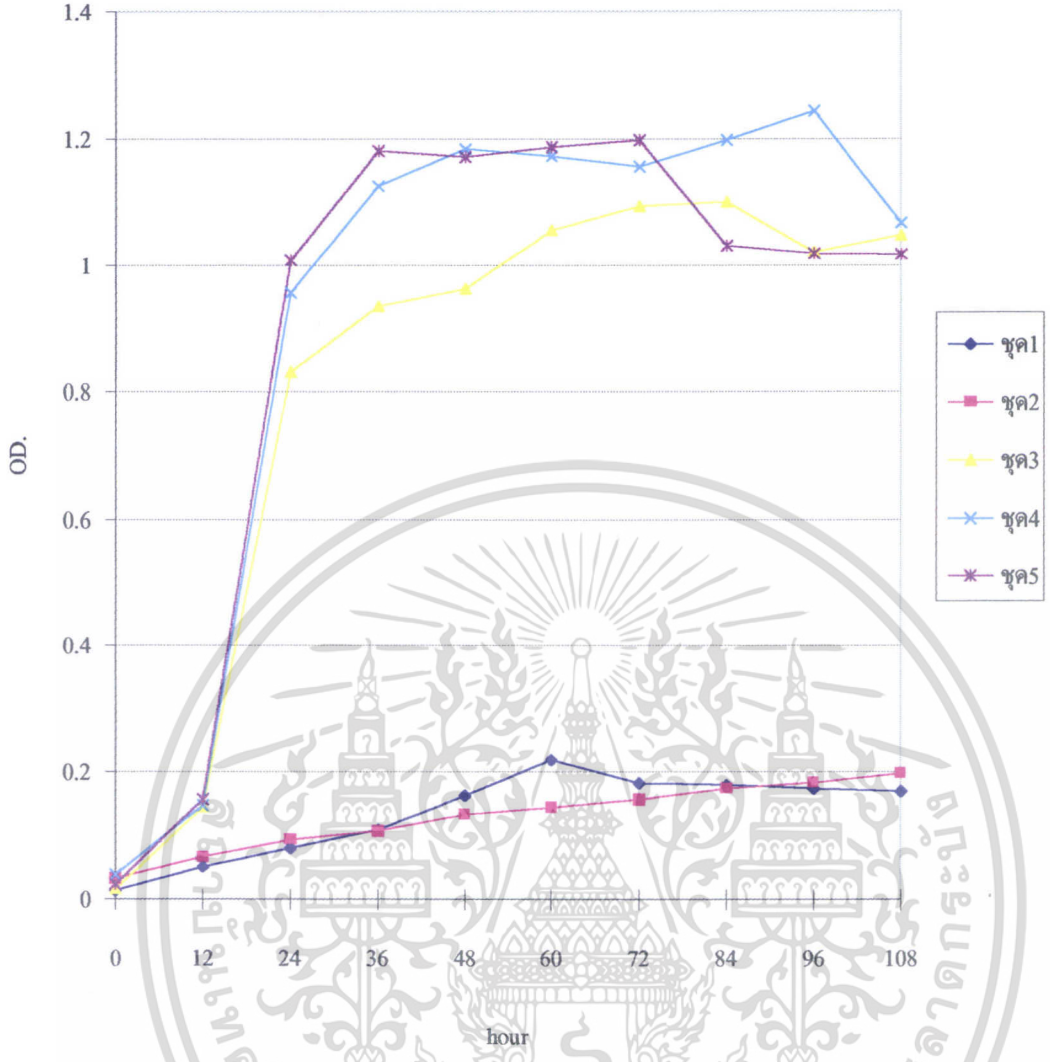
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - น้ำทิ้ง
ชุดที่ 2 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 1.5 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 4 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 2.0 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 5 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 2.5 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 6 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 3.0 เปอร์เซนต์

รูปที่ 4.3 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคส ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask

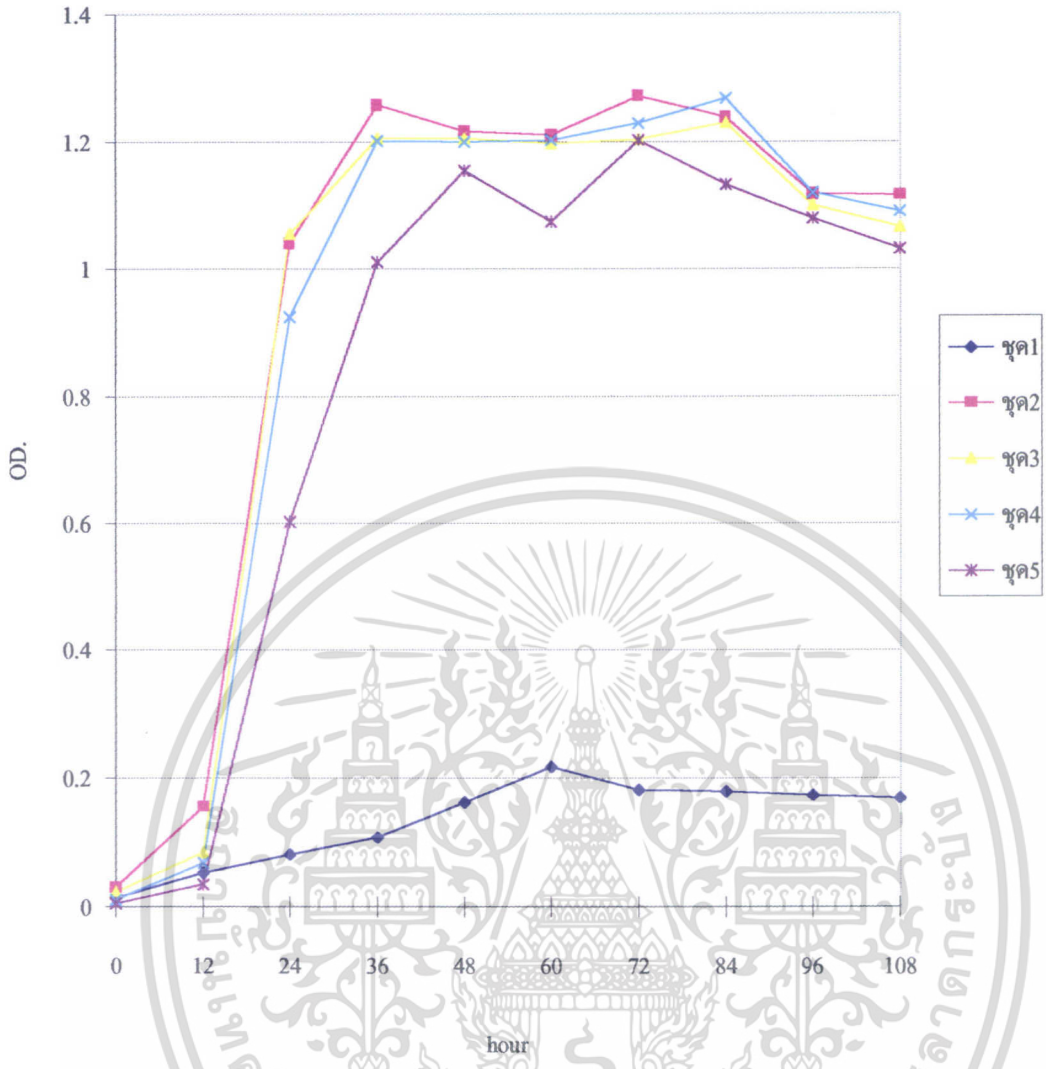
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - น้ำทิ้ง
ชุดที่ 2 - น้ำทิ้ง + yeast extract 0.1 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + yeast extract 1.0 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 4 - น้ำทิ้ง + yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 5 - น้ำทิ้ง + yeast extract 3.0 เปอร์เซนต์

รูปที่ 4.4 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask

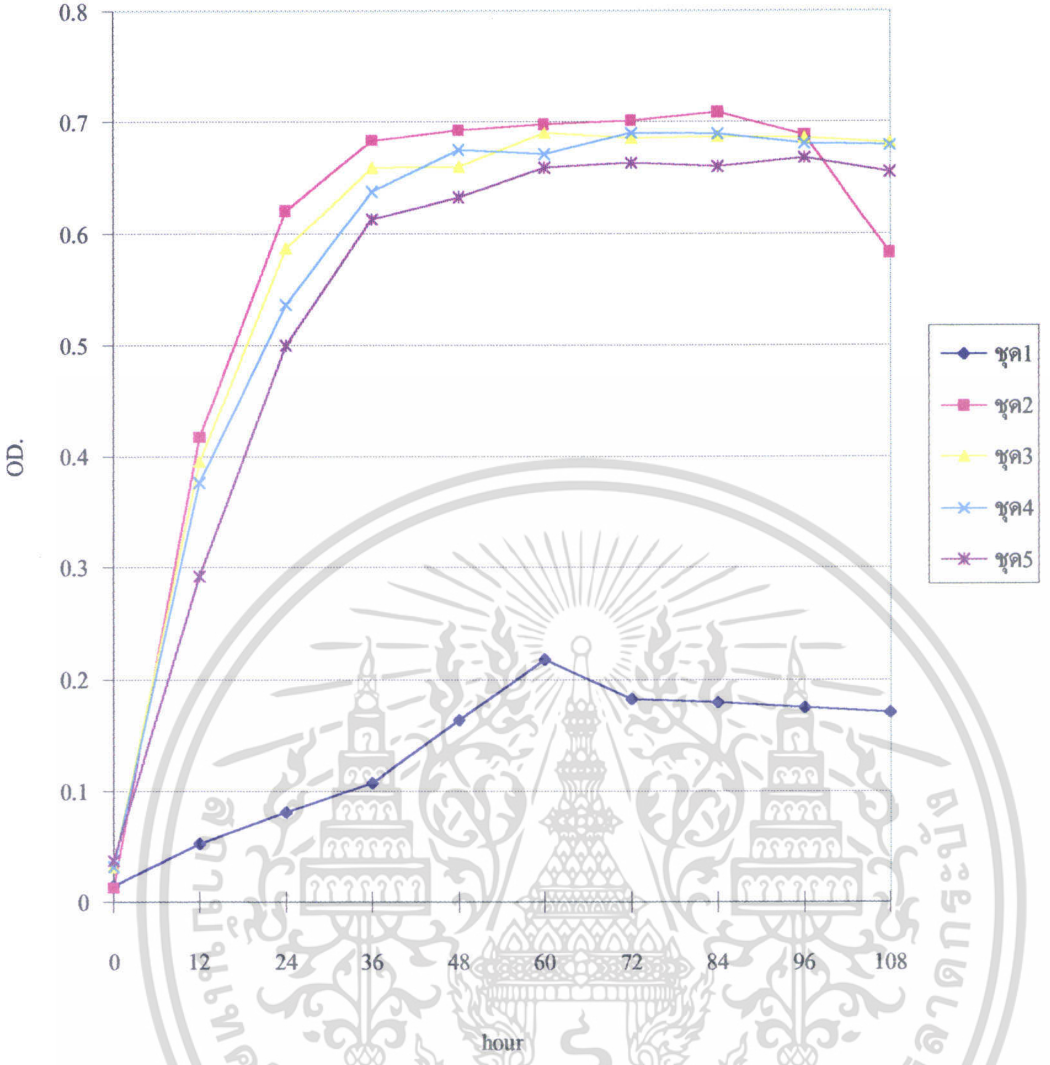
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - น้ำทิ้ง
ชุดที่ 2 - น้ำทิ้ง + yeast extract 4.0 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + yeast extract 10.0 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 4 - น้ำทิ้ง + yeast extract 15.0 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 5 - น้ำทิ้ง + yeast extract 20.0 เปอร์เซนต์

รูปที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask

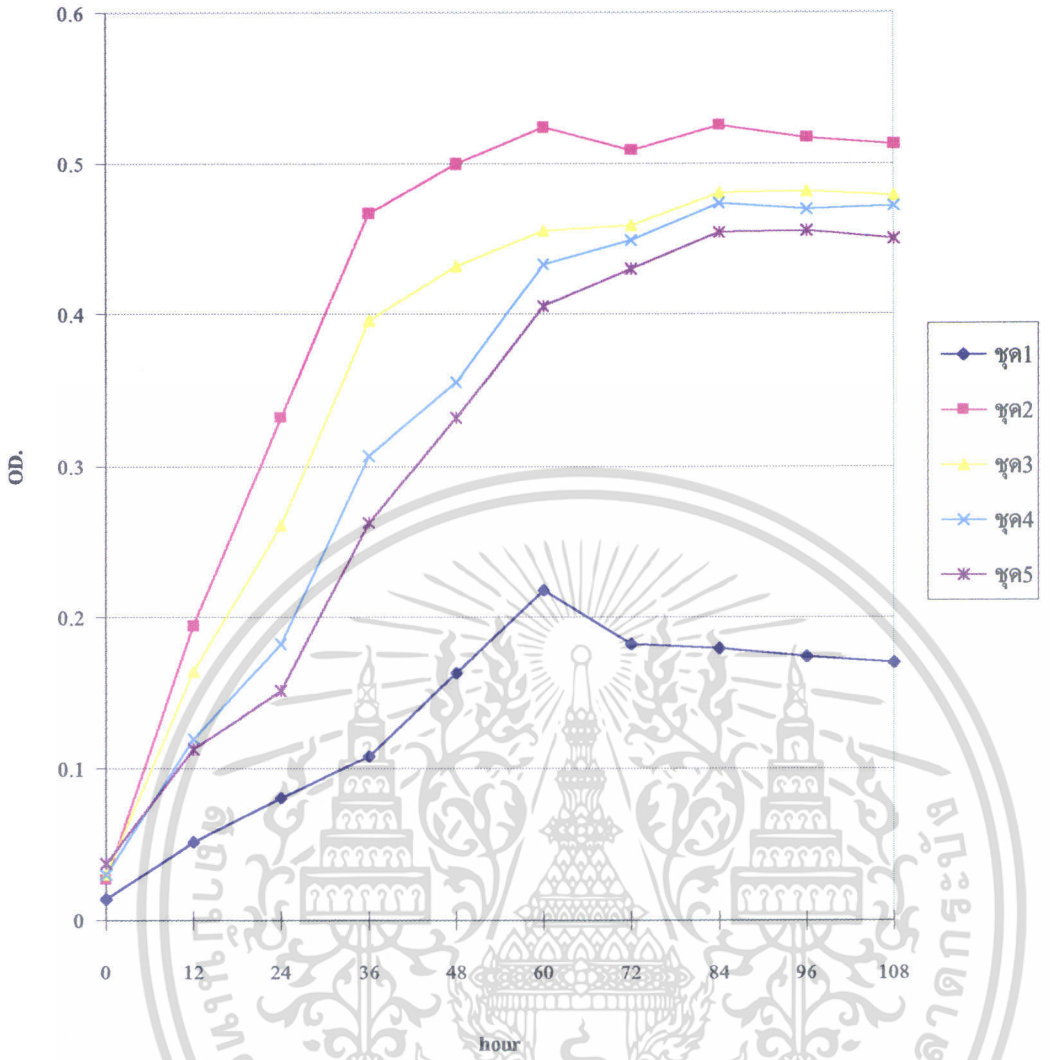
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - น้ำทิ้ง
ชุดที่ 2 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดที่ 4 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดที่ 5 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ โคบอลท์ ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask

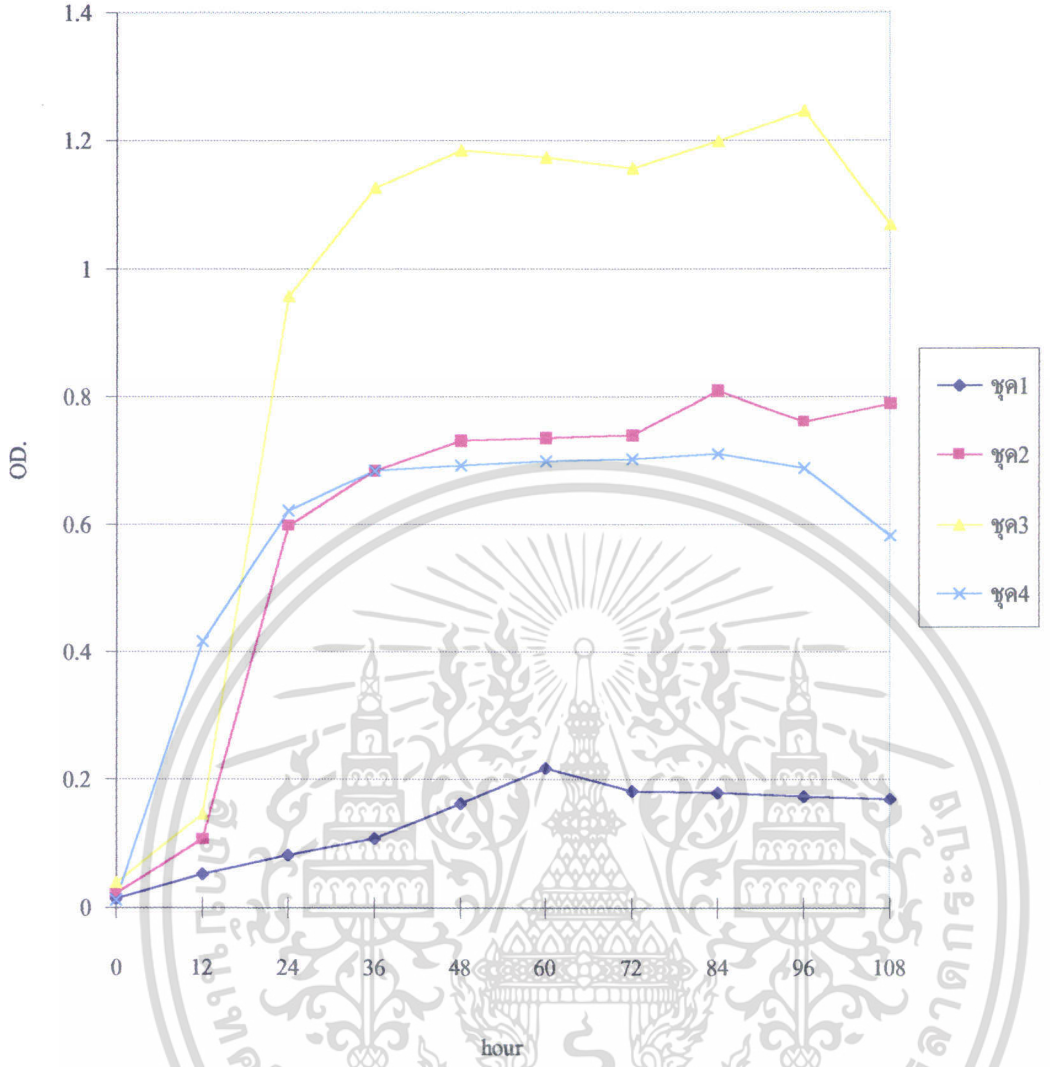
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - น้ำทิ้ง
ชุดที่ 2 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 14 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดที่ 4 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร
ชุดที่ 5 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.7 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ โคบอลท์ ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask

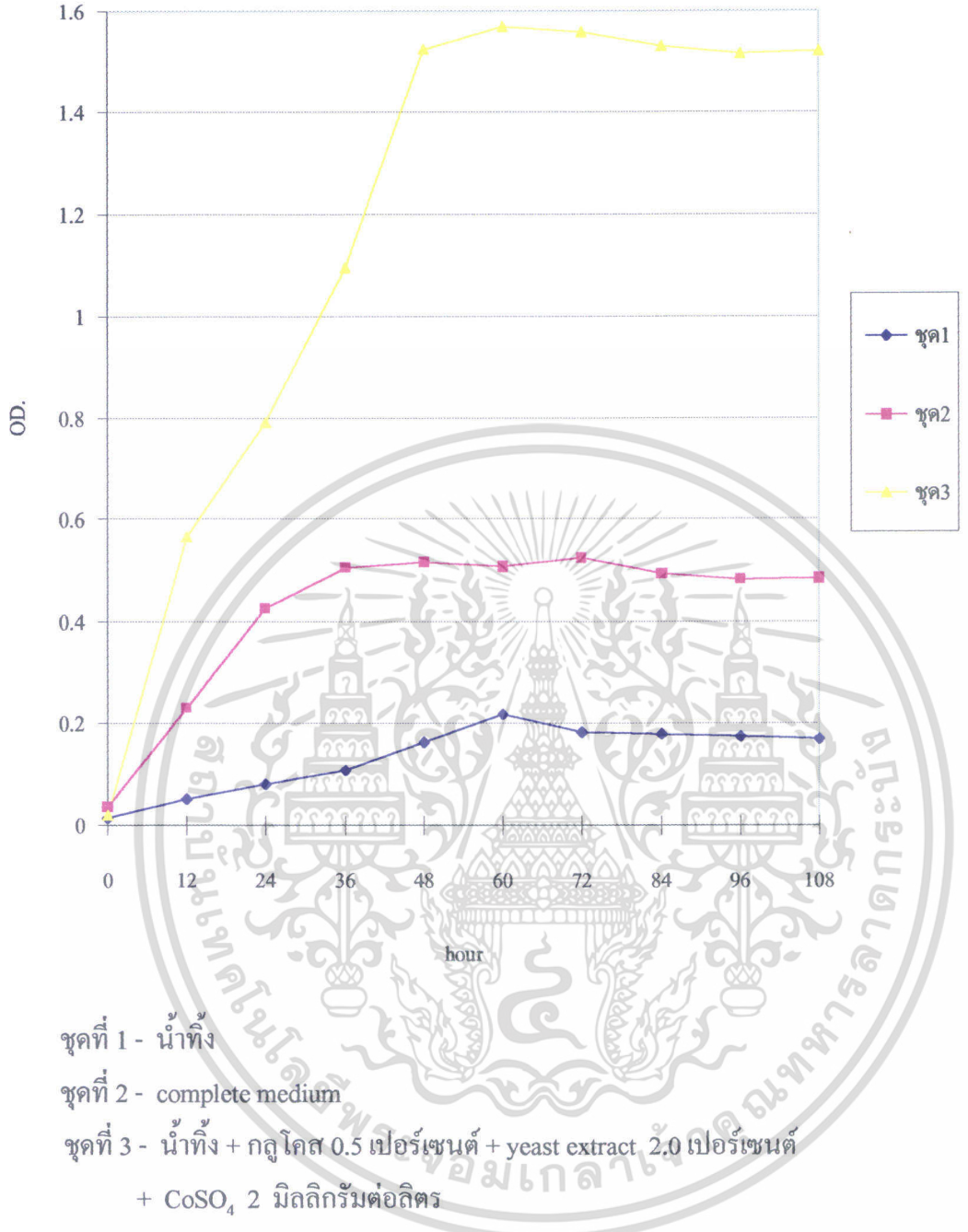
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - น้ำทิ้ง
ชุดที่ 2 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์
ชุดที่ 4 - น้ำทิ้ง + โคบอลท์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 4.8 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ กลูโคส yeast extract และ โคบอลท์ ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเติม กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ และ $CoSO_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพ stationary flask

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ชุดที่ 1 - น้ำทิ้ง

ชุดที่ 2 - complete medium

ชุดที่ 3 - น้ำทิ้ง + กลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ + yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์ + $CoSO_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

<u>รูปที่ 4.9</u> แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ กลูโคส yeast extract และ โคบอลท์ ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ <u>Propionibacterium freudenreichii</u> ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง โดยเติม กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ และ $CoSO_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เทียบกับ complete medium และ น้ำทิ้ง ในสภาพ stationary flask

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacteium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองบริเวณบ่อน้ำทิ้งรวมหลังการหมักในกระบวนการผลิตซีอิ๊ว เปรียบเทียบกับ complete medium โดยใช้สภาวะเริ่มต้นที่เหมาะสม ต่อการเจริญของเชื้อ ใน complete medium คือที่ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5.0เปอร์เซนต์ เป็นสภาวะมาตรฐาน เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ Propionibacteium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ คือ สภาวะที่มีการเติมกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ และ โคบอลท์ในรูปของโคบอลท์ซัลเฟต 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในน้ำทิ้งดังกล่าว พบว่ามีการเจริญของเชื้อสูงกว่าใน complete medium จากการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อ ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง มีความต้องการปริมาณกลูโคสต่ำกว่าใน Complete medium ถึงเท่าตัว คือน้อยกว่าปริมาณกลูโคสที่ใช้ใน complete medium 0.5 เปอร์เซนต์ และมีความต้องการปริมาณโคบอลท์เพียง 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งดังกล่าว มีความต้องกายีสต์สกัด 2.0 เปอร์เซนต์ ซึ่งสูงกว่าใน complete medium โดยใน complete medium ใช้ปริมาณยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ แสดงว่าน้ำทิ้งดังกล่าว ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน แต่มีความอุดมสมบูรณ์ในด้านแหล่งคาร์บอนและ Growth factor เมื่อมีการเติมสารอาหาร ลงในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ในปริมาณที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น เชื้อจะมี การเจริญสูงกว่าใน complete medium ถึง 306 เปอร์เซนต์ ดังนั้นจึงสามารถนำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ Propionibacteium freudenreichii เพื่อการผลิตวิตามินบี 12 แทนการเลี้ยงเชื้อใน complete medium ได้เพื่อลดต้นทุนการผลิตและเป็นการนำน้ำทิ้งมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	กรัม

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

1.2 อาหาร MRS agar ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ MRS medium แต่ต้องเติมวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข :
ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ข.1 แสดงการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ใน complete medium สภาพ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ 660 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0.037	0.036	0.038	0.036
12	0.233	0.219	0.238	0.230
24	0.427	0.424	0.431	0.427
36	0.510	0.501	0.505	0.505
48	0.516	0.509	0.516	0.514
60	0.510	0.499	0.509	0.506
72	0.531	0.485	0.524	0.511
84	0.497	0.484	0.494	0.491
96	0.494	0.483	0.483	0.511
108	0.491	0.491	0.486	0.489
120	0.485	0.480	0.479	0.481
132	0.488	0.482	0.481	0.483
144	0.480	0.483	0.481	0.481

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.2 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสและยีสต์สกัด ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง เปรียบเทียบกับ Complete medium ในสภาพ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่าO.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	CM	น้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง	น้ำทิ้ง + กลูโคส 1 %	น้ำทิ้ง + ยีสต์สกัด 0.5 %	น้ำทิ้ง+กลูโคส 1 % + ยีสต์สกัด 0.5 %
0	0.036	0.014	0.032	0.024	0.026
12	0.230	0.052	0.079	0.142	0.363
24	0.427	0.081	0.109	0.154	0.519
36	0.505	0.108	0.153	0.161	0.593
48	0.514	0.163	0.166	0.225	0.603
60	0.506	0.218	0.362	0.350	0.634
72	0.511	0.182	0.361	0.349	0.647
84	0.491	0.179	0.359	0.337	0.610
96	0.511	0.174	0.355	0.328	0.592
108	0.489	0.170	0.350	0.309	0.592
120	0.481	0.169	0.341	0.301	0.589
132	0.483	0.169	0.337	0.305	0.568
144	0.481	0.156	0.323	0.296	0.525

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลกลูโคส ในปริมาณต่างๆที่มีต่อการของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในนำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซนต์ ในสภาพ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร					
	glucose 0.0 %	glucose 0.5 %	glucose 1.5 %	glucose 2.0 %	glucose 2.5 %	glucose 3.0 %
0	0.024	0.022	0.026	0.026	0.051	0.023
12	0.146	0.106	0.084	0.044	0.083	0.026
24	0.153	0.598	0.417	0.425	0.411	0.315
36	0.158	0.684	0.538	0.517	0.546	0.431
48	0.161	0.731	0.579	0.590	0.631	0.528
60	0.163	0.734	0.624	0.620	0.656	0.548
72	0.252	0.739	0.624	0.621	0.606	0.581
84	0.250	0.809	0.634	0.618	0.642	0.595
96	0.252	0.759	0.637	0.622	0.681	0.600
108	0.249	0.788	0.638	0.624	0.624	0.601

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของยีสต์สกัด ในปริมาณต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 % ในสภาพ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร			
	Yeast extract 0.1 %	Yeast extract 1.0 %	Yeast extract 2.0 %	Yeast extract 3.0 %
0	0.034	0.016	0.039	0.023
12	0.066	0.144	0.147	0.157
24	0.093	0.830	0.957	1.008
36	0.107	0.935	1.127	1.182
48	0.134	0.963	1.185	1.172
60	0.144	1.057	1.173	1.188
72	0.157	1.094	1.157	1.198
84	0.173	1.102	1.198	1.032
96	0.184	1.022	1.245	1.019
108	0.197	1.049	1.068	1.018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ ยีสต์สกัด ในปริมาณต่างที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลืองที่เติมกลูโคส 1.0 % ในสภาพ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร			
	Yeast extract 4.0%	Yeast extract 10.0 %	Yeast extract 15.0 %	Yeast extract 20.0 %
0	0.031	0.024	0.011	0.006
12	0.156	0.084	0.068	0.035
24	1.039	1.055	0.923	0.603
36	1.258	1.206	1.201	1.011
48	1.217	1.206	1.200	1.154
60	1.211	1.197	1.203	1.074
72	1.271	1.204	1.229	1.202
84	1.238	1.230	1.267	1.132
96	1.118	1.100	1.120	1.080
108	1.116	1.066	1.091	1.031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ในปริมาณต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติม กลูโคส 1 % และยีสต์สกัด 0.5 % ที่สภาพ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	cobalt 0 mg/l	cobalt 2 mg/l	cobalt 4 mg/l	cobalt 6 mg/l	cobalt 8 mg/l
0	0.026	0.013	0.032	0.032	0.037
12	0.363	0.417	0.395	0.376	0.292
24	0.519	0.621	0.587	0.536	0.500
36	0.593	0.683	0.659	0.638	0.613
48	0.603	0.692	0.660	0.675	0.633
60	0.601	0.698	0.690	0.671	0.659
72	0.598	0.701	0.685	0.690	0.663
84	0.644	0.709	0.687	0.689	0.660
96	0.622	0.688	0.686	0.680	0.668
108	0.628	0.583	0.681	0.679	0.655

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.7 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ในปริมาณต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง ที่เติมกลูโคส 1 % และยีสต์สกัด 0.5 % ที่สภาพ stationary flask

ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	cobalt 8 mg/l	cobalt 12 mg/l	cobalt 14 mg/l	cobalt 16 mg/l	cobalt 20 mg/l
0	0.037	0.027	0.030	0.030	0.038
12	0.292	0.194	0.164	0.120	0.113
24	0.500	0.332	0.261	0.182	0.151
36	0.613	0.467	0.396	0.307	0.263
48	0.633	0.500	0.432	0.356	0.332
60	0.659	0.524	0.455	0.433	0.405
72	0.663	0.509	0.459	0.449	0.430
84	0.660	0.525	0.481	0.474	0.454
96	0.668	0.517	0.482	0.470	0.455
108	0.655	0.513	0.479	0.472	0.450

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.8 แสดงการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์ ในน้ำทิ้ง complete medium และน้ำทิ้งเติมกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซนต์ $CoSO_4$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพ stationary flask

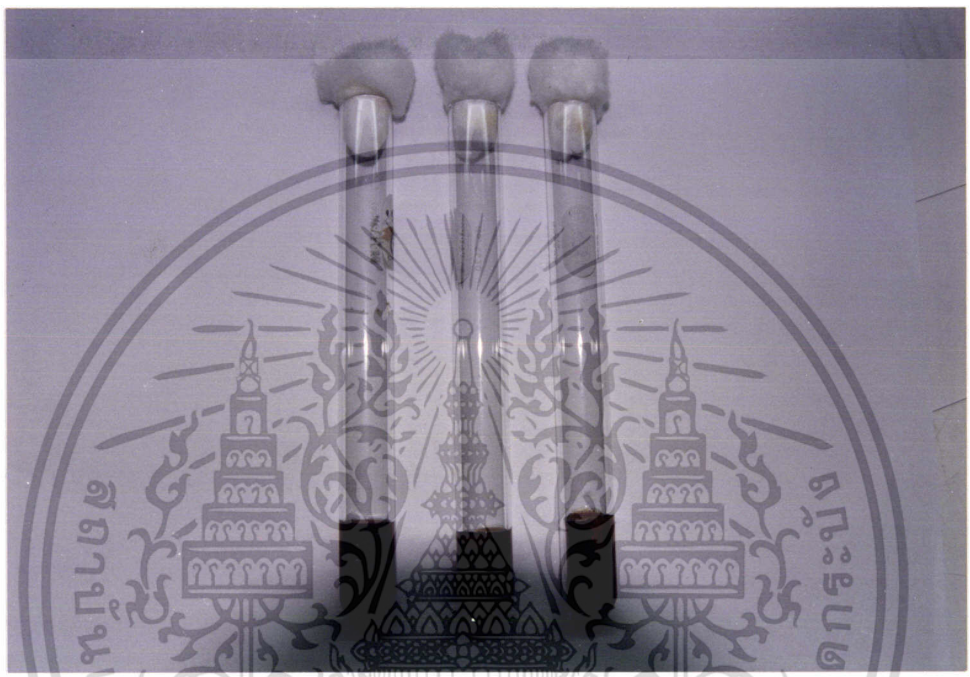
ชั่วโมงที่	ค่า O.D ที่ 660 นาโนเมตร			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
0	0.019	0.021	0.021	0.020
12	0.572	0.568	0.556	0.565
24	0.805	0.785	0.783	0.791
36	1.096	1.094	1.101	1.096
48	1.546	1.484	1.540	1.523
60	1.572	1.572	1.560	1.568
72	1.569	1.552	1.550	1.557
84	1.590	1.462	1.544	1.532
96	1.656	1.420	1.474	1.510
108	1.620	1.422	1.522	1.520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค : รูปประกอบการทดลอง

รูปที่ ค.1 แสดงน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.2 แสดง Stock culture ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน MRS agar

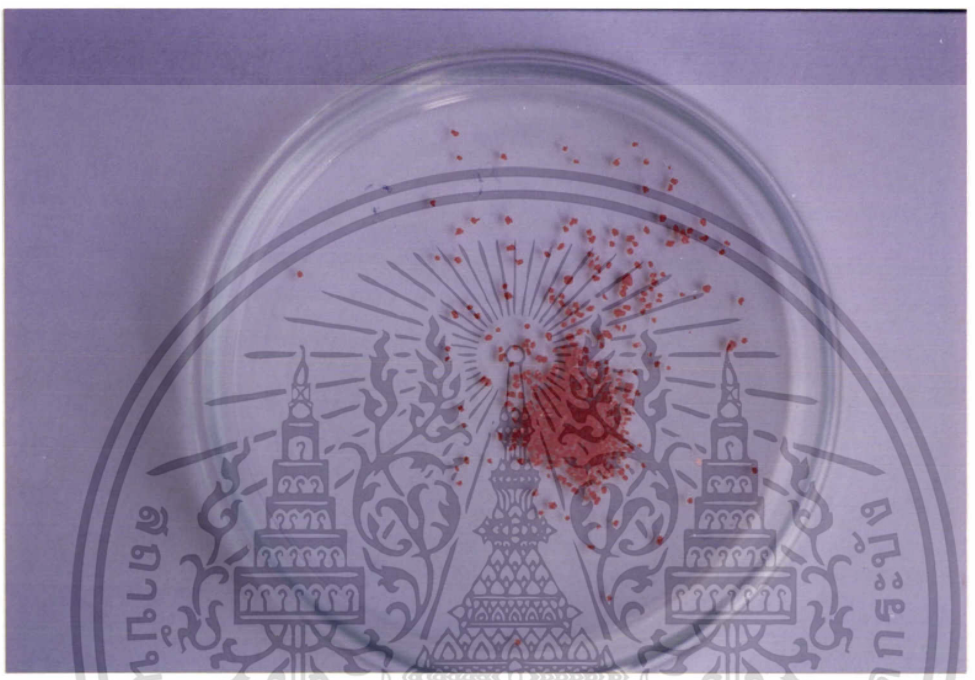
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.3 แสดงน้ำทิ้งที่เติมกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.4 แสดงน้ำทิ้งที่เติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค.5 แสดงผลึกวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง :
แผนภาพแสดงกระบวนการผลิต ซีอิ้ว ของบริษัท ง่วนเชียง อุตสาหกรรมจำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

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

ชลลวิชช์ ศิริขันธ์ วันวิสา ทวีแสง เสาวนีย์ จิรธารานนท์ " การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii " โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ,2535

ณัฐวุฒิ สุรณัฐกุล ทวีป เผือกเทศ นิยม มาลัยเลิศ " การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้เชื้อ Propionibacterium freudenreichii " โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ,2536

พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์ "การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium freudenreichii subsp. Shermanii (ATCC 13673) โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ "วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิตภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2518.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บุษบา ยงสมิทธ์ ทอรายา เฟตซูโอะ และยามาเน ทซูเนโอะ. "การผลิตวิตามินบี 12 โดยแบคทีเรียที่ใช้เมทานอลเป็นวัตถุดิบ" รวบรวมเรื่องย่อสาขาพืช การประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยา ครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2518.

เทอดไทย เอกา จารุวรรณ วงศ์วรกุลกิจ " การศึกษาผลของปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 จาก น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii " โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ,2537

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

วรพงษ์ สุริยจันทราทอง จินดา สุรสุโขค สุวิทย์ ผลลาภ และอุทัย พิสณย์. "การใช้ข้าวเป็นอาหารของกระบือเมื่อเสริมด้วยยูเรียและกากน้ำตาล" วิทยาสารเกษตรศาสตร์ 8(2) : 103-108, 2517.

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

โสภณ กิติสิน วุฒิศักดิ์ บุตรธน มณฑา นันทพันธ์ และประเทือง สง่าวงศ์. " การศึกษาพันธุ์ถั่วที่ต้านทานโรครัสต์ " รายงานการประชุมทางวิชาการ เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 13 โรงพิมพ์การศาสนา , 2518.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อโณทัย คมเศวต. "การศึกษาการเจริญของยีสต์อาหารสัตว์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2519.

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

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

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

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, New Jersey.

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 Corp, New Jersey.

Borrows, W. ; J.W. Monlder; R.M. Lewert and J.W. Rippon. 1968. Textbook of microbiology, Toppon company Limited, Tokyo, Japan.

Bray ,R. C. and D. Shemin .1963 "On the biosinthesis of vitamin B_{12}." J. biol . Chem . 238 : 1501- 1508

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Buchanan, R.E. ; N.E. Gibbson ; S.T. Cowan ; J.G. Holt ; J. Liston ; R.G.E. Murray ; C.F. Nivin ; A.W. Ravin and R.Y. Stanier.1974. Bergey's Mannual of eterminative Bacteriogy. 8th ed. William and Wilkins Company, Baltimore.

Bulkin, V.N. and G.V. pronyagova ; 1960. "The biosynthesis of vitamin B_{12} and porphyrin by Propionibacterium" J. biochem. 47 ; 781-789.

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

Demain, A.L. ,H.J. Daniels, L.Schnable and R.F.White,1968." Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B_{12} fermentation ." Nature , London . 220 :1324 - 1325

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

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

Friedman, H.C. and C.M. Cagen . 1970 " Microbial biosynthesis of Vitamin B_{12} - like compounds ." Annu . Rev . Microbiol . 24 : 160-208

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

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

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

Mcdaniel, L.E. 1961 ." Production of cobalamins ." U. S. Patent 3,000,739 : Merck and Co ., Inc.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Osman, H.G. and M.S. Cheneuda. 1968. "Biosynthesis of vitamin B_{12} by Propionibacterium shermanii II. The suitability of different carbon and nitrogen sources as well as the effect of vitamins, purines and pyrimidines on the growth and vitamin B_{12} synthesis. J. chem. URA. 11, 353 - 361. Abstract in microbial . Abstract Section A Industrial Microbiology.

Osman, H.G. and M.S. Cheneuda. 1968. "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.

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

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

Prescott, S. C . and C. G . Dunn. 1959 The Production of vitamin B_{12}. pp. 482-96 In Industial Microbiology 3 rd . ed. McGraw - Hill , New York .

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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

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

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

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

Shemin , D. and R. C. Bray. 1964. " Thebiosynthesis of corrin structure of vitamin B_{12} ." Annu. N.Y. Acad. Sci . 112 : 651 - 621 .

Shorb, M.S. 1947 ." Unidentified essential growth factors for Lactobacilli lactis found in refined liver extracts and in certain nature materials " J. Bacteriol, 53, 669.

Shorb, M.S. 1948. " Activity of vitamin B_{12} for the growth of Lactobacillus lactis." Science, 107 : 397 - 8

Smith, E.L. and S. Ball . 1953 ." Nitrous acid treatment for seperating impurities from antipermicious anemia active material " U. S. Patent . 2,630,401

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

Sudasky, J.M. and R.A. Fisher. 1954. " Improvement in production of vitamin B_{12} produced by propionibacterium freudenreichii " U.S.Patent. 2,816,856. Dec. 17, 1957.

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

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

Yongsmith, B., P. Apiraktiwongse and S. Sirinanunta. 1978 Vitamin B_{12} production by bacteria using soybean curd whey as substrates. Paper presentsd at the Poster Sessions of XII Intern .Congr. of Microbiol., September 1978, Munich , West Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Yongsmith, B. and P. Apiraktiwongse. 1983. " Vitamin B_{12} production from soybean curd whey with Prop. freudenreichii " . J. Ferment. Technol . 61 (1) : 105

Zodrow, O.S. and W. Kaczmarck. 1967, " Effect of incubation temperature on the content of different corrinoids in the cell of Propionibacterium shermanii " Acta Microbial Polon., 16,223-226. Abstract in Microbial. Abstracts. 3.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้