สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ห้องสมุดคณะวิทยาศาสตร์ สจล.

การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

นาย ชลลวิชช์ ศิริขันธ์

นางสาว วันวิสา ทวีแสง

นางสาว เสาวณีย์ จิรธารานนท์

ปพ.
ช227ก
2535

เลขหมู่............................
เลขทะเบียน........................
วัน,เดือน,ปี........................

6125U7621

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Utilization of Waste Water from Diary Industry for Vitamin B_{12} by <u>Propionibacterium freudenreichii</u>

Mr. Chonlawit Sirikhunt
Miss Wanwisa Thawesang
Miss Saowanee Jiratharanon

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment
for the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's of Institute of Technology Ladkrabang
1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมนมเพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ <u>Propionibacdterium freudenreichii</u>

โดย นาย ชลลวิชช์ ศิริขันธ์

นางสาว วันวิสา ทวีแสง

นางสาว เสาวณีย์ จิรธารานนท์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผ.ศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(ผ.ศ. เนาวรัตน์ บานแย้ม)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

ประธานกรรมการ

(ผ.ศ. เนาวรัตน์ บานแย้ม)

กรรมการ

(ผ.ศ. สุขใจ ชูจันทร์)

กรรมการ

(อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมนม เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii
นักศึกษา	นายชลลวิชช์ ศิริขันธ์
	นางสาววันวิสา ทวีแสง
	นางสาวเสาวณีย์ จิรธารานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2535

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium freudenreichii โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นมเป็นวัตถุดิบ เปรียบเทียบกับการใช้ complete medium สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ P. freudenreichii ใน complete medium คือ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (initial O.D. =0.5) = 0.53 กรัมต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ 660 นาโนเมตร ในสภาพ stationary flask เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ P. freudenreichii

เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ P. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นมตามสภาวะที่เหมาะสม โดยเติมแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน พบว่ามีการเจริญของ P. freudenreichii สูงกว่าใน complete medium และจากการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารที่ใช้เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน และ โคบอลท์ พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 0.2 เปอร์เซนต์ เป็นปริมาณธาตุคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด yeast extract ปริมาณ 2 เปอร์เซนต์ เป็นปริมาณธาตุไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด $CoSO_4.7H_2O$ ปริมาณ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นปริมาณโคบอลท์ที่เหมาะสมที่สุด ส่วน methionine และ riboflavin ปริมาณที่เหมาะสมที่สุดคือ 2 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสาร 2 ชนิดนี้เป็นสารช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u> โดยได้วิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งผลิตภัณฑ์นมเมื่อเติมสารต่างๆในปริมาณดังกล่าว โดยเลี้ยงในสภาวะ stationary ในปริมาณ 0.23 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 72 และพบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ในปริมาณ 0.126 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมากกว่า 45.22 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับใน complete medium

เมื่อทดลองเลี้ยง <u>P. freudenfeichii</u> ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นมและเติมสารต่างๆในปริมาณดังกล่าวข้างต้น ในสภาวะที่มีระบบการกวนแต่ไม่มีการให้อา-กาศพบว่า ได้ปริมาณวิตามินบี 12 0.51 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 72 และพบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ในปริมาณ 0.156 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่า 76.27 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับใน complete medium

จากการวิเคราะห์ค่า BOD. ของน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม และน้ำทิ้งเติมแหล่งธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน โคบอลท์ และวิตามิน ด้วยปริมาณที่เหมาะสมพบว่า มีค่าเท่ากับ 4,210 และ 37,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อ <u>P. freudenreichii</u> แล้ว BOD. ลดลงเป็น 1,075 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ <u>P. freudenreichii</u> ในการทดลองครั้งนี้สามารถลดค่า BOD. ของน้ำทิ้งลงได้ 74.46 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม และลดค่า BOD.ของน้ำทิ้งที่เติมสารที่เติมสารต่างๆได้ถึง 97.09 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	The Utilization of Waste Water from Dairy Industry for Vitamin B_{12} by <u>Propionibacterium</u> <u>freudenreichii</u>
Name	MR. Chonlawit Sirikhunt Miss Wanwisa Thawisang Miss Saowanee Jiratharanon
Special Project Advissor	Asst.Prof. Sukjai Choojan
Department	Applied Biology
Acedemic Year	1992

Abstract

Waste water from dairy industry limited was studied for cultivation of <u>Propionibacterium</u> <u>freudenreichii</u> (UQM 360) for growth and vitamin B_{12} production. Optimization of growth codidtion was studied using complete medium. Maximal growth rate and growth yield, under condition of stationary flask were obtained when initial pH of medium was 7.0, temperature 30 c, initial O.D. 0.5 at 660 nm.

Growth and vitamin B_{12} production experiment were performed using waste water, with and without supplemented various chemicals. The result revealed that 2 percent yeast extract as N-source, 0.2 percent glucose as C-source, 8 milligrams per litre $CoSO_4.7H_2O$ as cobalt source methionine

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and riboflavin were 2 and 0.01 milligrams per 100 millilitres respectively are the best for growth and vitamin B_{12} product of Propionibacterium freudenreichii Methionine production. After 72 hours of incubation at stationary flask, the fermentation liquors of waste water contained 0.23 micrograms per gram of dry weight cell. After 48 hours of incubation at stationary contained 0.126 micrograms per gram of dry weight cell. The production was more than 45.22 percent when compered with fermentation in complete medium.

Optimization of vitamin B_{12} production was studied by batch fermenter with agitation at 100 rpm. After 72 hours the fermentation liquors contained 0.51 and 0.156 micrograms per gram of dry weight cell in supplemented waste water and complete medium respectively.

For non supplemented waste water, up to 74.46 percent reduction of 5-day BOD was achieved, from 4,210 milligrams per litre to 1,075 milligrams per litre. For supplemented waste water, up to 97.09 percent reduction of 5-day BOD was achieved, from 37,000 milligrams per litre to 1,075 milligrams per litre after bacterial separation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความร่วมมือและช่วยเหลือของบุคคลดังต่อไปนี้

1. ผศ. สุชใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขเอกสารให้

2. คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์

3. คุณ ลาวัณย์ เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ผู้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

4. ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ผู้ซึ่งให้ความสะดวกเรื่องสถานที่ที่ใช้ทำการทดลอง ตลอดจนเครื่องมือที่ใช้ทำการทดลองต่างๆ

5. บริษัท อุตสาหกรรมนมไทยมะลิ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตนม

6. เจ้าหน้าที่ภาควิชาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกต่างๆ

และขอขอบคุณเพื่อนๆ น้องๆ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการทำการทดทลอง ทุกประการ ทำให้โครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย		ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ		ค
กิติกรรมประกาศ		จ
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญรูป		ช
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	การตรวจเอกสาร	4
	ลักษณะ รูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ <u>Propionibacterium freudenreichii</u>	4
	ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ <u>Propionibacterium freudenreichii</u>	15
	อาหาร	15
	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12	18
	การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	20
	การ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์	29
บทที่ 3	อุปกรณ์และวิธีการ	31
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์	45
	4.1 ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) และน้ำหนักแห้งของเชื้อ (dry weight cell)	45
	4.2 ผลการศึกษาอัตราการเจริญ (growth rate) และปริมาณเซลสูงสุด (maximum yeild) ของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u> ในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งเติมสาร	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการเปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส 46
4.4 ผลการเปรียบเทียบปริมาณของ yeast extract 46
4.5 ผลการเปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์ 46
4.6 ผลการศึกษาอัตราการเจริญ, ปริมาณเซลสูงสุด และการผลิตวิตามินบี12 ของเชื้อ P. freudenreichii ใน complete medium และน้ำทิ้งเติมสารต่างๆ ณ สภาวะ stationary flask และ batch fermenter 46
4.7 ผลการวิเคราะห์ Biochemical Oxygen Demand (BOD) 48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 70
ภาคผนวก
เอกสารอ้างอิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติคต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	8
2.2	แสดงอิทธิพลของแหล่งธาตุไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12	9
2.3	แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	10
2.4	แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	11
2.5	แสดง precess and media used for industrial production of vitamin B_{12}	28
4.1	แสดงค่า pH , BOD ,suspended solid , เปอร์เซนต์คาร์โบไฮเดรต และ เปอร์เซนต์โปรตีน ของน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม ของบริษัทอุตสาหกรรมนมไทย จำกัด	50
4.2	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และน้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์นมเมื่อเติมสาร ณ ชั่วโมงที่ 48	65
4.3	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และน้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์นมเมื่อเติมสาร ณ ชั่วโมงที่ 72	66
4.4	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และน้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์นมเมื่อเติมสาร ณ ชั่วโมงที่ 96	67
4.5	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และน้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์นมเมื่อเติมสาร ณ ชั่วโมงที่ 120	68
จ.1	แสดงผลการเจริญของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u> ใน complete medium	94
จ.2	แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม	95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.3	แสดงผลระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D)และน้ำหนักแห้งของเชื้อ	96
จ.4	แสดงผลการวิเคราะห์ total carbohydrate ของสารละลายมาตราฐาน กลูโคส โดย phenolic method	97
จ.5	แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งเมื่อเติมสารในปริมาณที่เหมาะสม ก่อนการหมัก	97
จ.6	แสดงค่า dissolved oxygen เมื่อสิ้นสุดการหมักในชั่วโมงที่ 20	98
จ.7	แสดงค่า 5-day BOD ของน้ำทิ้ง	98
จ.8	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ glucose และ yeast extract ต่อการเจริญ ของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u>	99
จ.9	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ glucose ปริมาณต่าง ๆ กัน ต่อการเจริญ ของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u>	100
จ.10	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ปริมาณต่าง ๆ กัน ต่อการ เจริญของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u>	101
จ.11	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของเกลือโคบอลท์ ปริมาณต่าง ๆ กัน ต่อการเจริญ ของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u>	102
จ.12	แสดงค่า O.D. ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร	103
จ.13	แสดงค่า O.D. ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 สภาวะ ชั่วโมงที่ 48	103
จ.14	แสดงค่า O.D. ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร	104
จ.15	แสดงค่า O.D. ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 สภาวะ ชั่วโมงที่ 72	104
จ.16	แสดงค่า O.D. ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร	105
จ.17	แสดงค่า O.D. ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 สภาวะ ชั่วโมงที่ 96	105
จ.18	แสดงค่า O.D. ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร	106
จ.19	แสดงค่า O.D. ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้ง 2 สภาวะ ชั่วโมงที่ 120	106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการ dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย propionic acid bacteria	5
2.2	แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12	17
2.3	แสดงสมมติฐานของ biosynthesis pathway	22
2.4	แสดงการสังเคราะห์ corrin ring	23
4.1	แสดงการเจริญของเชื้อ P. freudenreichii ใน complete medium ณ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	49
4.2	แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคส	51
4.3	แสดงค่าน้ำหนักแห้งของเชื้อ (กรัมต่อลิตร) กับค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร	52
4.4	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้ง, น้ำทิ้งเติมสาร และใน complete medium	53
4.5	แสดงการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส ในปริมาณต่างๆกัน และเติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์	54
4.6	แสดงการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งเมื่อเติม yeast extract ในปริมาณต่างๆกัน และเติมน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์	55
4.7	แสดงการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งเมื่อเติม yeast extract 2 เปอร์เซนต์, น้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ และเติม $CoSO_4.7H_2O$ ในปริมาณต่างๆกัน	56
4.8	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ P. freudenreichii ที่ O.D.	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

660 นาโนเมตร ในระหว่างการหมักอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
4.9 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 48 58
4.10 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 72 59
4.11 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 96 60
4.12 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 120 61
4.13 แสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อระหว่างการหมักเพื่อผลิตวิตามินบี 12 62
4.14 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร) ณ ชั่วโมงที่ 48, 72, 96, 120 63
4.15 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัม) 64
4.16 แสดงค่าปริมาณ BOD (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของน้ำทิ้ง 69
ฉ.1 แสดงน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม และน้ำทิ้งที่ผ่านการกรอง 106
ฉ.2 แสดงการวิเคราะห์ carbohydrate ในน้ำทิ้งโดย phenolic method 107
ฉ.3 แสดงการวิเคราะห์ crude protein ในน้ำทิ้ง 108
ฉ.4 แสดงการหาค่า DO. ตามวิธี American Pubblic Health Association 109
ฉ.5 แสดง <u>P. freudenreichii</u> ใน complete medium ณ สภาวะ statonary flask 110
ฉ.6 แสดง <u>Lactobacillus leichmannii</u> ใน micro inoculum broth 111
ฉ.7 แสดง <u>P. freudenreichii</u> ใน complete medium ณ สภาวะ batch fermenter ที่มีระบบการกวน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 112
ฉ.8 แสดงน้ำทิ้งเติมน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์, yeast extract 2 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ batch fermenter ที่มีระบบการกวน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 113
ฉ.9 แสดงการกลั่นน้ำแบบ continuous distillation 114
ฉ.10 แสดงผลึกของวิตามินบี 12 115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.11 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 stock solution ใน ampule 116
ฉ.12 แสดงการหาปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งก่อนการบ่ม 117
ฉ.13 แสดงความขุ่นของอาหารหลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

วิตามินบี 12 มีความสำคัญ คือ ช่วยไม่ให้เป็นโรคโลหิตจางชนิด pernicious aneamia ถึงแม้ว่าร่างกายจะต้องการวิตามินบี 12 ในปริมาณน้อย แต่ถ้าขาดก็จะทำให้เกิดโรคโลหิตจางและเกิดอาการทางประสาทได้ วิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จะนำมาใช้ในทางการแพทย์ และ เภสัชกรรม เพื่อเป็นยารักษาโรค ยาบำรุง และส่วนประกอบของยาบางชนิด ผลึกวิตามินบี 12 เป็นรูปปริซึม สีแดงเข้ม มีสูตรโมเลกุล $C_{63}H_{88}O_{14}PCo$ มีชื่อทางเคมีว่า 5,6 dimethylbenzi-midazolyl cobamide หรือ มีชื่อสั้นๆว่า cyanocobalamin

วิตามินบี 12 ส่วนใหญ่ถูกจุลินทรีย์สร้างในรูป โคเอนไซม์บี 12 หรือ DBCC นอกจากนั้นยังพบในรูปของ Methyl cobalamin และในกรณีจุลินทรีย์เป็นพวกต้องการอากาศ ก็อาจพบ hydroxocobalamin วิตามินทั้ง 3 รูปนี้ไม่คงตัว ส่วนวิตามินบี 12 ในรูปคงตัว และร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่จะอออยู่ในรูป cyanocobalamin

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย สำหรับสายพันธุ์ที่สนใจในอุตสาหกรรมคือ <u>Propionibacterium</u> sp. และ <u>Pseudomonas</u> sp.

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ <u>Propionibacterium</u> sp. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหตุจูงใจในการทำโครงงานพิเศษ

1. วิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์เท่านั้น และในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์มีความต้องการมาก เพื่อใช้เป็นอาหารเสริม

2. เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดน้ำทิ้ง และนำวัสดุเหลือทิ้งมาทำให้เกิดประโยชน์

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดำเนินการโดยย่อ

การดำเนินการโครงงานพิเศษ แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

ขั้นที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

ขั้นที่ 3 วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ โดยวิธี turbidimetric method of microbiological assay โดยเชื้อ Lactobacillus leichmannii

ขั้นที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และจัดทำรายงาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีการผลิตวิตามินบี 12 อันจะเป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

2. เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ การอาหาร และเภสัชกรรม

3. เพื่อเป็นแนวทางในการทำการวิจัยที่เกี่ยวกับวิตามินบี 12 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

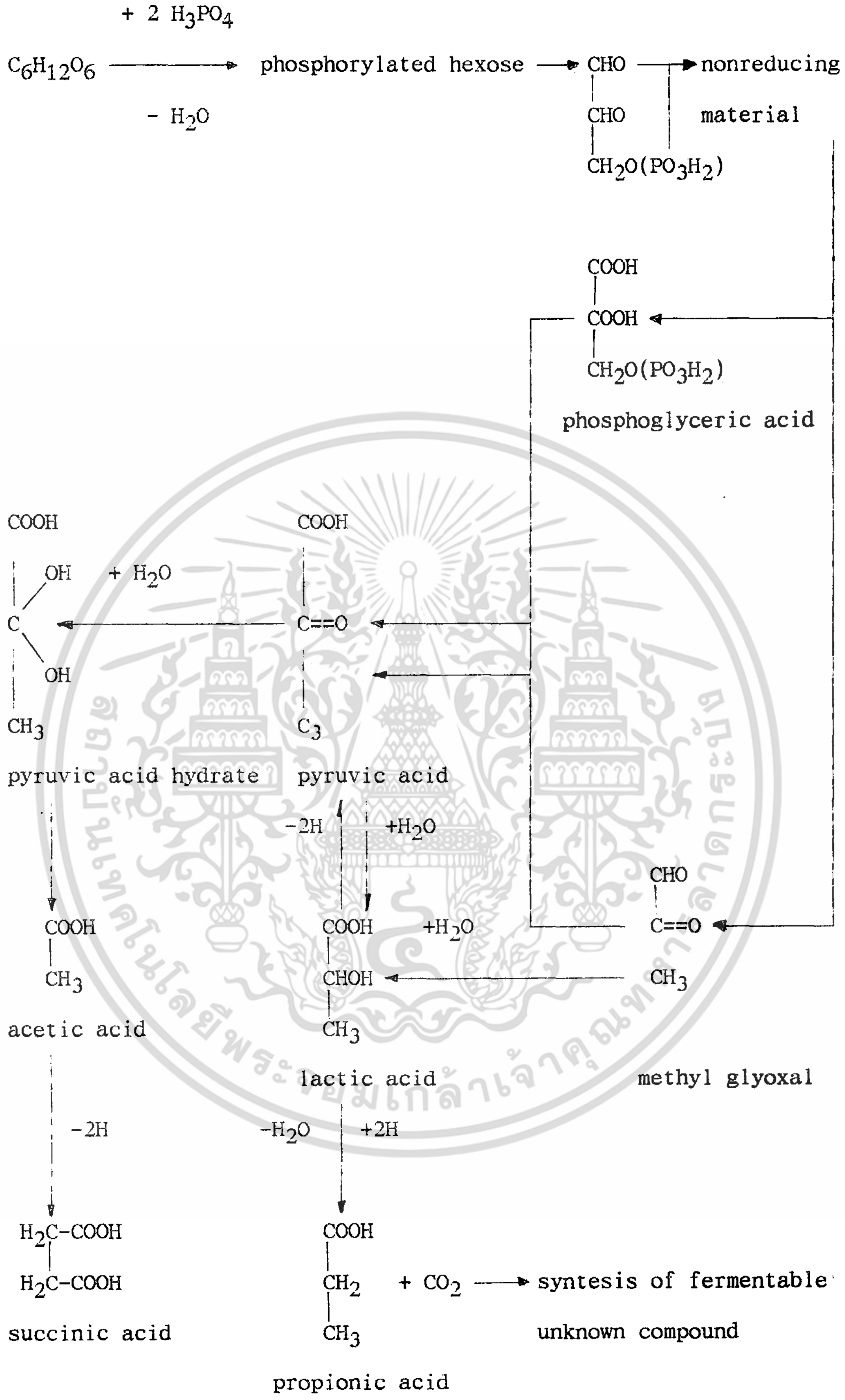
การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของของเชื้อ Propionibacterium spp.

Propionibacterium freudenreichii (20) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จาก dairy product, นมดิบ และ Swiss cheese เมื่อเชื้อเจริญในสภาวะ anaerobic จะมีรูปร่างกลม และ ขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน มักอยู่เป็นสายสั้นๆ ส่วนในสภาวะที่เป็น aerobic รูปร่างอาจเป็น club-shaped และ branched หรือเป็นท่อนยาวที่ไม่เคลื่อนที่ มี metacromatic granules และไม่สร้างสปอร์, ให้ผล catalase-positive เจริญในสภาวะ anaerobic จนถึง aero-tolerent,สามารถหมัก กรดแลคติค, กรดไพรูวิก, คาร์โบไฮเดรต และโพลีแอลกอฮอล์ ได้ กรดโพรพิโอนิค และกรดอะซิติคคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในสภาพ anaerobic หรือ microaerophillic fermentation ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการพ่นอากาศลงไปใน ถังหมัก propionic acid bacteria ในกระบวนการหมักมีประโยชน์มากเพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นกรด เนื่องจากมี propionic acid เกิดขึ้น ทำให้สามารถป้องกัน contamination ซึ่งมักจะเกิดกับการหมักธรรมดา การที่สามารถลด contamination และ infectionได้ เพราะว่าระหว่างที่หมักในสภาพ anaerobic นั้น calcium propionate ทำหน้าเป็น bacteriostatic หรือ fungistic แต่ไม่เป็นพิษกับ Propionibacterium (57)

Wood et al. (82) 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 (35) ได้ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ propionic acid bacteria ที่สำคัญคือ Propionibacterium freudenreichii เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysate of casein	10	กรัม
L-Tryptophan	0.2	กรัม
L-Cystine	0.4	กรัม
Asparagine	0.2	กรัม
Xanthine	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	มิลลิกรัม
Pyridoxamine	0.08	มิลลิกรัม
d-Calcium pantothenate	1.0	มิลลิกรัม
Para-aminobenzoic acid	2.0	มิลลิกรัม
Tween 80 solution	2.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
KH_2PO_4, K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0.4	กรัม
NaCl, $FeSO_4$, $MnSO_4$	0.02	กรัม
N/5 phosphate	50	มิลลิลิตร
Buffer pH	6.8	

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 โดยใช้ NaOH ปรากฏว่าให้วิตามินบี 12 จาก P. freudereichii 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และจาก P. shermanii 3 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณต่ำจากมาตรฐานที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองค้นคว้าต่อไป เพื่อให้ได้วิตามินบี 12 มากขึ้น โดยการปรับความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกแหล่งธาตุคาร์บอน ไนโตรเจนและอื่นๆ ดังนี้

1. เติม $CoCl_2.6H_2O$ 15 มิลลิกรัม ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 12 วัน ได้วิตามินบี 12 จาก <u>P. freudenreichii</u> เป็น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

2. ใช้กรดแลคติคเป็นแหล่งธาตุคาร์บอน โดยใช้กรดแลคติก 10 กรัม แทน dextrose 20 กรัม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน ได้วิตามินบี 12 จาก <u>P. freudernreichii</u> และ <u>P. shermanii</u> เป็น 100 และ 68 ไมโครกรัมต่อลิตร

3. ศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติก โดยใช้ basal medium ที่ประกอบด้วย skim milk 1 ส่วน, whey solids 1 ส่วน, น้ำ 2 ส่วน และ $CoCL_2.6H_2O$ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร inoculate ด้วย inoculum ดังตารางที่ 4 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.1

4. ศึกษาอิทธิพลแหล่งธาตุไนโตรเจนและปัจจัยอื่นๆ การให้ rich medium ทำให้ได้สภาพที่เหมาะสม (optimum condition) เป็นผลให้การหมักเกิดได้รวดเร็ว basal medium ที่ใช้มี 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 พบว่าปริมาณกรดแลคติคที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 คือ 1.5-2 เปอร์เซนต์ ซึ่งได้วิตามินบี 12 สูงถึง 800 ไมโครกรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 2.2

5. ศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ basal medium ซึ่งประกอบด้วย N-Z amine 1 เปอร์เซนต์, yeast extract 0.3 ต่อลิตร inoculate <u>P. freudenreichii</u> บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 8 วัน ปรับ pH ทุกวัน ดังสภาพในตารางที่ 2.3 ปรากฏว่า สภาพ micro-aerophilic ได้วิตามินบี 12 มากที่สุด

6. อิทธิพลของ nitrogenous compound ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยใช้ yeast extract และ beef extract เป็นแหล่งของวิตามิน และปัจจัยอื่นๆที่จุลินทรีย์ต้องการอาหารที่ใช้เตรียม ดังตารางที่ 2.4 เติม $CoCL_2.6H_2O$ 8 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร ใช้ inoculum ของเชื้อ P. freudenreichii อายุ 3 วัน 5 เปอร์เซนต์ ปรับ pH =7 บ่ม 5 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.4 พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ proteinaceous material จะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น

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

ตารางที่ 2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์และกรดแลคติคต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ที่มา : (63 หน้า 105)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างที่	percent lactate	Inoculum	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1	0.5	P. freudenreichii	500
2	1.0	P. freudenreichii	700
3	1.5	P. freudenreichii	800
4	2.0	P. freudenreichii	800
5	0.5	P. shermanii	440
6	1.0	P. shermanii	560
7	1.5	P. shermanii	700
8	2.0	P. shermanii	480

ตารางที่ 2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งธาตุไนโตรเจนและปัจจัยอื่นๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ที่มา : (63 หน้า 106)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตารางที่ 2.3 แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ที่มา : (63 หน้า 106)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างที่	เปอร์เซนต์				วิตามินบี12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)
	Yeast extract	Beef extract	Sodium lactate	N-Z amide	
1	0.4	-	1.0	-	300
2	0.4	-	1.0	0.5	330
3	0.4	-	1.0	1.0	430
4	0.4	-	1.0	2.0	590
5	0.4	-	1.0	3.0	600
6	-	0.3	1.0	1.0	390
7	-	0.6	1.0	1.0	440
8	-	1.0	1.0	1.0	460
9	-	-	1.0	1.0	80
10	0.5	-	1.0	1.0	440
11	1.0	-	1.0	1.0	450
12	1.5	-	1.0	1.0	460

ตารางที่ 2.4 แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิต วิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่เติมสารนั้น

ที่มา : (63 หน้า 107)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sudasky และ Fischer (77) ได้ทำการผลิตวิตามินบี 12 ของ P. freudenreichii โดยใช้ molasses เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน และ waste brewer's yeast เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ครั้ง

ก. ใช้ liquid waste brewer's yeast ใหม่ๆ ในปริมาณ 6,000 แกลลอน ซึ่งมีส่วนที่เป็นของแข็ง 12.2 เปอร์เซนต์ แยกเอาออกโดยใช้ที่กรองขนาด 100 mesh ได้ยีสต์ 5,975 แกลลอน ให้ความร้อน 44 องศาเซลเซียส และ เก็บโดยการกวนอย่างช้าๆ 10 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด autolysis จึงนำไปกรองผ่าน yeast separators จะได้ yeast autolysate ประมาณ 4,000 แกลลอน ประกอบด้วยของแข็ง 6 เปอร์เซนต์ นำไปผสมกับ beet molasses 8,000 แกลลอน และปรับปริมาตรเป็น 5 ลิตร โดยเติม H_2SO_4, ปรับ pHให้ได้ 7.0 โดยเติม aqua ammonia แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ P. freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 600 แกลลอน ลงไปและหมักต่อไป 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้าๆ ปรับ pH ระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7.0 ได้วิตามินบี 12 เป็น 17 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. ใช้ soluble autolyzed brewer's yeast extract ที่แห้ง เช่น yeastamin (Vico Product Company) และ beet molassas 120 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 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 40 กรัม เติมลงไปเพื่อเป็น buffer เติมน้ำกลั่นให้ครบ 2 ลิตร ทดลองใน fermenter ขนาด 4 ลิตร จากนั้นบ่มเชื้อ P. freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ประมาณ 100 มิลลิลิตร หมักต่อ 96 ชั่วโมงที่ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้าๆ ได้วิตามินบี 12 เป็น 4.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hoffman et al. (40)ได้ทดลองใช้ Propionibacterium shermanii (selected PS-B_1) เลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย molasses ที่มี dextrose 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซนต์, corn steep liquor 8 เปอร์เซนต์ เติม dimethylbenzimidazole 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดลองในถังหมัก โดยปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วย NH_4OH แล้วบ่มเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ หมัก 40 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้วิตามินบี 12 เป็น 25.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 143 กรัม หรือ 176.22 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

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

Becher <u>et</u> <u>al</u>. (16) ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ <u>Propionibacterium</u> <u>shermanii</u> strain 33 หรือ ATCC 13673 ใช้อาหารที่ประกอบด้วย

glucose	10	กรัม
nitrogen in the form of a casien proteolyzate	1.5	กรัม
nitrogen in the form of a casien acid hydrolyzate	1	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม
K_3PO_4	1.6	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
$CoSO_4.7H_2O$	12	มิลลิกรัม
pantothenic acid	4	มิลลิกรัม
biotin	0.3	มิลลิกรัม
yeast extract	5	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ inoculum 10 เปอร์เซนต์ อายุ 3-5 วัน ทดลองที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ปรับ pH แต่ละวันเป็น 6.6 เมื่อปริมาณน้ำตาลลดต่ำลงกว่า 0.5 เปอร์เซนต์ เติมน้ำตาลกลูโคสที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วแต่ละวันเพื่อให้ความเข้มข้นเป็น 1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก รักษาระดับนี้ไว้ 10 วัน ในวันที่ 5 ของการทดลอง เติม 5,6-dimethylbenzimidazole ในสารละลายอัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ในปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงไปได้ 12 วัน ได้วิตามินบี 12 เป็น 18.8 มิลลิกรัมต่อลิตร

Rudy _et al_. (72) ได้ทดลองใช้ mycelium ของ _Aspergillus niger_ ที่ได้จากการผลิต citric acidโดยเติม mycelium กับ molassas ลงไปใน fermenter เพื่อเลี้ยงเชื้อ _P. shermanii_ พบว่าได้วิตามินบี 12 เป็น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากหมักไป 96 ชั่วโมง ต่อมาเมื่อมีการเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และเกลือโคบอลท์ พบว่าได้วิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นเป็น 2.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Lim (45) ได้ทดลองเพื่อศึกษาว่า กรดอะมิโนตัวใดที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ _P. freudenreichii_ (ATCC 62070) โดยใช้กรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น alanine, leucine, isoleucine, tyrosine, methionine, glutamic acid และอื่นๆ ปรากฏว่า glycine ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 จึงทดลองเลี้ยง _P. freudenreichii_ ในอาหารที่ประกอบด้วย

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

เติม glycine ปริมาณต่างๆกัน 0, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.30 ส่วน ได้วิตามินบี 12 เป็น 13.1, 15.6, 16.8, 23 และ 22 มิลลิกรัมต่อลิตร

Renz และ Weyhenmeyer (70) ศึกษาการสังเคราะห์ dimethylbenzimidazole (5,6-DMBIA) จากวิตามินบี 2 (riboflavin) โดยใช้เชื้อ_P. shermanii_ strain 33 ใช้แบคทีเรียอายุ 3 วัน ซึ่งมีน้ำหนักเปียก 0.35 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายใน phosphate buffer 0.07 M pH 7.0 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม 1-14-c-riboflavin ลงไปประมาณ 5 มิลลิกรัม นำไปเขย่า (shaking) ด้วยความเร็ว100 รอบต่อนาที 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองปรากฏว่า C-2 ของ 5,6-DMBIA มาจาก 1-14-C-riboflavin และได้วิตามินบี 12 บริสุทธิ์ 5.95 มิลลิกรัมต่อ 0.35 กรัมของเชื้อ

2. <u>ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium</u>

1. <u>อาหาร</u>

แหล่งธาตุคาร์บอน (carbon source) มีหลายประเภทคือ ประเภทที่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น dextrose, maltose, xylose, invert sugar, corn syrup, lactose, sucrose, beet หรือ cane molasses, starch และประเภทที่เป็นสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น lactic acid, gluconic acid, citric acid และ glycerol ใช้แหล่งธาตุคาร์บอนในปริมาณ 5-10 เปอร์เซนต์(15)

จากการศึกษาของ Osman (59) กล่าวว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งธาตุคาร์บอนที่ดีที่สุดเหมาะสำหรับการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ <u>Propionibacterium shermanii</u> ส่วน Hargrove และ Leviton (35) ใช้กรดแลกติคเป็นคาร์บอน ซึ่งอาจได้จากการเติมลงไปในอาหารหรือได้จากขบวนการ fermentation ของน้ำตาลแลคโตสในนมโดย <u>Lactobacillus casei</u> ที่อยู่ร่วมกับ <u>Propionibacterium spp.</u> แบบ symbiosis Speedie และ Hull (75) ศึกษาขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ <u>Propionibacterium</u> โดยใช้วิธีการแบบ batch process พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคส หรือ แลคโตสซึ่งนิยมใช้ความเข้มข้น 8-10 เปอร์เซนต์

แหล่งธาตุไนโตรเจน (nitrogen source) มักเป็นพวกกรดอะมิโนหรือโปรตีนจากถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวโพด เนื้อสัตว์ yeast extract, tryptic digest of casein, pancreatic digest of casein, meat

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

extract,blood meal protein, bone scrap, fish meals, fish solubles, peptone, peanut meal, cotton sead meal, corn steep liquor และ lactalbumin

Osman (65) ศึกษาแหล่งธาตุไนโตรเจนต่างๆ จากเกลือแอมโมเนียม พบว่า แอมโมเนียมซิเตรท แอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนที่ดีเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii

Kucheras (41) ศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ P. shermanii พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจนจะได้วิตามินบี 12 น้อยกว่าที่ใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งธาตุไนโตรเจน กรดอะมิโนบางอย่าง เช่น glycine, methionine, serine, glutamic, arginine และ ɩ-alanine ช่วยเร่งการผลิตวิตามินบี 12 แต่ cysteine จะยับยั้งขบวนการนี้ Bukin (21) ใช้ methionine ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 นอกจากนี้ยังพบว่า methionine ทำหน้าที่ methylation

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ โคบอลท์ ไซยาไนด์ เหล็ก และ แมกนีเซียม

โคบอลท์ ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้ามีโคบอลท์ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม คือ สูงเกินไป จะเป็นพิษกับจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะใช้โคบอลท์ในอาหารได้ในช่วงไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และมีผลไปถึงการสร้างวิตามินบี 12 อาจใช้โคบอลท์ในรูปของเกลือที่ละลายในน้ำได้ เช่น cobalt chloride, sulfate, nitrate หรือเกลือโคบอลท์อื่นๆ (15)

ไซยาไนด์ ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารจะต้องเติมลงในปริมาณที่พอเหมาะ ไม่เกิน 0.1-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ไซยาไนด์จะเติมในรูปของ ammonium cyanide, metal, alkali metal และ alkaline earth, metal cyanides, ferrocyanide, ferricyanidase หรือใน

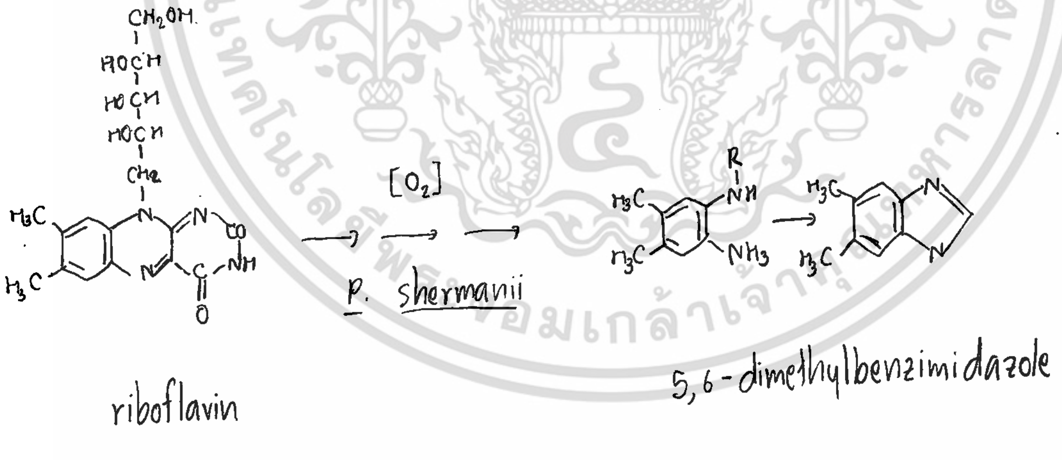
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รูป sodiium, potassium, barium, calcium,strontium และรูปอื่นๆ หรือในรูปของเหลวและแก๊ซ เช่น hydrocyanic acid, hydrogen cyanide (15)

เหล็ก (Fe) มีความสำคัญต่อการเจริญและผลิตวิตามินบี 12 ของ P. shermanii ส่วนแมกนีเซียมมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ธาตุทองแดง(Cu) และบิสมัท (Bi) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ธาตุอื่นๆนอกจากที่กล่าวมาแล้วไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ขณะที่ผงซักฟอกจะยับยั้งการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งขบวนการ metabolic ของจุลินทรีย์จะยับยั้งการเจริญและการสร้างวิตามินบี 12 ของ P. shermanii (66)

วิตามินที่สำคัญช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 คือ วิตามินบี 2 จากการค้นคว้าของ Renz (66) พบว่าสามารถใช้วิตามินบี 2 แทน 5,6-dimethylbenzimidazole ซึ่งเป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12 P. shermanii สามารถเปลี่ยนวิตามินบี 2 เป็น 5,6-dimethylbenzimidazole ได้ มี pathway ดังนี้



รูปที่ 2.2 แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12

สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร pH ที่เหมาะสมในการเจริญของ propionic acid bacteria อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 (67) จะต้องรักษาระดับ pH ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4-9 (ที่เหมาะสม 6-7) เพราะ pH สูง หรือ ต่ำกว่านี้จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจาก cobalamin ไม่คงตัวหรือถูกทำลายได้ง่าย (68)

อุณหภูมิ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในการหมัก ประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่แบคทีเรียพวกนี้เจริญได้ดี (67) จึงเหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12 ด้วย (82) zodrow (63) ทดลองใช้อุณหภูมิต่างๆ ในการหมักโดยเชื้อ P. shermanii พบว่าได้วิตามินบี 12 มากที่สุด ที่อุณหภูมิระหว่าง 18-21 องศาเซลเซียส

การให้อากาศ ศึกษาโดย Grant (30) ทดลองกับ P. freudenreichii ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมในการสร้างวิตามินบี 12 เมื่อถึงช่วงปลายของการหมัก อาหารจะขาดคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดเจริญได้ จะต้องมีการ oxygenation หรือ aeration เพื่อให้เกิดฟองอากาศในอาหาร วิธีนี้นิยมใช้ mechanical agitation และ ปรับ pH ของอาหารให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มปริมาณของวิตามินบี 12 ได้ด้วย

Anaerobic condition (81) ทำได้โดยการผ่าน non-oxidizing gas เช่น ไนโตรเจน หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในอาหาร หรือ รักษาระดับแก๊ซเหนืออาหารในสภาวะนี้ไม่ต้องกวน เพราะจะเป็นการนำออกซิเจนลงไปในอาหาร ต่อมาใช้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้น ช่วยรักษาสภาพ anaerobic ของอาหารในการหมักธรรมดาระยะเวลามากกว่า 120 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารสัมผัสกับอากาศ 70-80 ชั่วโมง ในระหว่างการหมักจะเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม้ว่าจะให้ออกซิเจนเพียง 24-50 ชั่วโมงเท่านั้นก็ช่วยเพิ่มผลผลิต anaerobic condition นิยมทำในช่วงมากกว่าครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ในการหมักเล็กน้อย เมื่ออาหารสัมผัสกับออกซิเจนเป็นการทำให้อยู่ในสภาพ microaerophilic มากกว่า aerobic condition เพราะถ้าให้ออกซิเจนมากเกินไป จะทำให้ผลผลิตของ cobalamin น้อยลง

batch process (75) ขบวนการผลิต cobalamin โดยเริ่มด้วยหมักอาหารเหลวด้วยเชื้อ Propionibacterium เป็นแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบี 12 ในสภาพ anaerobic และหลังจากนั้นให้อาหารสัมผัสกับออกซิเจน และ recovery วิตามินบี 12 ได้จากอาหารที่ใช้หมักใน batch culture อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของการหมัก เช่น องค์ประกอบของอาหาร อายุ และขนาดของ inoculum อุณหภูมิ pH และ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

continuous process (75) การหมักแบ่งเป็น 2 ตอน ระยะแรกหมักในสภาพ anaerobic เรียกว่าตอนที่1 ระหว่างนี้จะมีการเติมสารอาหารลงไปจะหมักต่อไปถึงตอนที่ 2 ระยะนี้อาหารสัมผัสกับอากาศ และเติมอาหารลงไปอีก อัตราในการเติมอาหารลงไปในตอนที่1 และ ที่2 จะต้องมีปริมาตร และ ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งการผลิตวิตามินบี 12 จะเกิดขึ้นในการหมักตอนที่ 2

Baron (15) พบว่าเมื่อเติม thickening agent ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารนั้นโดยไม่ต้องมีการกวน และมีประโยชน์มากในการเจริญ และ activity ของเซล ในสภาพนี้ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นและได้ cobalamin เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ thickening agent ที่เติมลงไปทำให้แบคทีเรียมีความทนทาน หรือ สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าสภาพธรรมดา เช่น การหมักในสภาพที่มี thickening agent จุลินทรีย์ทนต่อโคบอลท์และไซยาไนด์อิออนได้ดีกว่าในสภาพปกติ จึงช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 และสามารถใช้ thickening agent เพื่อให้ได้สภาพ microaerophlic และ การเพิ่มความหนืดทำให้อาหารกลายเป็น semi-solid ช่วยป้องกันไม่ให้เซลตกไปอยู่ที่ก้นภาชนะ thickening

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

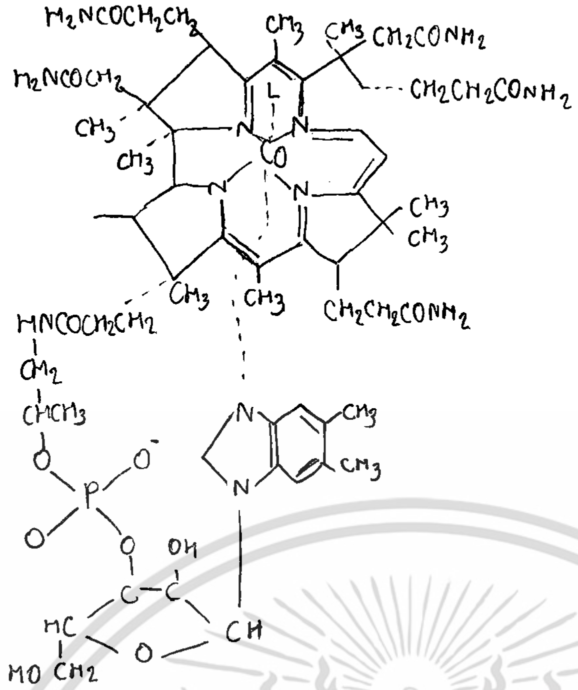
agent ที่ใช้ได้แก่ วุ้นมีความเข้มข้นในช่วง 0.1-2 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก corn strach ความเข้มข้น 1.1-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมี thickening agent อื่นๆที่ใช้ได้ คือ methyl cellulose, carboxymethyl cellulose, carragenin, pectin, sodium alginate, gum tragacanth, polyvinyl pyrrolidone

3. การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

ในปี 1926 Minot และ Murphy (51) รายงานว่าตับมีสารที่สามารถรักษาโรค pernicious anemia ได้ และสารนี้ถูกสกัดครั้งแรกออกจากตับในปี 1948 โดย Rickes et al. (77) และ Smith (73) สารนี้มีชื่อว่าวิตามินบี 12 ละลายน้ำได้มีโมเลกุลใหญ่ น้ำหนัก 1350 เป็นผลึกรูปเข็มหรือปริซึม สีแดงเข้ม สูตรเคมี คือ $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ (72) มีโครงสร้างสลับซับซ้อนยากแก่การศึกษา แต่ Hodgin et al. (38) ก็ได้พยายามศึกษาต่อมา และในที่สุด ก็เสนอสูตรโครงสร้างวิตามินบี 12 ได้สำเร็จโดยใช้วิธี x-ray diffraction technique ช่วยซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าถูกต้อง

โมเลกุลของวิตามินบี 12 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ planar group และ nucleotide group ส่วนที่เป็น planar group เป็นส่วนกลางของโครงสร้างเรียกว่า corrin ring ฉะนั้นสารประกอบวิตามินบี 12 เรียกได้อีกชื่อว่า corrinoid ส่วนที่เป็น nucleotide group (benzimidazole ring) ซึ่งส่วนนี้จะตั้งอยู่ในแนวเกือบตั้งฉากกับ planar group โดยมีโคบอลท์เป็นแกนกลางเชื่อมกับ tetrapyrrole (corrin) ring (19,63,68,79) การเรียกชื่อสารนี้ขึ้นกับสูตรโครงสร้าง คำว่า cobalamin หมายถึงโมเลกุลของวิตามินบี 12 แต่ถ้าแกนของ planar group เป็นสารอื่นก็มีวิธีการเรียกชื่อแตกต่างกันออกไป แสดงไว้ในรูปที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Trivial names and abbreviations are given in parentheses.

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

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

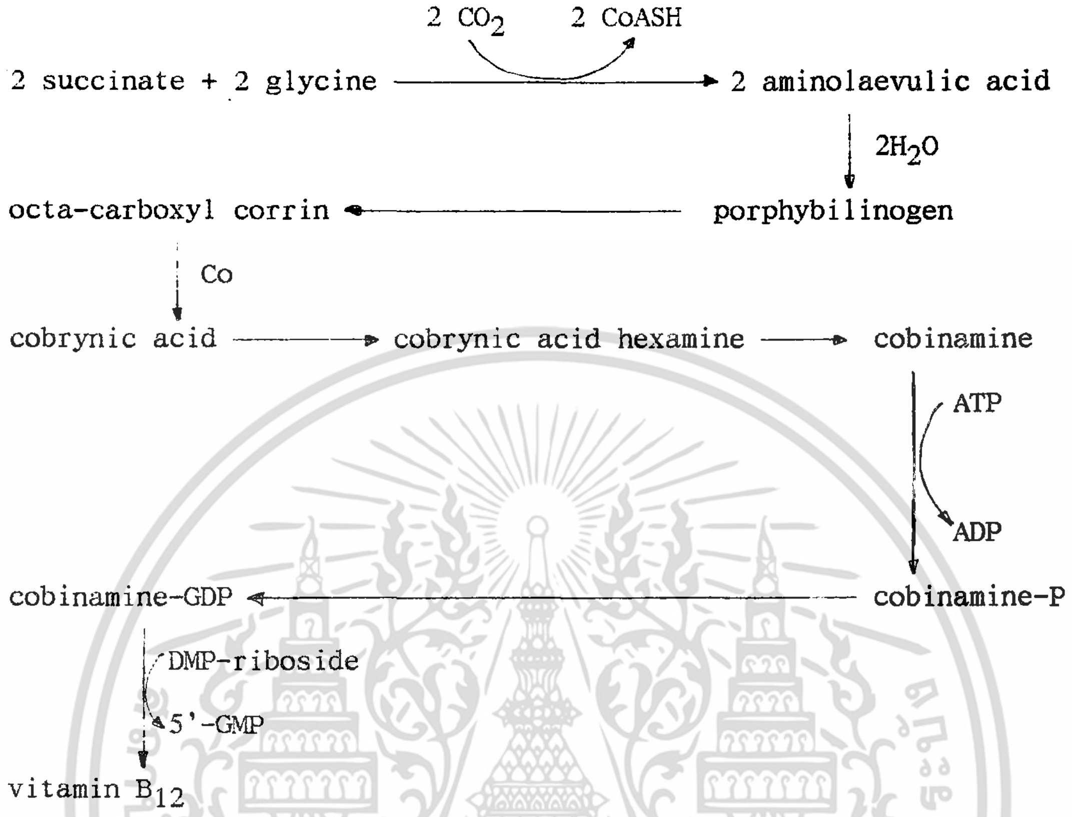
L= CH_3: ɑ-(5,6-dimethylbenzimidazolyl) -Co-methylcobamide or methylcobalamin (CH_3B_{12}) ; methyl-B_{12})

L = OH: ɑ-5,6-dimethylbenzumidazolyl)hyydroxocobamide or hydroxocobalamin (OH-B_{12};B_{12b})

<u>รูปที่ 2.5</u> Structure of vitamin B_{12} and related compounds

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12 เสนอโดย Boretti et al. (18)



ADP = adenosine diphosphate　　ATP = adenosine triphosphate

GMP = guanosine monophosphate　　GTP = guanosine diphosphate

DMP-riboside = dimethylbenzimidazole-riboside

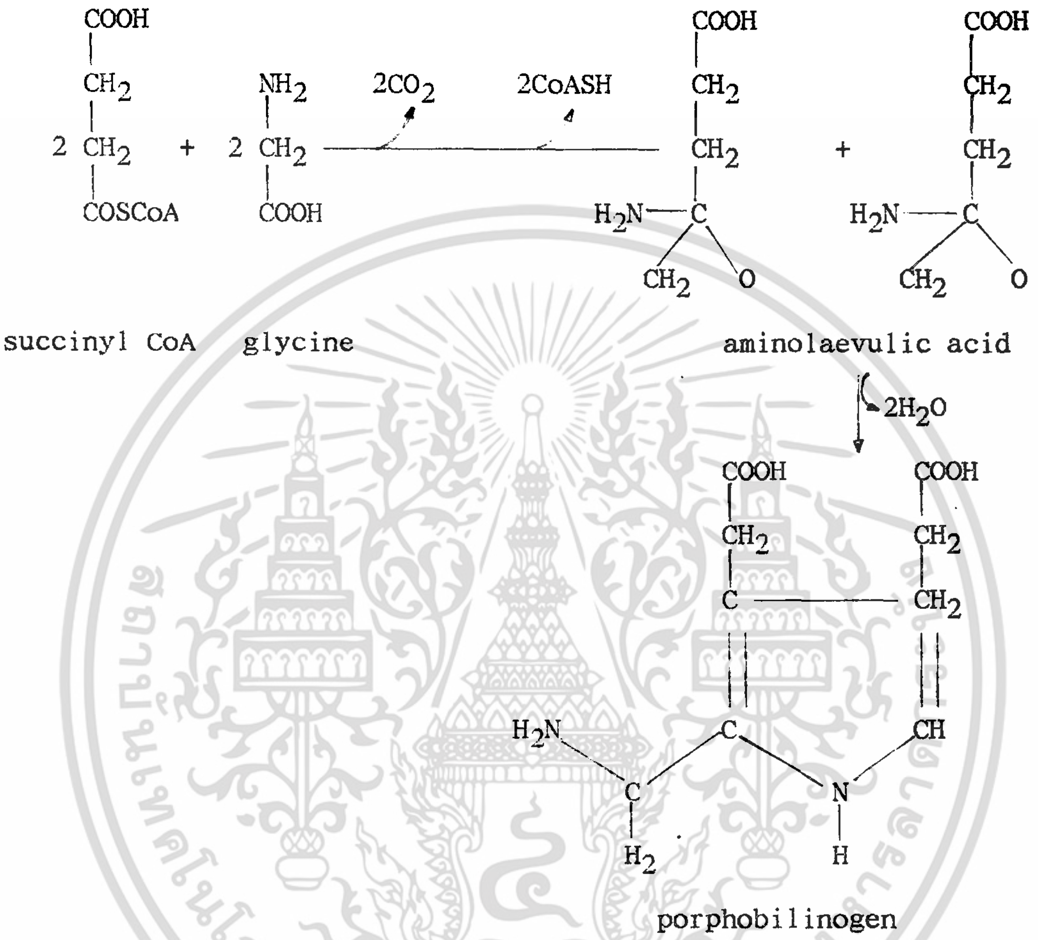
รูปที่ 2.3 แสดงสมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12

จากสมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12 ข้างบนนี้ สามารถแบ่งเป็น 4 ขั้น (68,80)

1. Formation of the corrin ring : Neuberger et al.(54) แสดงให้เห็นว่า pyrrole ring เกิดจาก prophobilinogen และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

prophobilinogen เปลี่ยนมาจาก succinate และ glycine ดังนี้



รูปที่ 2.4 แสดงการสังเคราะห์ corrin ring

macroring อันแรกที่เกิดขึ้นคือ octacarboxylcorrin และจะเปลี่ยนต่อไปโดยการ methylation decarboxylation และ co-ordination ด้วยโคบอลท์ไปเป็น cobrynic acid และเปลี่ยนเป็น cobrynic acid hexamine และเปลี่ยนเป็น cobinamine ในที่สุด

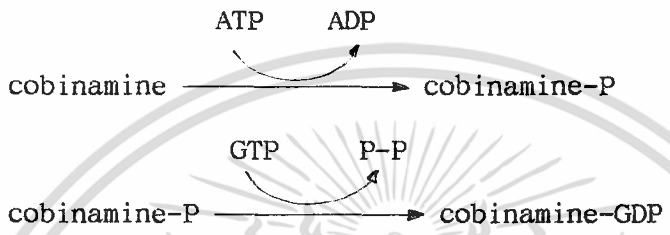
octa-carboxylcorrin —— cobrynic acid —— cobrynic acid hexamine

cobinamine

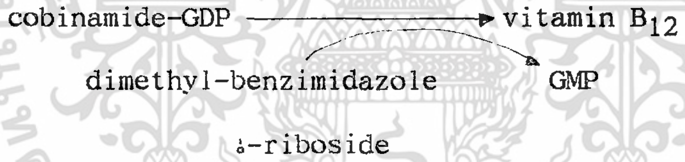
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Incorporation of nucleotide residue

Boretti _et_ _al_. (18) กล่าวว่า cobinamine จะถูก activate ให้อยู่ในรูป cobinamine-GTP ซึ่งเป็น intermidiate ที่สำคัญใน biosynthesis ของวิตามินบี 12 ดังนี้



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



4. Formation of purine residue

เป็นปฏิกิริยาสุดท้ายของการสร้างวิตามินบี 12 หรือ vitamin B_{12} analogues

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์สร้างวิตามินบี 12 ขึ้นภายในเซลและไม่ปล่อยออกมานอกเซล Perlman (63) รายงานว่าวิตามินบี 12 ที่พบในจุลินทรีย์อยู่ในรูปของ coenzyme ถึง 80 เปอร์เซนต์ และส่วนที่บริสุทธิ์ที่สุดที่เตรียมได้จากจุลินทรีย์มี cobinamine peptide อยู่ 23 เปอร์เซนต์ การสังเคราะห์ coenzyme B_{12} เกิดขึ้นเมื่อมีการเติม adenine nucleoside ให้กับวิตามินบี 12 แล้วจึงจะได้ coenzyme B_{12} ได้มีผู้สกัด coenzyme B_{12} จาก Propionibacterium shermanii และจาก Clostridium tetanomorphum ได้ cofactor ที่ใช้ในการสร้างคือ glutathione, $NADH_2$, flavin, $MnCl_2$ และ ATP ใช้วิธี label C^{14} ของ ATP แสดงให้เห็นว่า ATP ให้ทั้ง adenine และ sugar residdue ในการสร้าง coenzyme B_{12} นั่นคือ adenosine ถูก incorporate เข้าไปโดยไม่มีการบุบสลาย และในสภาพปกติ adenine nucleotide จะไปติดกับ ring ของวิตามินบี 12 ก่อนที่จะสร้างเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์ (68)

จุลินทรีย์ที่ทราบว่าสามารถผลิตวิตามินบี 12 และสารที่มี activity คล้ายกับวิตามินบี 12 ในปัจจุบันมี แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส (actinomycetes) ยีสต์ รา และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เช่น

แบคทีเรีย ได้แก่

Aerobacter aerogenes (67)	Agrobaccterium radiobacter (39)
Alcaligenes faecalis (40)	Azotobacter sp. (63)
Bacillus megaterium (25,28,44,63,67)	B. subtilis (70)
B. stearothermophillus (14)	Butyribacterium rettgeri (63)
Clostridium butyricum (81)	Cl. cochlearium (81)
Cl. flabelliferum (81)	Cl. tetanomorphum (81)
Escherichia coli (34)	Flavobacterium acetylicum (25)
F. acidificum (25)	F. aquatile (25)
F. arborescens (25)	F. devorans (33)
F. esteroaromaticum (25)	F. flavescens (25)

เอกสารนี้...ได้...งานเพื่อการศึกษา...ไม่...นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F. solare (66) F. suaveolens (25)

Lactobacillus arabinosus (71) L. casei (74)

Propionibacterium freudenreichii (43)

P. shermanii (35) P. zeae (25)

Proteus vulgaris (37) Pseudomonas aeroginosa (70)

Ps. fluorescens (70) Ps. midenbergii (70)

Ps. mucidolens (70) Ps. lumichroma (70)

Ps. chloraraphis (70) Ps. denitrificans (70)

Rhizobium trifolii (42) Rh. meliloti (42)

Serratia marcescens (77) Staphylococcus aureus (72)

Streptococcus faecalis (74)

แอคทิโนมัยซีส ได้แก่

Micromonospora รวมทั้ง 69 species ที่ไม่สามารถ classified และ identified species (81)

Micromonospora purpuria (80) M. echinospora (80)

M. halophytica (80) M. fusca (80)

M. chalcea (80) M. carbonacea (80)

Mycobacterium phlei (25) My. smegmatis (69)

My. tubercurosum (65) Norcardia rugosa (47)

Sreptomyces albidoflavus (25) St. antibioticus (25)

St. aureofaciens (62) St. aureus (25)

St. colombiensis (25) St. farinosus (25)

St. fradiae (25) St. griseus (49)

St. olivaceus (31,32,33) St. roseochromogenes (25)

St. vinaceus (17) Streptomyces sp. (25)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ ได้แก่

Torula sp. (82)

รา ได้แก่

Penicillium lilacinum (77)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ได้แก่

Anabaena cylindrica (25)

Calothrix parietina (25)

Plectonema nostocorum (25)

สาหร่ายทะเล (marine algae) ได้แก่

Ceranium rubrum (25)

Champia parvula (25)

จุลินทรีย์ที่ผลิตวิตามินบี 12 ที่กล่าวมาแล้ว มีบางชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ในปริมาณสูง และถูกนำมาผลิตวิตามินบี 12 ในอุตสาหกรรม ดังแสดงในตารางที่ 2.5 รวมทั้งวิธีการผลิต อาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Microorganisms	Ingredients of medium	yield B_{12} (mg/liter)	Comments
Bacillus megaterium	Beet or cane molasses; ammonium phosphate; cobalt salt; inorganic salts	0.45	18 hour aerated fermentation
Propionibacterium freudenreichii	Cornsteep liquor; glucose; cobalt salt; maintained at pH 7 with NH_4oh	19	6-day batch fermentation (3 day anaero bic + 3 day aerobic)
Propionibacterium shermanii	Cornsteep liqour; glucose; cobalt salt; maintained at pH 7 with NH_4OH	23	7-day batch fermentation (3 day anaero bic + 4 day aerobic)
Streptomyces griseus	Glucose; soybean meal; cobaltsalt;	0.3	6-day batch (aerated)
Streptomyces olivaceus	Glucose; soybean meal; distiller' solubles; cobalt salt; inorganic salts	3.3	6-day batch (aerated)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Streptomyces species	Soybean meal; glucose; cobalt salt; K_2HPO_4	5.7	6-day batch (aerated)

ที่มา : (72 หน้า 141)

4. การ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์ (Microbioilogical assay

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

1. Lactobacillus species แรกที่ใช้ในการตรวจหาวิตามินบี 12 คือ L. lactis Dorner (LLD) เพราะพบว่าต้องการสารที่แยกได้จากตับ จากการศึกษาต่อมาได้ใช้ L. leichmannii (ATCC 4797) หรือ L. leichmannii (ATCC 7830) แทนเพราะพบข้อผิดพลาดจากการใช้ L.lactis Dorner 8000 ในการตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ความยุ่งยากในการใช้ Lactobacillus ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 พบในกรณีที่มีสารปฏิชีวนะอยู่ด้วย และจุลินทรีย์พวกนี้ยังตอบสนองต่อ deoxyriboside และ sensitive ต่อ sodium chloride ใน assay medium นอกจากนี้ยังสามารถใช้สารที่คล้ายคลึงกับวิตามินบี 12 เช่น Factor A, pseudovitamin B_{12}, factor อื่นๆ ที่พบใน rumen sewage sludge, intestine และ microbial fermentation การ assay โดยใช้ Lactobacillus มักใช้วิธี tube assay โดยการวัดความขุ่นหลังจากเชื้อเจริญ 18-40 ชั่วโมง หรือไตเตรทหาปริมาณกรดหลังจากเชื้อเจริญ 24 ชั่วโมง วิธีการ assay ที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปคือวิธีของ Association of vitamin chemists (11) และ U.S. Pharmacopeia (24)

2. Escherichia coli (mutant)

ในสภาพธรรมดาจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่ต้องการวิตามินบี 12 แต่ E. coli ที่ใช้ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 แยกได้โดย Davis และ Mingioli (26) เป็นพวก

ultraviolet-induced stable mutant, No.113-3 ต้องการ methionine และวิตามินบี 12 ในการเจริญแต่ไม่ตอบสนองต่อ deoxyriboside อาจใช้ assay ด้วยวิธี tube assay โดยวัดความขุ่น แต่มีข้อบกพร่องที่ความสามารถในการใช้ประโยชน์มีขอบเขตจำกัด คือ ใช้ได้ดีกับ complex natural material วิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ คือ plate assay หรือ agar diffusion method

3. Euglena gracilis

Euglena gracilis var. bacillarus เป็นพวก green photosynthetic flagellate ที่ต้องการวิตามินบี 12 และ thiamine เป็น essential growth factor ใช้วิตามินบี 12 ได้ในรูปที่เป็นอิสระเท่านั้น ส่วนวิตามินบี 12 ที่ติดกับโปรตีนใช้ไม่ได้ มีคุณสมบัติต่างจาก Lactobacillus คือถ้าอาหารมี thymidine หรือ deoxyriboside ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะไม่เจริญ เชื้อนี้สามารถใช้ hydroxycobalamin ได้โดยตรง ดังนั้นจึงไม่ต้องใช้ cyanide ช่วย stabilize และยังตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ทุกแบบ การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ใช้วิธี turbidimetric หรือ ไตเตรทด่าง (alkali) ใช้เวลา 8 วัน แต่เมื่อมีการปรับปรุงอาหาร และสภาวะการเจริญจึงสามารถลดเวลาลงเหลือ 5-6 วัน

4. Orchromonas malhamensis

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

1. Propionibacterium freudenreichii ใช้ศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 ได้รับจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นจัดเก็บในสภาพ stock culture ที่ อุณหภูมิ ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ใน MRS Agar stab (ภาคผนวก ก)

2. Lactobacillus liechmannii ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บ stock culture ใน tomato juice agar แบบ agar stab (ภาคผนวก ก)

วัสดุเหลือใช้

น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม ได้รับจาก บริษัท อุตสาหกรรมนมไทยมะลิ จำกัด สำโรง จังหวัดสมุทรปราการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Suction pump

2. Autoclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Incubator

4. Hot air oven

5. Centrifuge

6. Spectrophotometer

7. Kjeltec System 1002 Distilling Unit

8. Autoburette

9. Water bath

10. Fermenter

11. Air pump

12. Assay tube ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร

13. Quewett

14. ขวด BOD.

15. เครื่องแก้วต่างๆ

สารเคมี

1. Glucose

2. Yeast extract

3. $CoSO_4 \cdot 7H_2O$

4. H_2SO_4

5. NaOH

6. Methionine

7. Riboflavin

8. Cyanocobalamin

9. Viamin B_{12} assay medium

10. $Na_2SO_3 \cdot 5H_2O$

11. Boric acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

1. <u>การเตรียมอาหารที่ใช้ผลิตวิตามินบี 12</u>

1.1 การเตรียม complete medium

ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดในภาคผนวก ก

1.2 การเตรียมน้ำทิ้งเพื่อการเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 แบ่งน้ำทิ้งเก็บใส่ขวดสีชาแช่แข็งไว้เพื่อสะดวกแก่การไปใช้

1.2.2 เมื่อจะนำมาใช้ให้ละลาย โดยแช่ในอ่างที่มีน้ำหล่ออยู่

1.2.3 แยกเอาตะกอนที่แขวนลอยออก โดยการกรอง ด้วยเครื่องกรองแบบสูญญากาศ ของ Tokyo Rikakikia Co; LTD. Type 4-35 โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 5

1.2.4 เติมสารเคมีตามชนิด และปริมาณที่ต้องการศึกษาในแต่ละการทดลอง

1.2.5 ปรับ pH ตามที่ต้องการด้วย NH_4OH 15 เปอร์เซนต์ หรือ HCl 15 เปอร์เซนต์

1.2.6 นำมานึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. <u>การหาอัตราการเจริญ (growth rate) และปริมาณเซลสูงสุด(maximum yield)</u>

2.1 การเตรียม inoculum

2.1.1 ถ่ายเชื้อ <u>Propionibacterium</u> <u>freudenreichii</u> จาก agar stab ลงใน complete medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุลงในฟลาสก์ ขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

250 มิลลิลิตร

2.1.2 บ่มฟลาสก์ในข้อ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.1.3 เมื่อครบวันที่ 4 วัดความขุ่นของเชื้อเป็น Optical Density (O.D.) ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 660 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer ของ LKB BIOCHRUM รุ่น 4050

2.1.4 ทำ suspension ของเชื้อให้เจือจางลงจนได้ O.D. เท่ากับ 0.5 ใช้ suspension นี้เป็น inoculum ในการทดลองแต่ละครั้ง

2.2 การวัด O.D. ที่ระยะเวลาต่างๆกัน

2.2.1 เตรียมอาหารที่จะศึกษาบรรจุลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร

2.2.2 inoculate ด้วย inoculum จากข้อ 2.1.4 ทำ 2 ซ้ำ (duplicate) ทุกการทดลอง

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆดังต่อไปนี้ คือ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 144, 168 ชั่วโมง

2.2.4 นำแต่ละฟลาสก์มาวัด O.D. โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันกับที่ทำการศึกษาเป็น blank เมื่อ O.D.เกิน 1 ทำให้เจือจางจนได้น้อยกว่า 1 (0.6-1) ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ blank เจือจางในอัตราส่วนเดียวกัน

2.2.5 จดค่า O.D. สองซ้ำในระยะเวลาที่กำหนดหาค่าเฉลี่ย

2.3 การเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต

เขียนกราฟระหว่างค่า O.D.เฉลี่ย กับ ระยะเวลาโดยให้แกนตั้งของกราฟเป็นค่า O.D. และแกนนอนเป็นช่วงเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การหาอัตราการเจริญและปริมาณเซลสูงสุด

หาอัตราการเจริญและปริมาณเซลสูงสุด โดยอ่านผลจากกราฟแสดงการเจริญเติบโต (2.3) โดยที่อัตราการเจริญ อ่านค่าได้จากความชัน (slope) ของกราฟแสดงการเจริญเติบโต ปริมาณเซลสูงสุด อ่านค่าได้จาก O.D.ที่มีค่าสูงสุด

3. <u>การเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ กับน้ำหนักแห้ง(dry weight cell)</u>

3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหาร complete medium จนกระทั่งได้ปริมาณเซลสูงสุดประมาณ 4วัน (จากรูปที่4.1)

3.2 เมื่อครบวันที่ 4 แบ่งใส่หลอด centrifuge ปั่นด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

3.3 รินน้ำออก เติมน้ำกลั่น ทำเป็น suspension แล้วนำไปปั่นใหม่ทำเช่นนี้ 3 ครั้งเพื่อล้างเซล

3.4 เติมน้ำกลั่นจนได้ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.7

3.5 แบ่งใส่ในกระทงอะลูมิเนียมที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ

3.6 นำเข้าตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบอีก ทำซ้ำ 3 ครั้ง จนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง

3.7 ทำการเจือจาง suspension ที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 1:1, 1:2, 1:3 วัดค่า O.D. แบ่งใส่ในกระทงอะลูมิเนียม ที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว 10 โดยปิเปตมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ

3.8 นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน ระหว่างความขุ่นของเชื้อ กับ น้ำหนักแห้ง โดยให้ O.D.เป็นแกนตั้ง และน้ำหนักแห้งเป็นแกนนอน สามารถใช้เปรียบเทียบหาน้ำหนักแห้งของเชื้อนี้ในอาหารอื่นๆ จากค่า O.D. ที่อ่านได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. <u>ศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12ของเชื้อในน้ำทิ้งจากผลิตภัณฑ์นม</u>

4.1 เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนที่มีในอาหาร complete medium

4.1.1 เติมสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนใน complete medium คือ yeast extract ปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ ลงในน้ำทิ้ง ฟลาสก์ที่ 1

4.1.2 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 1เปอร์เซนต์ ลงในน้ำทิ้ง ฟลาสก์ที่ 2

4.1.3 เติมน้ำตาลกลูโคส และ yeast extract ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ และ 0.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ลงในน้ำทิ้ง ฟลาสก์ที่ 3

เปรียบเทียบอัตราการเจริญ และปริมาณเซลสูงสุดเช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.2 เปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส ในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ พร้อมด้วย yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ปรับ pH ให้ได้ 7.0

ศึกษาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลสูงสุดเช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.3 เปรียบเทียบปริมาณของ yeast extract

เปรียบเทียบระหว่างการเจริญของเชื้อในวัสดุเหลือใช้จากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เมื่อเติม yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ กันดังนี้ 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ พร้อมด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซนต์ ปรับ pH ให้ได้ 7.0

ศึกษาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลสูงสุดเช่นเดียวกับข้อ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 เปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์

เปรียบเทียบปริมาณของเชื้อเมื่อเติมโคบอลท์ในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 8, 12, 16, 20, 24 และ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมด้วยน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ปรับ pH ให้ได้ 7.0

ศึกษาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลสูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

5. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี12

5.1 หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ณ สภาวะ stationary และ mixing ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

5.2 หาปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เมื่อเติม glucose 0.2 เปอร์เซนต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 8.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, วิตามินบี 2 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary และ mixing ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48, 72, 96, 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี12 ใน fermentation liquor ใช้วิธี turbidimetric method of microbiological assay โดยเชื้อ Lactobacillus leichmannii เป็น test organism ใช้ assay medium ของ Difco ซึ่งไม่มีวิตามินบี 12 มีเฉพาะสารที่สำคัญต่อการเจริญของ L. leichmannii

5.3 การเตรียม sample (extraction)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.1 ปิเปต sample ลงใน test tube 10 มิลลิลิตร เติม buffer cyanide solution 1 มิลลิลิตร

5.3.2 เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer

5.3.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บ supernatant ไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งอยู่ cobalamin จะถูกปล่อยออกจากเซลและเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วน supernatant

5.3.4 เจือจาง supernatant ที่ได้ เพื่อให้วิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้ โดยเจือจางในอัตราส่วน 1, 1:10, 1:100, 1:1000

5.3.5 นำ sample ไปหาปริมาณวิตามินบี 12

5.4 การเตรียม vitamin B_{12} standard solution

5.4.1 การเตรียม stock solution vitamin B_{12} ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดในภาคผนวก ข

5.4.2 การเตรียม working standard vitamin B_{12} ความเข้มข้น 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก stock solution vitamin B_{12}

solution A : ดูด stock solution จาก ข้อ 6.2.1 0.5 มิลลิลิตร เจือจางเป็น 100 เท่า โดยใช้น้ำกลั่น

solution B : เจือจาง solotion A 0.1 มิลลิลิตร และ KCN 0.05 เปอร์เซนต์ 10 มิลลิลิตรจะได้ working standard มีวิตามินบี 12 เข้มข้น 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

5.5.3 การเตรียม standard assay tube

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5.3.1 นำ solution B ใส่ใน assay tube ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ทำความเข้มข้นวิตามินบี 12 ในแต่ละหลอดเป็น 0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 นาโนกรัมต่อหลอด (ng) โดยแต่ละความเข้มข้นทำสองซ้ำ (duplicate)

5.5.3.2 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร

5.5.3.3 ใส่ double strength assay medium ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวม 3 มิลลิลิตร

5.5.3.4 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer ใส่ใน rack หุ้มปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

5.5.3.5 นำทั้ง standard assay tube และ sample assay tube ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น

ในการ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องทำ calibration curve ทุกครั้งเพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก calibbration curve

5.6 การเตรียม sample assay tube

5.6.1 นำ supernatant ของ sample ที่เจือจางแล้วในข้อ 5.3.4 เตรียมในลักษณะเดียวกันกับ standard assay tube (ข้อ 5.5.3.2 - 5.5.3.3)

5.6.2 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer ใส่ใน rack หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม

5.6.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

5.7 การเตรียม suspension ของเชื้อ <u>Lactobacillus</u> <u>liechmannii</u>

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.7.1 ถ่ายเชื้อ L. liechmannii จาก stock culture ใน agar stab ทุกวันใน 1 สัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพ active

5.7.2 เขี่ยเชื้อ L. liechmannii จาก agar stab ในข้อ 5.7.1 ลงใน micro-inoculum broth (ศึกษาการเตรียมจากภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.7.3 ปั่นเซลเอาส่วนตะกอนไว้ใช้ ส่วนใสทิ้งไป

5.7.4 นำเซลที่ได้มาล้างไม่ให้มีวิตามินบี 12 โดยใช้ single strength assay medium (ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) หรือใช้ 0.85 เปอร์เซนต์ ของ saline solution ผสมโดยใช้ cyclo mixer

5.7.5 นำเซลไปปั่น ทำเช่นนี้ 3-4 ครั้ง

5.7.6 นำเซล L. leichmannii ใส่ใน single strength assay medium 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้เป็น 1:10 ด้วย single strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็น inoculum cell suspension

5.7.7 นำ inoculum ของ suspension เชื้อที่ได้หยดลงใน standard assay tube และ sample assay tube หลอดละ 1 หยด โดยใช้ micro pipette ยกเว้นหลอดที่ใช้เป็น blank

5.7.8 เขย่าทั้ง rack นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

5.7.9 เขียนกราฟ และคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12 ใน sample ออกมาเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์สารต่างๆในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม

6.1 วิเคราะห์หา crude protien โดยวิธี kjedahl method

6.1.1 ปิเปตดูดน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด digest tube

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.1.2 เติม potassium sulfate 5 กรัม และ copper sulfate 0.1 กรัม

6.1.3 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 10 มิลลิลิตร และใส่เศษกระเบื้อง เพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง

6.1.4 ทำการย่อยโปรตีน โดยใช้ Kjeltec ตั้ง อุณหภูมิที่ 420 องศาเซลเซียส ทำการย่อยเป็นเวลา 30 นาที จนสารละลายเป็นสีเขียวใส

6.1.5 ทิ้งให้เย็น (ไม่ควรทิ้งให้เย็นนานจนเกินไป เพราะอาจทำให้เกลือตกผลึก และไม่ควรร้อนจนเกินไป อาจทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรง) เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

6.1.6 เติมด่าง NaOH ความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นโดยใช้เวลา 3 นาที เก็บแอมโมเนียในกรดบอริก ความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งหยด screeened methyl red indicator 2-3 หยด

6.1.7 ใช้เวลาในการกลั่น 5 นาที ปิดเครื่อง

6.1.8 ทำการไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N. H_2SO_4 จดปริมาตรกรดที่ใช้ไป

6.1.9 ทำการทดลองแบบเดิมอีกครั้งโดยไม่มีตัวอย่าง ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำสารละลายที่กลั่นได้ ไตเตรทกับ 0.1 N. H_2SO_4 จดปริมาตรกรดที่ใช้ไป

6.2 วิเคราะห์หาคาร์โบไฮเดรท โดยใช้ phenolic method

6.2.1 เจือจางน้ำทิ้งในอัตราส่วน 1, 1:10, 1:100, 1:1,000 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.2.2 เติม phenol 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.2.3 เติม conc. sulfuric ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปิเปตลงไปตรงๆ ไม่ให้โดนข้างๆหลอด

6.2.4 นำไปแช่เย็นในน้ำแข็ง แล้ววัดค่า O.D.ที่ 488 นาโนเมตร

6.2.5 การหา standard curve ของ glucose

6.2.5.1 ชั่ง glucose 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2.5.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 6.2.5.1 มา ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 มิลลิลิตร

6.2.5.3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด

6.2.5.4 เติม phenol 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.2.5.5 เติม conc. sulfuric ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปิเปตลงไปตรงๆไม่ให้โดนข้างๆหลอด

6.2.5.6 นำไปแช่เย็นในน้ำแข็ง แล้ววัดค่า O.D. ที่ 488 นาโนเมตร

6.3 การวิเคราะห์หา BOD ตามวิธีของ American Pulbic Health Association (6)

การวิเคราะห์หา BOD ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม 3 ชนิด

ชนิดที่ 1 หา BOD ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม

ชนิดที่ 2 หา BOD ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์,yeast extract 2 เปอร์เซนต์,โคบอลท์ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร,วิตามินบี 2 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ชนิดที่ 3 หา BOD ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นมที่เติมสารต่างๆหลังจากการเลี้ยงเชื้อบักเตรี ณ ชั่วโมงที่ 120

6.3.1 การวัด pH

วัด pH ของน้ำที่ต้องการวิเคราะห์

6.3.1.1 ถ้า pH มากกว่า 7 ทำให้เป็นกลางด้วยกรด H_2SO_4 1 N

6.3.1.2 ถ้า pH น้อยกว่า 7 ทำให้เป็นกลางด้วยด่าง NaOH 1 N

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

6.3.2 การเตรียมน้ำเจือจาง

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.3.2.1 นำน้ำกลั่นปริมาณที่ต้องการ เติม phosphate buffer, magnesium sulfate,calcium chloride และ ferric chloride อย่างละ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

6.3.2.2 พ่นอากาศในน้ำที่เตรียมใน 6.3.2.1 โดยใช้ air pump เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.3.3 การเตรียม diluted sample

การเตรียม sample เพื่อ incubate ควรทำหลายๆ dilution โดยใช้หลักทั่วๆ ไปในการทำดังนี้

0.1-1.0 เปอร์เซนต์ สำหรับ strong waste

1-5 เปอร์เซนต์ สำหรับ raw and settle sewage

5-25 เปอร์เซนต์ สำหรับ oxidize effluent

25-100 เปอร์เซนต์ สำหรับ polluted river water

6.3.3.1 ปิเปตดูด sample ถ่ายใน dilution water ซึ่งบรรจุในกระบอกตวงขนาด 1 ลิตร

6.3.3.2 ค่อยๆคน dilution water และ sample โดยไม่ให้มีฟองอากาศ

6.3.3.3 ค่อยๆริน dilution sample ลงในขวด BOD 3 ขวด

6.3.3.4 ขวดที่ 1 นำไปหา initial dissolved oxygen ทันที อีก 2 ขวด นำไปบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อหา 5-day dissolved oxygen

6.3.4 การหา dissolved oxygen

6.3.4.1 เติม $MnSO_4$ 2 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มอยู่ในน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งต้องมีให้ตัดแปลงหรือ... ...ที่มีการนำไปใช้

6.3.4.2 เติม A-I-A 2 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มอยู่ในน้ำ

6.3.4.3 ปิดจุก เขย่าขวดแบบคว่ำและหงายสลับกัน จนเกิดปฏิกริยาทั่วทั้งขวด

6.3.4.4 รอจนได้ตะกอนสีน้ำตาลแดงประมาณครึ่งขวด เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 2 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อยๆไหลลงไปข้างขวด

6.3.4.5 ปิดจุกเขย่าขวดตั้งทิ้งไว้ จนเห็นน้ำใสสีน้ำตาลแดง

6.3.4.6 ใช้ปิเปตดูดน้ำใสสีน้ำตาลแดงปริมาตร 203 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร

6.3.4.7 นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.025 N จนเปลี่ยนเป็นสีแดงเรื่อๆ

6.3.4.8 เติมน้ำแป้งลงไป 3-4 หยด เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ไตเตรทต่อเป็นสีขาวใส

6.3.4.9 จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate ที่ใช้ไปทั้งหมด นำไปคำนวณหาค่า DO

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

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

จากการทดลองได้กราฟมาตรฐาน ระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) และน้ำหนักแห้งของเชื้อ เป็นเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 4.4 ในการทดลองต่อไปใช้กราฟมาตรฐานนี้เทียบกับน้ำหนักแห้งของเซล (กรัมต่อลิตร) จากค่า O.D. ที่อ่านได้

2. ผลการศึกษาอัตราการเจริญ (growth rate) และปริมาณเซลสูงสุด (maximum yield) ของเชื้อ P. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม และ น้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆ

2.1 ผลการศึกษาการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจน

จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของน้ำทิ้งทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าน้ำทิ้งมีค่า BOD = 4210 มิลลิกรัมต่อลิตร , ค่า suspended solid = 1920 (มิลลิกรัมต่อลิตร), เปอร์เซนต์คาร์โบไฮเดรต = 0.21 เปอร์เซนต์, เปอร์เซนต์โปรตีน = 0.77 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีแหล่งธาตุไนโตรเจน และ คาร์โบไฮเดรตอยู่บ้าง ดังนั้นจึงทดลองเลี้ยงเชื้อ P. freudenreichii ใน complete medium, น้ำทิ้ง, น้ำทิ้งที่มีการเติมสารบางชนิดเพื่อช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น โดยเติมน้ำตาลกลูโคส, yeast extract ปริมาณเท่ากันใน complete medium ปรากฏว่าเมื่อเติมสารทีละอย่าง อัตราการเจริญและปริมาณเซลสูงสุดน้อยกว่าเมื่อเติมทั้งน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract และ น้อยกว่า complete medium ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งแสดงให้เห็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าแหล่งธาตุไนโตรเจน และ คาร์โบไฮเดรตในน้ำทิ้งไม่เพียงพอกับความต้องการของเชื้อ P. freudenreichii

3. ผลการเปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

ผลจากการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ P. freudenreichii โดยใช้น้ำทิ้ง ปรากฏว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม คือ 0.2 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.5

4. ผลการเปรียบเทียบปริมาณ yeast extract

ผลจากการศึกษาปริมาณ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ P. freudenreichii โดยใช้น้ำทิ้ง พบว่าปริมาณ yeast extract 2, 2.5, 3, 3.5, 4 เปอร์เซนต์ ทำให้การเจริญของเชื้อ P. freudenreichii มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณ yeast extract 2 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.6

5. ผลการเปรียบเทียบปริมาณโคบอลท์

ผลการเปรียบเทียบปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ P. freudenreichii โดยใช้น้ำทิ้ง พบว่าปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ 8 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญของเชื้อ P. freudenreichii นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.7

6. ผลการศึกษาอัตราการเจริญ (growth rate) ปริมาณเซลสูงสุด (maximum yield) และ การผลิตวิตามินบี 12 ของ P. freudenreichii ใน complete medium และ น้ำทิ้งเติมสารต่างๆ ณ สภาวะ stationary flask และ fermenter ที่มีระบบการกวน

ทดลองศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้อาหาร complete

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

medium และ น้ำทิ้งเติม กลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์, yeast extract 2 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารช่วยเพิ่มผลผลิต ปรากฏว่าใน complete medium ในสภาพ stationary ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.126 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 48 และ ในน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆ ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุด = 0.23 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 72

เมื่อทดลองศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ใน fermenter โดยใช้อาหาร complete medium และ น้ำทิ้งเติม กลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์, yeast extract 2 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ปรากฏว่าใน complete medium ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุด เท่ากับ 0.121 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 48 และได้ปริมาณวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งที่เติมสวรเท่ากับ 0.51 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 72 เนื่องจากในระหว่างการหมักเชื้อจะผลิต propionic acid และ acetic acid ในอัตราส่วน 2:1 จึงทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ และทำให้การผลิตวิตามินบี 12 ลดลง เพราะ fermenter มีระบบการกวนแต่ไม่มีระบบควบคุม pH

จากการวัดผลอัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์ โดยใช้ complete medium ดังแสดงโดยรูปที่ 4.8 จะเห็นว่าการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์เป็นแบบ growth association การเจริญของเชื้อจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 และปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องมาจากในอาหารมีการสะสมของสารบางชนิดเช่น propionic acid หรือ acetic acid จากจุลินทรีย์ไปยับยั้งการสร้างวิตามิน หรือการที่เซล autolysis ทำให้วิตามินบี 12 แปรรูปเป็นสารอื่น ซึ่งทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

จากการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 โดย P. freudenreichii เจริญในน้ำทิ้ง ดังแสดงในรูปที่ 4.8 จะเห็นว่าการเจริญของเชื้อจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 และปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 สูงสุดในชั่วโมงที่ 72 และลดลงอย่างรวดเร็ว

แม้ว่าจากการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะ batch fermenter จะได้ปริมาณวิตามินบี 12 จาก complete medium 0.12 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่ง

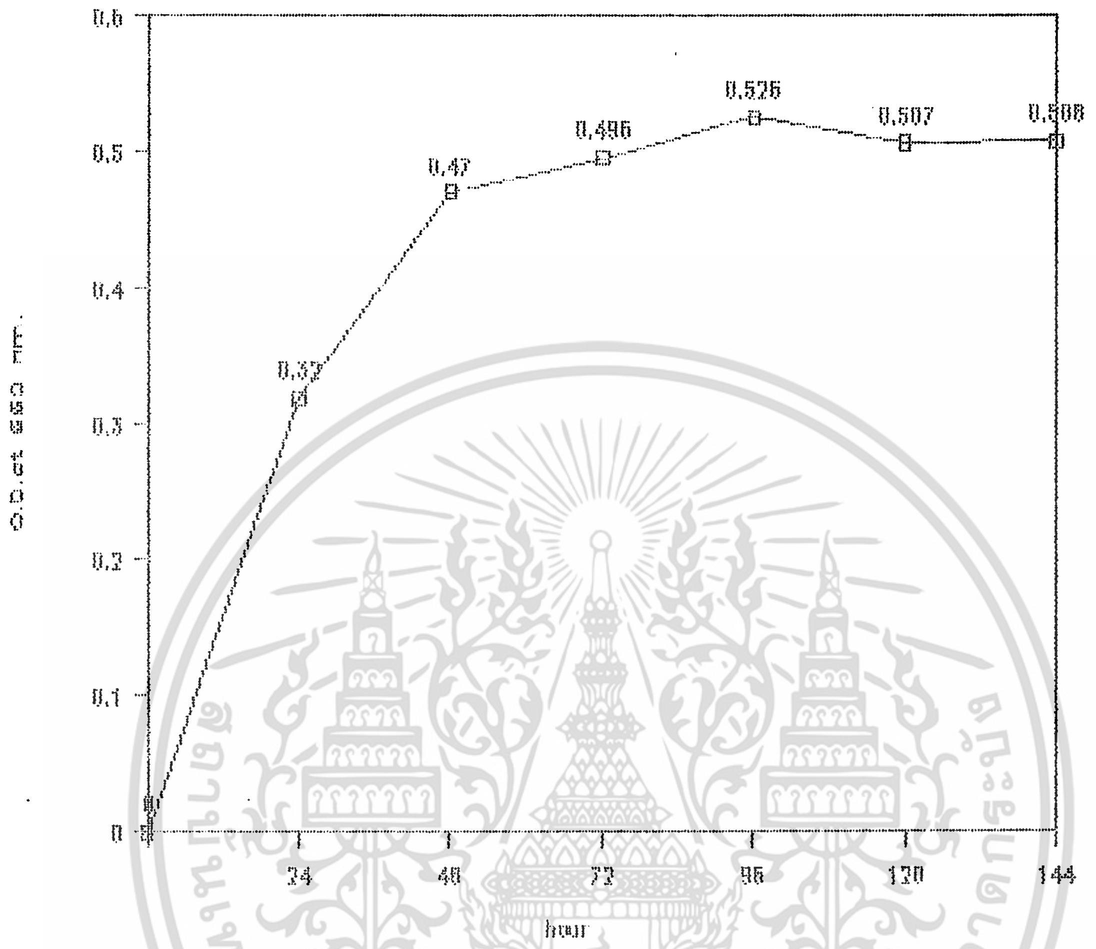
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากสภาวะ stationary flask ทั้งนี้เนื่องมาจากระบบ fermenter ที่ใช้ไม่มี baffle ทำให้มีการกวนเกิดปรากฏการณ์ vortex อาหารและเชื้อจุลินทรีย์ไม่ผสมกันอย่างทั่วถึง แต่ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆในสภาวะ batch fermenter มีค่ามากกว่าในสภาวะ stationary flask 60 เปอร์เซนต์ ดังนั้นการที่จะผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นมเป็นอุตสาหกรรมต้องปรับปรุงสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น มีการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตสูง และปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อเป็น continuous culture หรือ ทดลองศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ exponential-fed batch Toraya et al. (78) ได้ศึกษาโดยใช้อัตราการเติมแหล่งอาหารคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นให้สมดุลกับปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น พบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นถึงประมาณ 20 เท่า ของการเลี้ยงจุลินทรีย์ในฟลาสก์ ซึ่งไม่ได้เติมอาหารให้สมดุลกับเชื้อ

7. ผลการวิเคราะห์ Biochemical Oxygen Demand (BOD)

จากการวิเคราะห์ BOD ในน้ำทิ้ง น้ำทิ้งเติมสารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 และ น้ำเหลือจากการเลี้ยง *P. freudenreichii* เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า BOD ของน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นมมีค่า 4,210 มิลลิกรัมต่อลิตร และ น้ำทิ้งเติมสารมีค่า BOD เท่ากับ 37,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำเหลือมีค่า BOD เท่ากับ 1,075 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.16 จะเห็นได้ว่าในน้ำทิ้งมีค่า BOD สูง ทั้งนี้อาจเป็น เพราะ ในน้ำทิ้งประกอบด้วยธาตุอาหารต่างๆ มีปริมาณโปรตีน น้ำตาลในปริมาณที่เหมาะสม และจากการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำทิ้งพบว่าเมื่อเติมสารต่างๆลงไป จะทำให้เพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ได้สูงกว่าการเจริญในน้ำทิ้งที่ไม่ได้เติมสารนั้น จากการทดลองพบว่าสามารถลดค่า BOD ของน้ำทิ้งลงได้ 74.46 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม และลดค่า BOD ของน้ำทิ้งได้ถึง 97.09 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆแล้ว แต่ค่า BOD ของน้ำเหลือจากการเลี้ยงแบคทีเรียยังสูงมาก ดังนั้นจึงต้องอาศัยกระบวนการกำจัดน้ำเสียวิธีต่างๆร่วมด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ในการลดปัญหาน้ำเสียเป็นพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



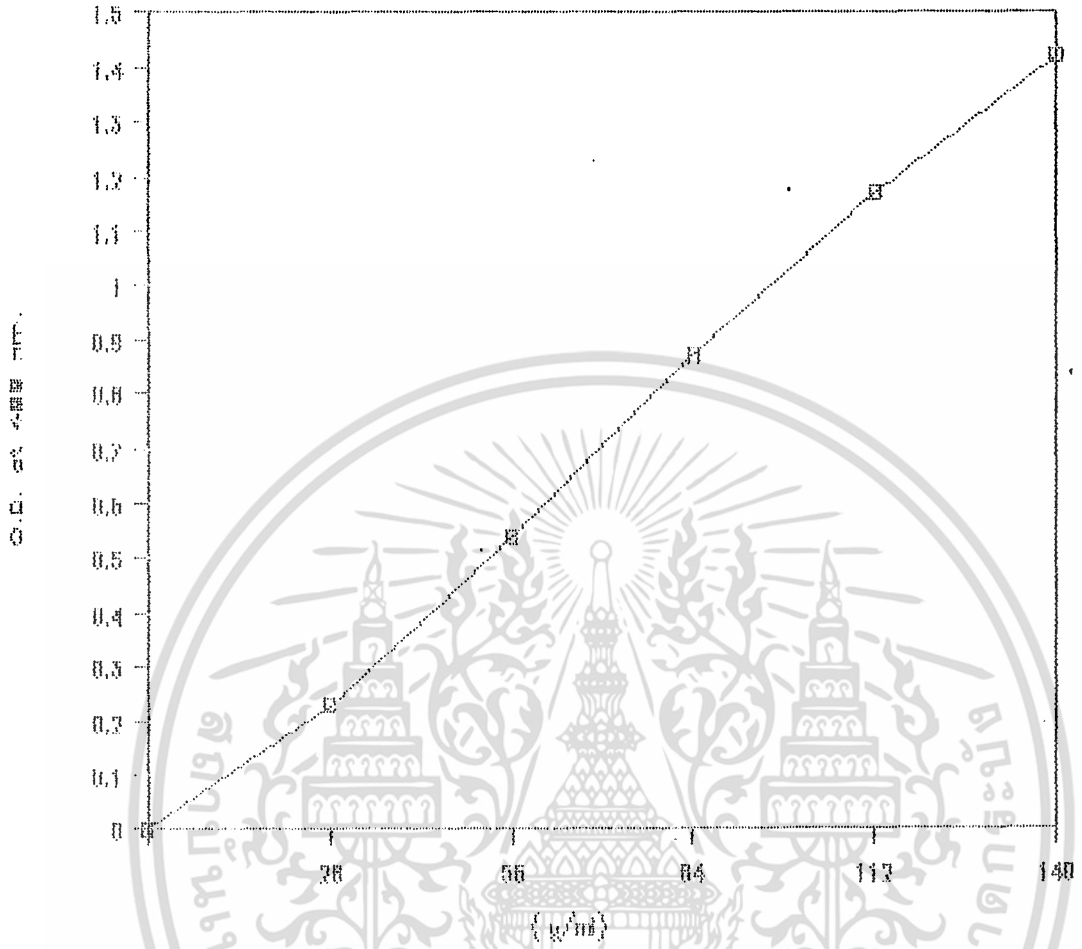
รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ P. freudenreichii ใน complete medium ณ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pH	6.98
BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)	4,210
suspended solid (มิลลิกรัม/ลิตร)	1,920
เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรท (%)	0.21
เปอร์เซ็นต์โปรตีน (%)	0.77

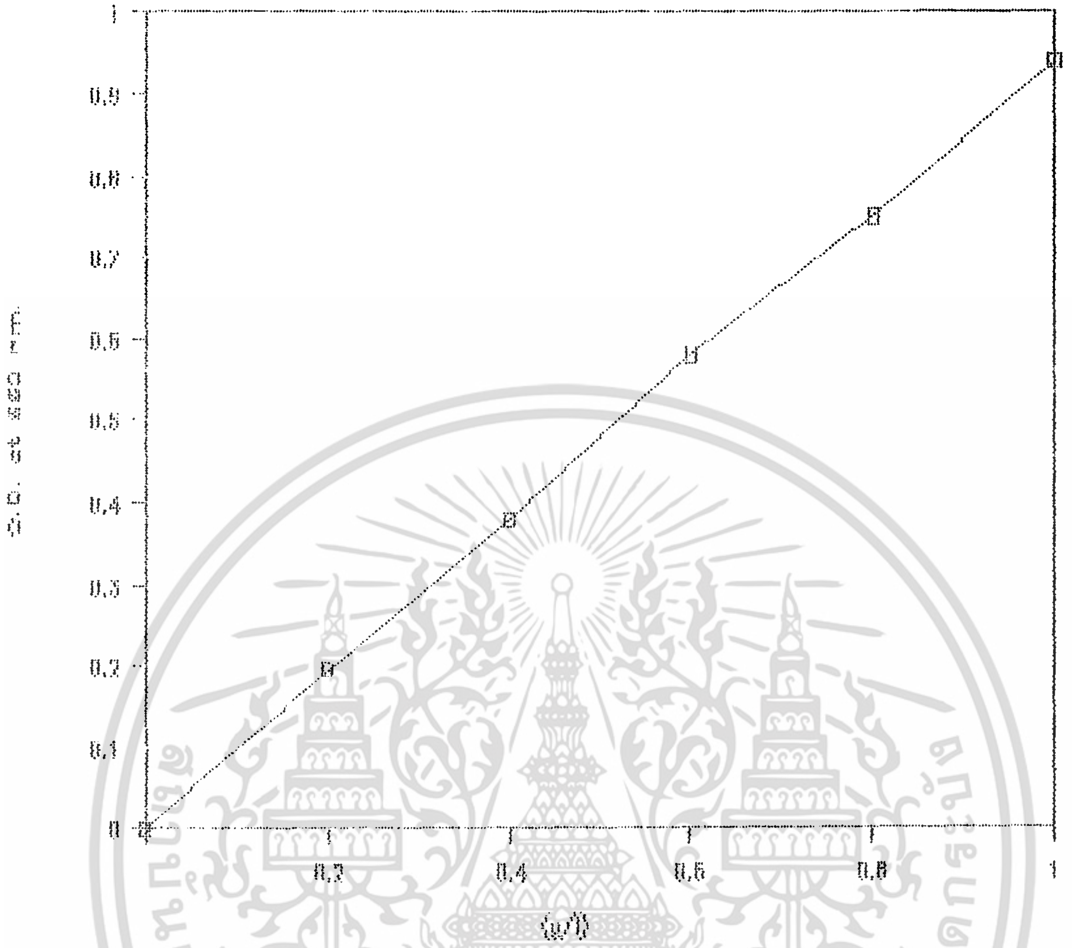
ตารางที่ 4.1 แสดงค่า pH
BOD
suspended solid
เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรท
และ เปอร์เซ็นต์โปรตีน
ของน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์ ของบริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



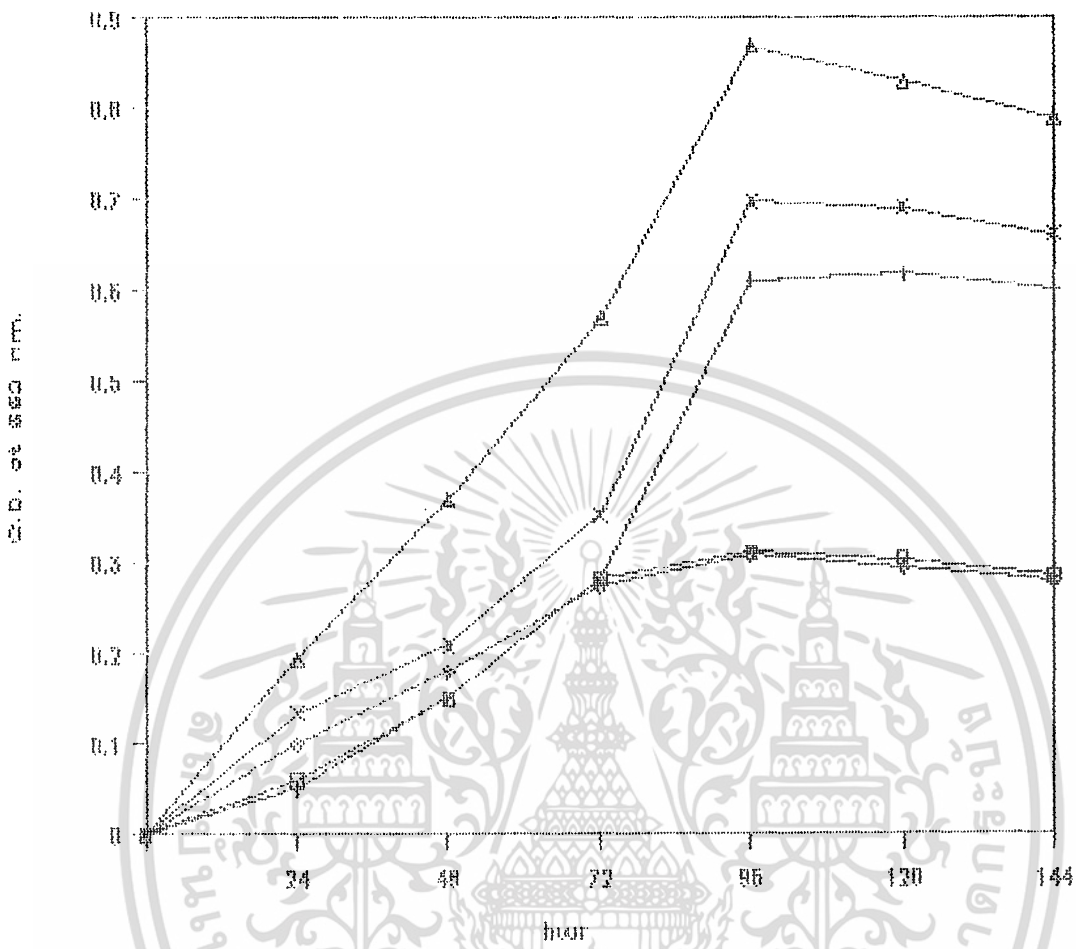
รูปที่ 4.2 แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่า O.D. 488 โดยวิธี phenolic method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงค่าน้ำหนักแห้งของเชื้อ (กรัมต่อลิตร) กับค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



□ น้ำทิ้ง

◊ น้ำทิ้งเติม glucose 1 %

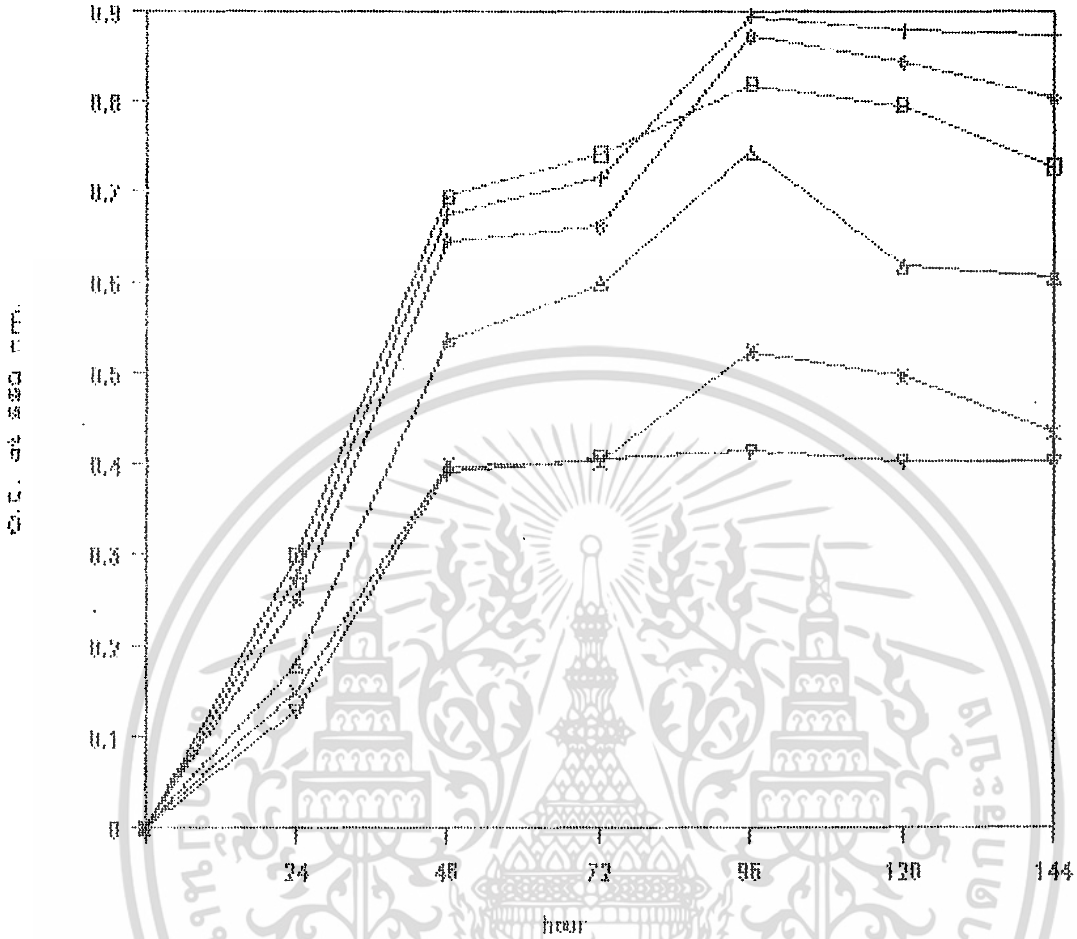
\+ น้ำทิ้งเติม yeast extract 0.5 %

Δ น้ำทิ้งเติม glucose 1% และ yeast extract 0.5%

x complete medium

รูปที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้ง,น้ำทิ้งเติมสาร และ ใน complete medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



□ น้ำทิ้งเติม glucose 0.1% และ yeast extract 0.5%

+ น้ำทิ้งเติม glucose 0.2% และ yeast extract 0.5%

θ น้ำทิ้งเติม glucose 0.3% และ yeast extract 0.5%

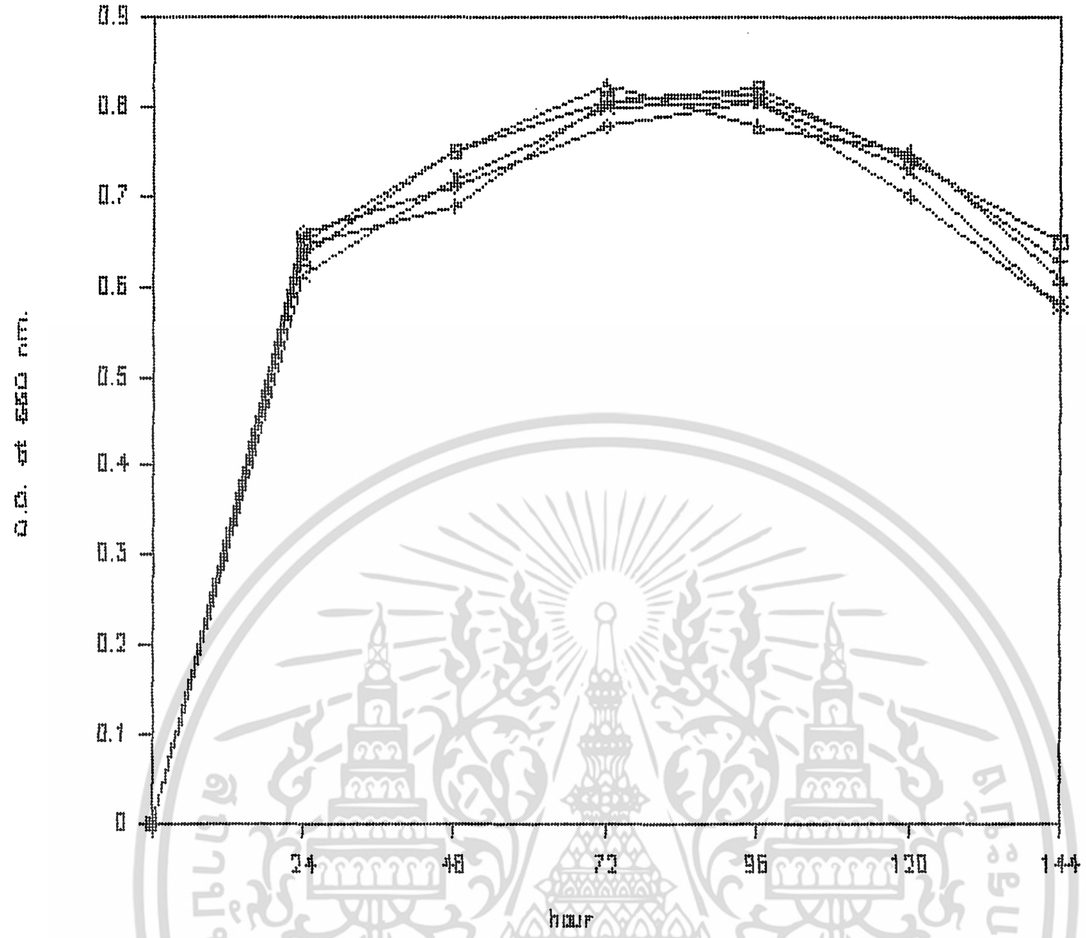
Δ น้ำทิ้งเติม glucose 0.5% และ yeast extract 0.5%

x น้ำทิ้งเติม glucose 0.7% และ yeast extract 0.5%

v น้ำทิ้งเติม glucose 0.8% และ yeast extract 0.5%

รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญของเชื้อเมื่อเติม glucose ในปริมาณต่างๆกัน และ yeast extract 0.5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



□ น้ำทิ้งเติม yeast extract 2% และ glucose 0.2%

\+ น้ำทิ้งเติม yeast extract 2.5% และ glucose 0.2%

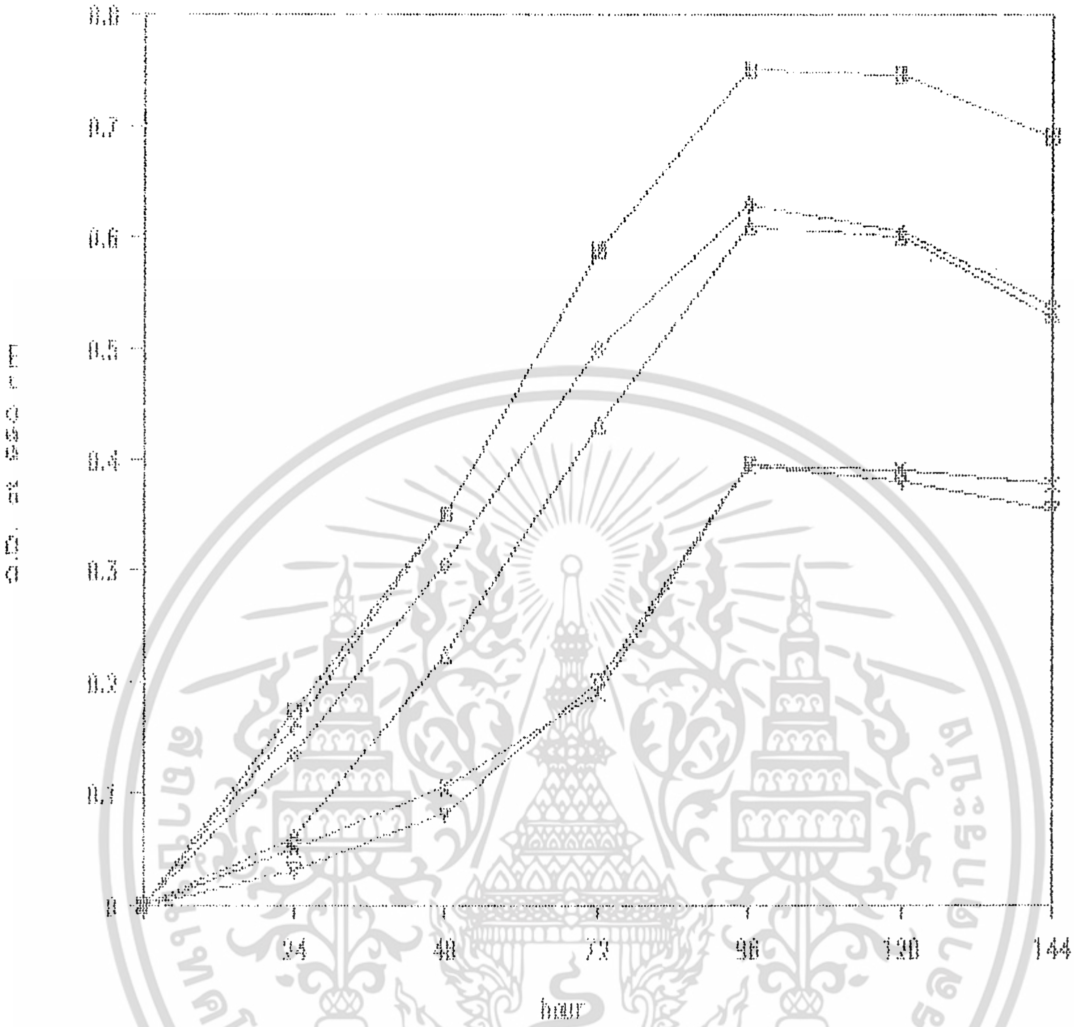
◇ น้ำทิ้งเติม yeast extract 3% และ glucose 0.2%

△ น้ำทิ้งเติม yeast extract 3.5% และ glucose 0.2%

x น้ำทิ้งเติม yeast extract 4% และ glucose 0.2%

รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งเมื่อเติม yeast extract ในปริมาณต่างๆกัน และเติม glucose 0.2 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



น้ำทิ้งเติม yeast extract 2% ,glucose 0.2% และ $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร

\+ น้ำทิ้งเติม yeast extract 2% ,glucose 0.2% และ $CoSO_4.7H_2O$ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร

น้ำทิ้งเติม yeast extract 2% ,glucose 0.2% และ $CoSO_4.7H_2O$ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร

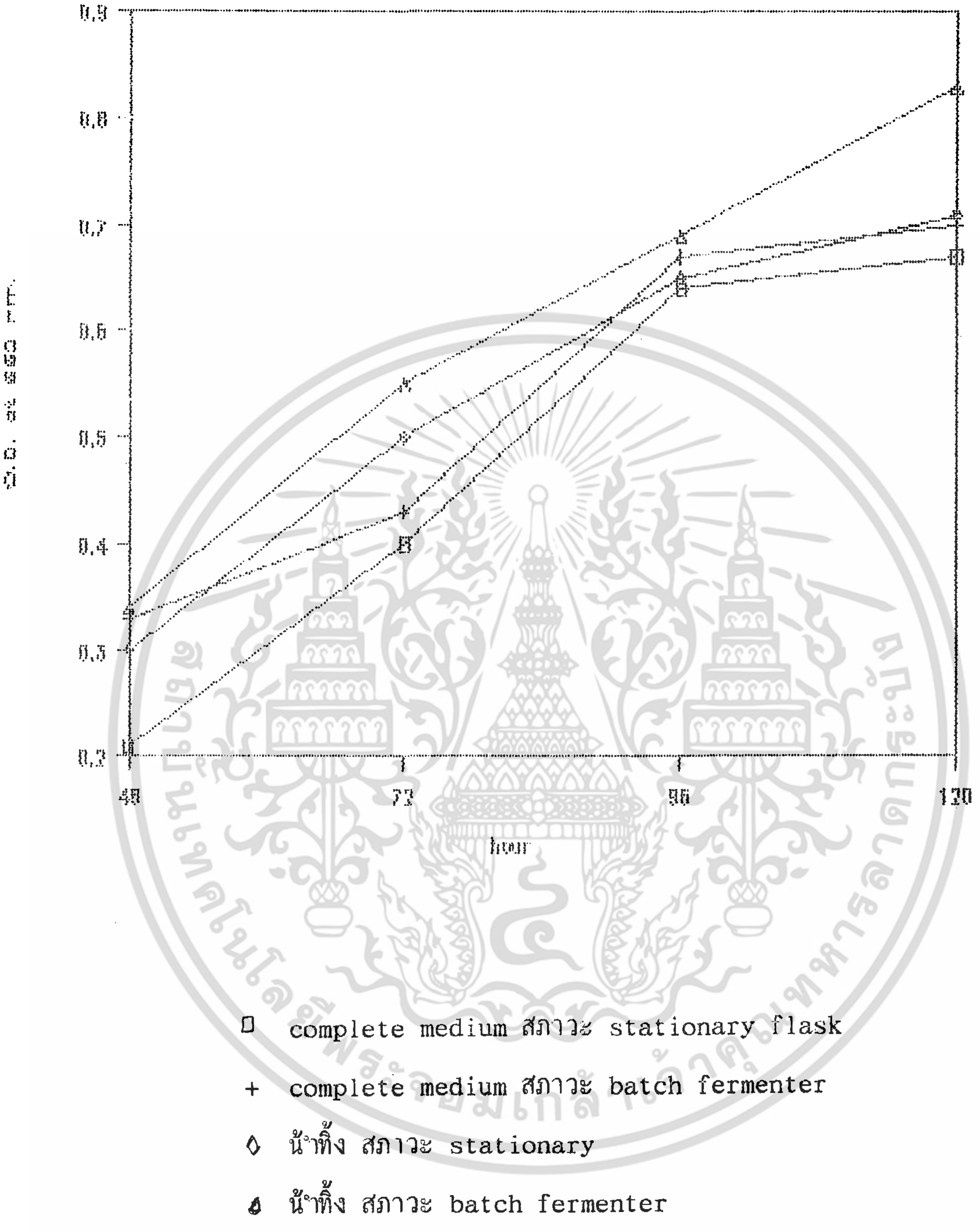
Δ น้ำทิ้งเติม yeast extract 2% ,glucose 0.2% และ $CoSO_4.7H_2O$ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

x น้ำทิ้งเติม yeast extract 2% ,glucose 0.2% และ $CoSO_4.7H_2O$ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร

∇ น้ำทิ้งเติม yeast extract 2% ,glucose 0.2% และ $CoSO_4.7H_2O$ 28 มิลลิกรัมต่อลิตร

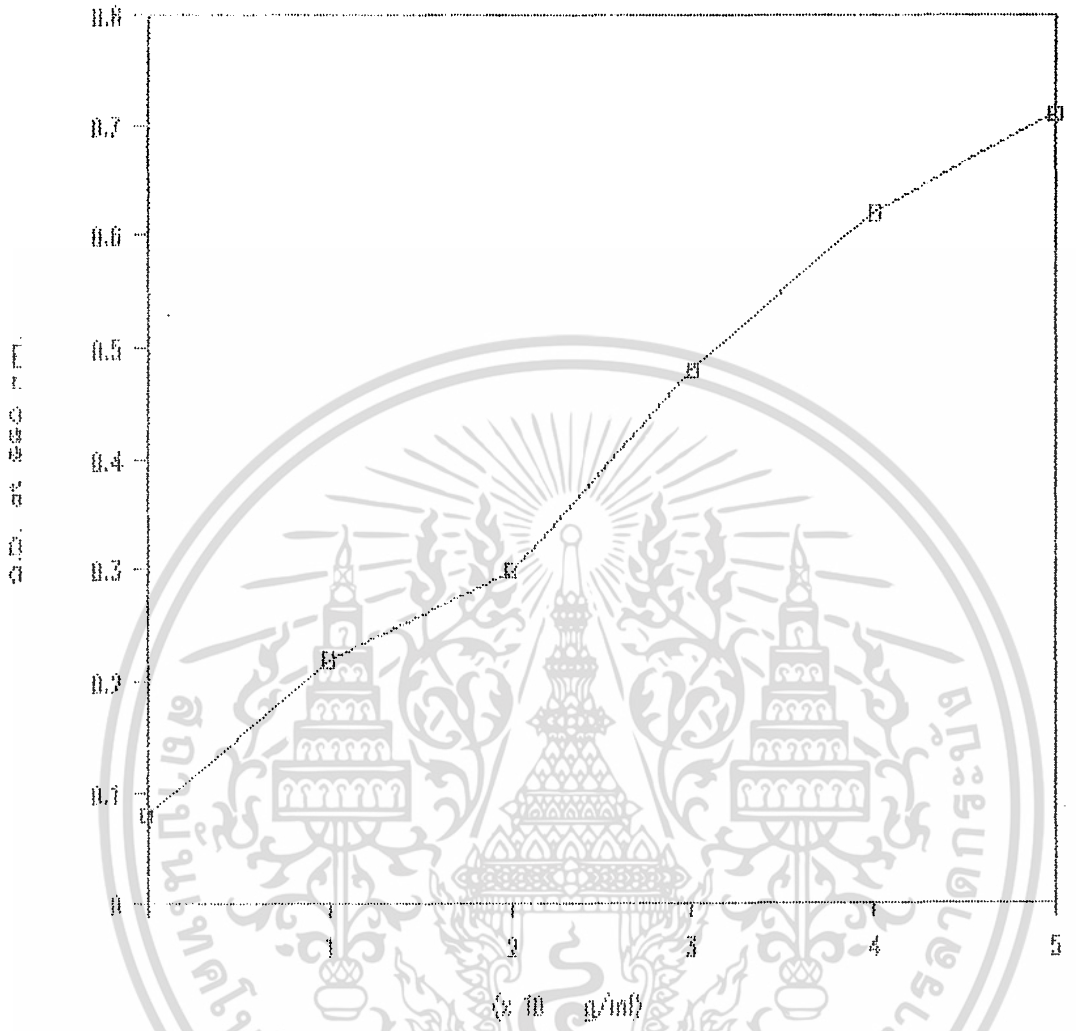
รูปที่ 4.7 แสดงการเจริญของ <u>P. freudenreichii</u> เมื่อเติม yeast extract 2%, glucose 0.2% และ $CoSO_4.7H_2O$ ในปริมาณต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



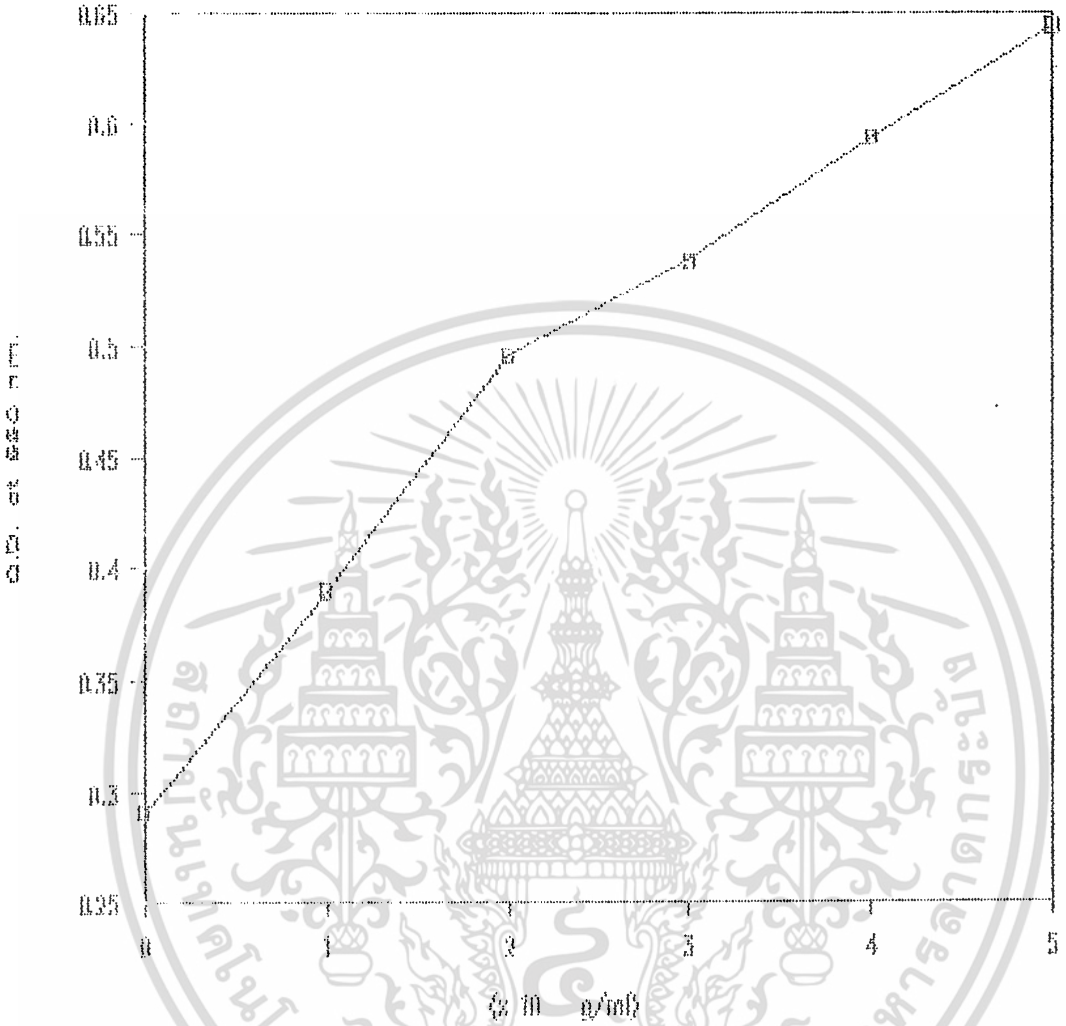
รูปที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ <u>P. freudenreichii</u> ที่ 660 นาโนเมตร ในระหว่างการหมัก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



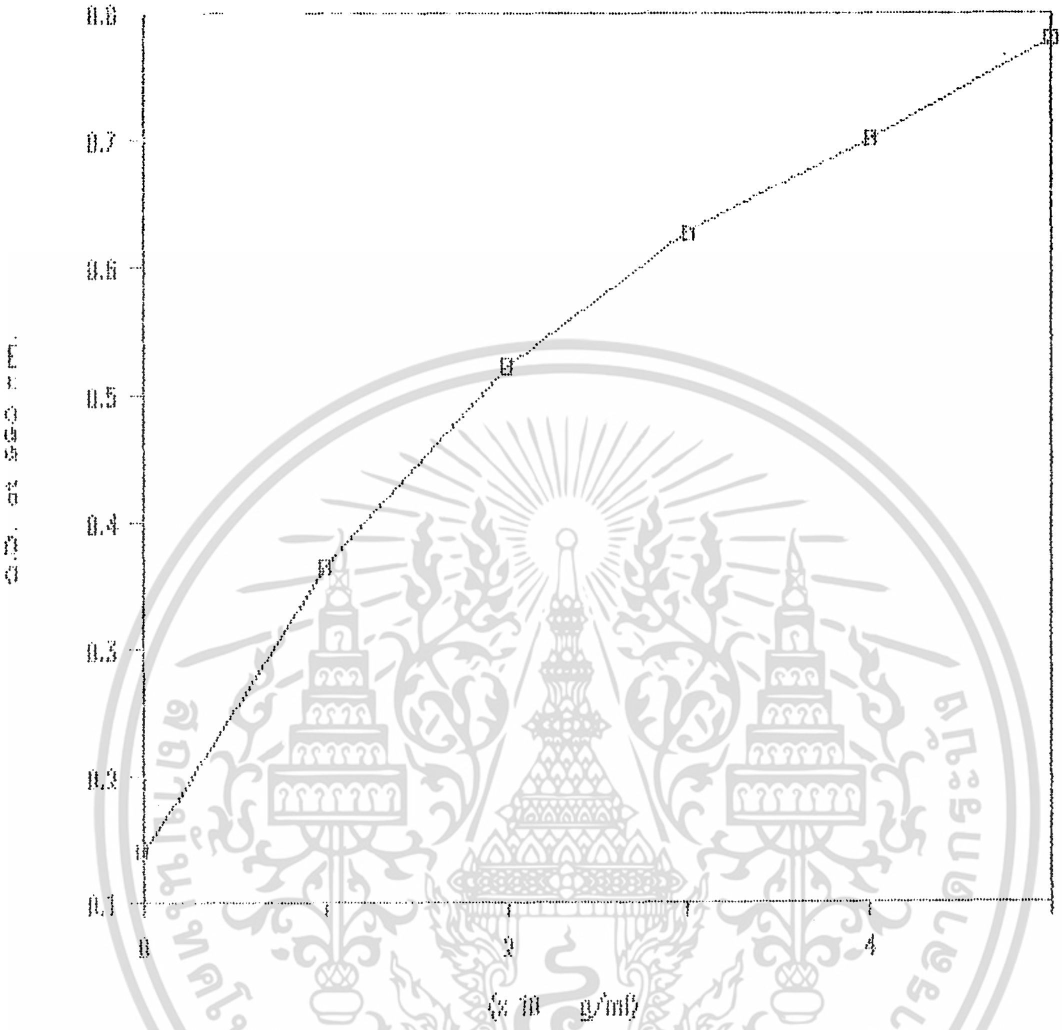
รูปที่ 4.9 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



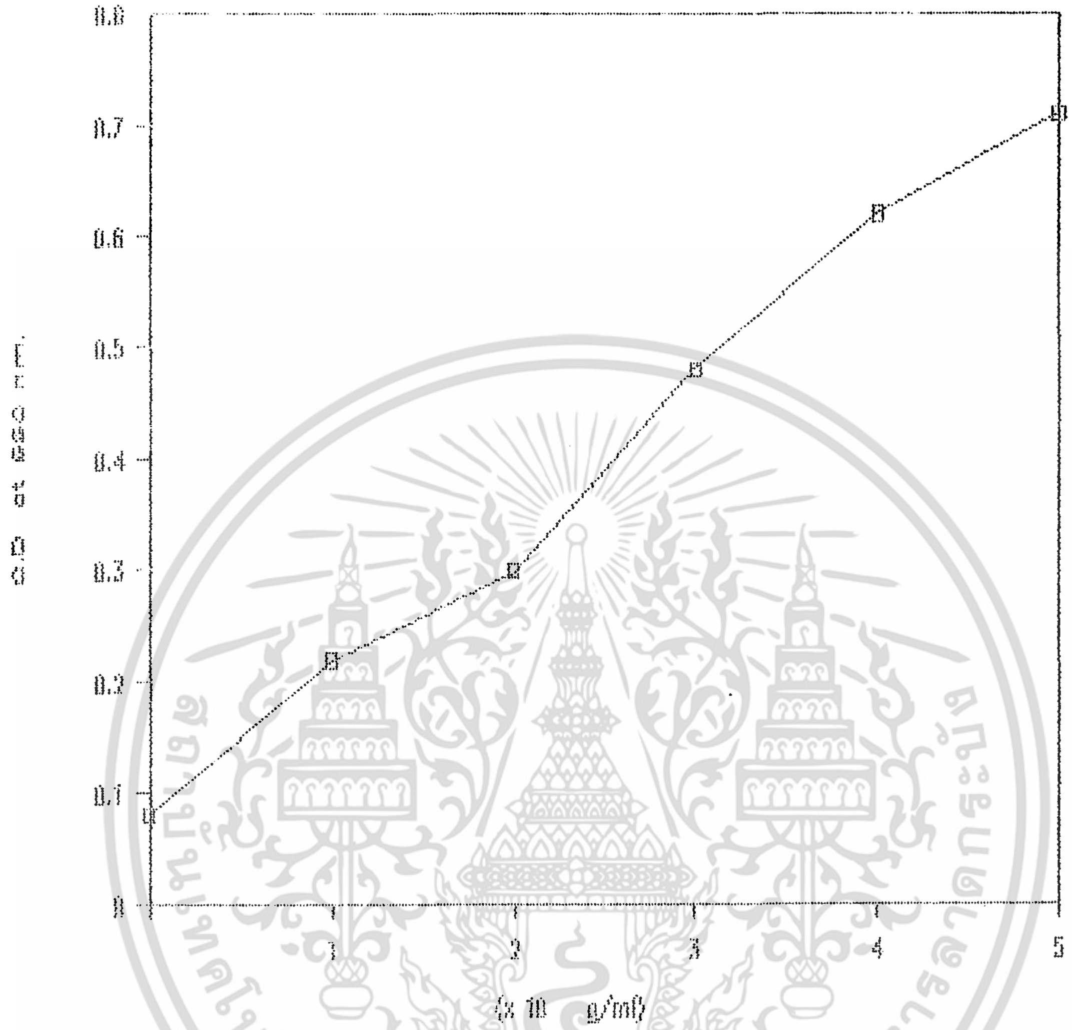
รูปที่ 4.10 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



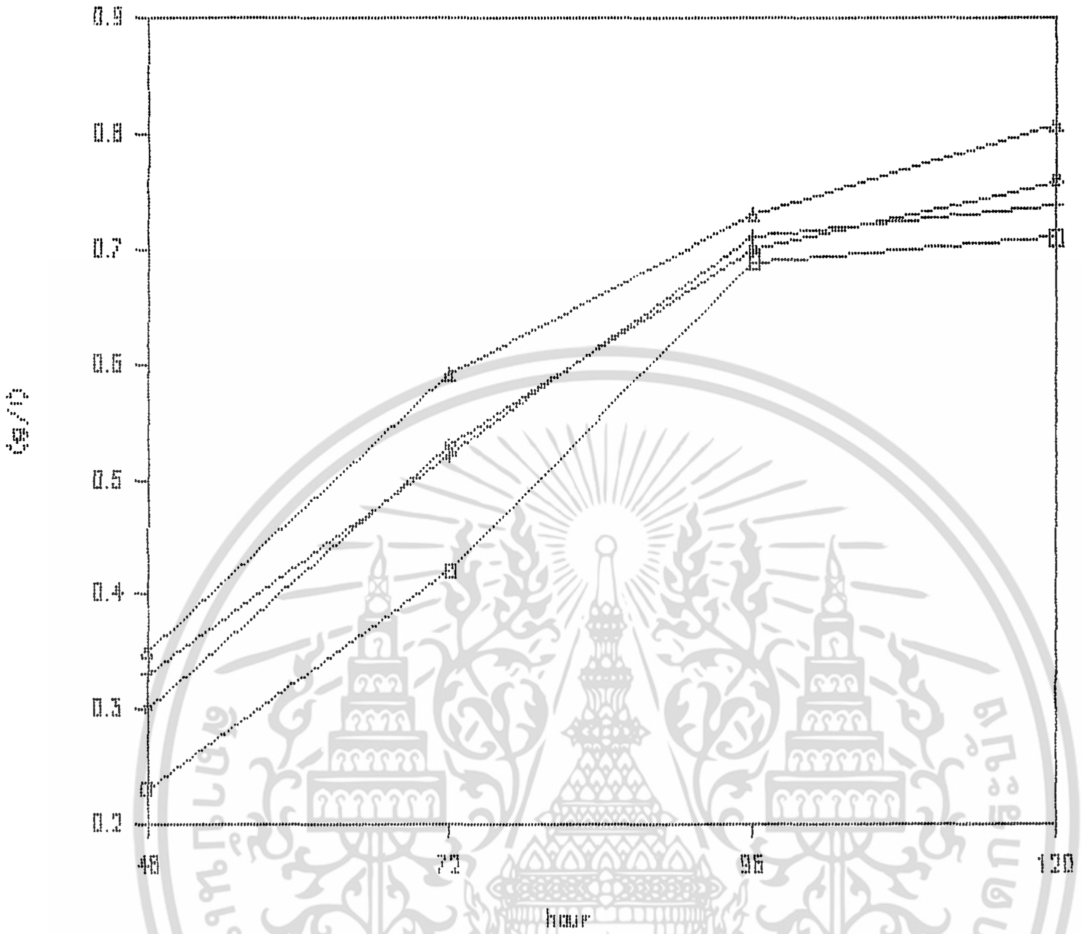
รูปที่ 4.11 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดง calibration curve of working standard ชั่วโมงที่ 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



□ complete medium สภาวะ stationary

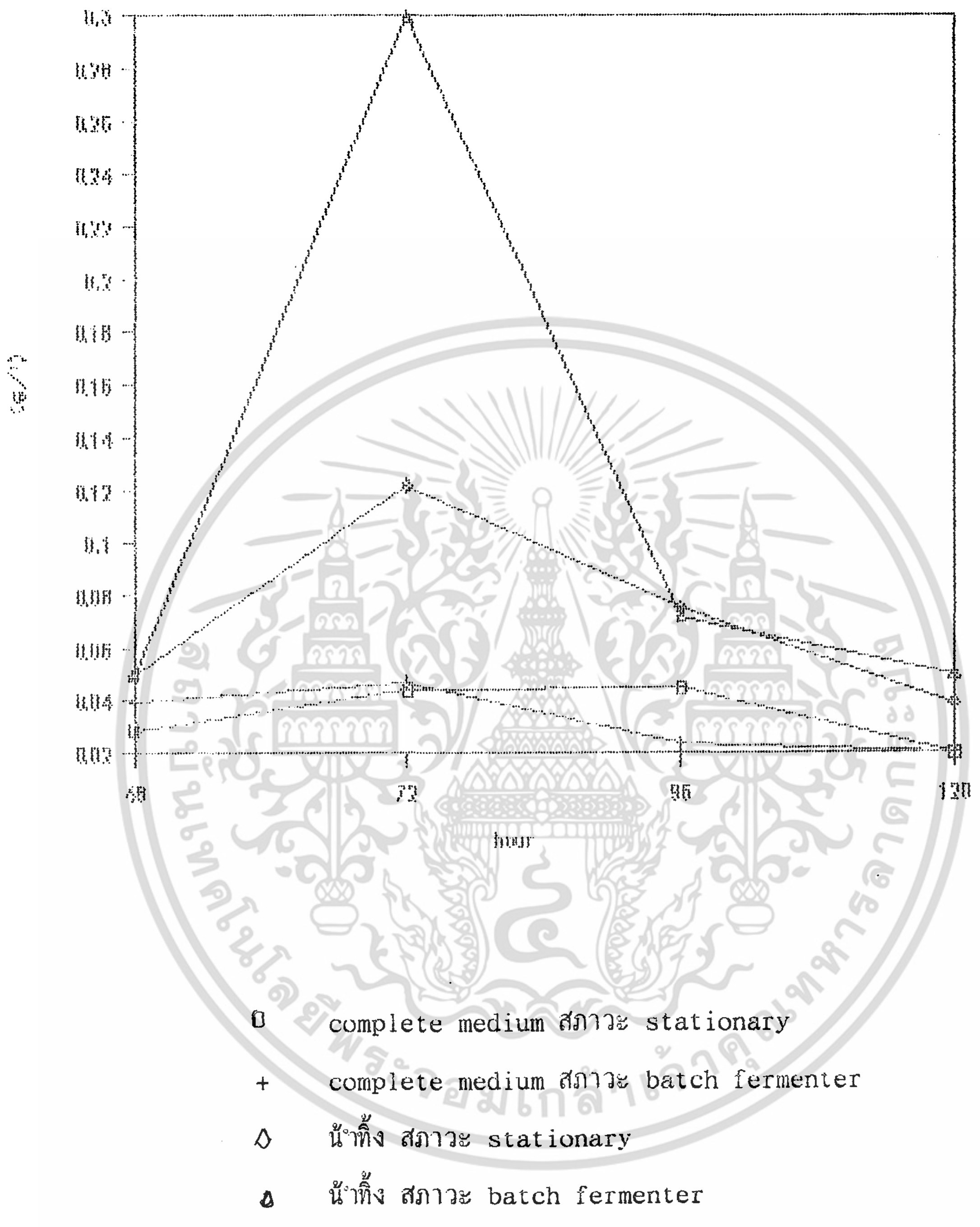
\+ complete medium สภาวะ batch fermenter

◊ น้ำทิ้ง สภาวะ stationary

Δ น้ำทิ้ง สภาวะ batch fermenter

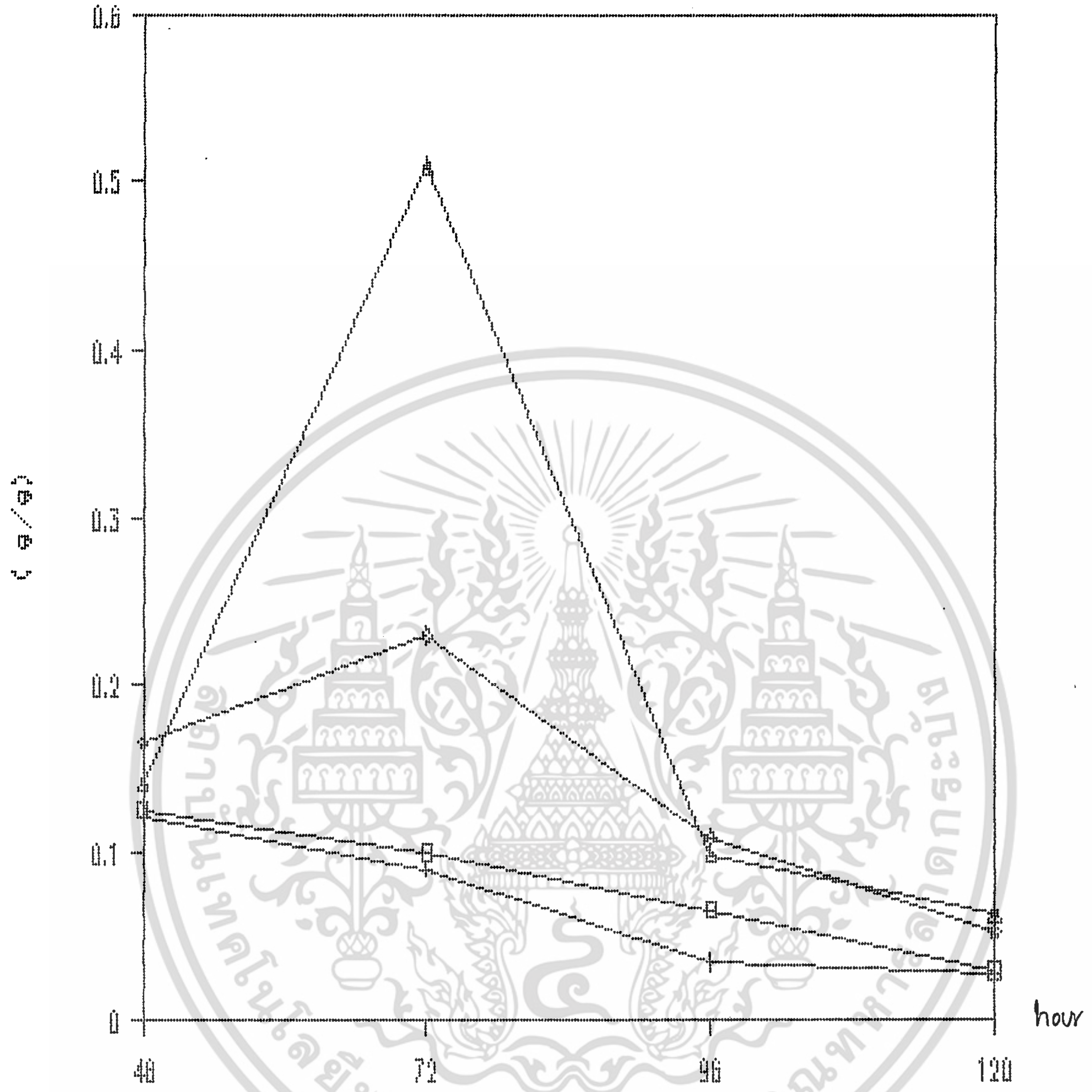
รูปที่ 4.13 แสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อระหว่างการหมักเพื่อผลิตวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร) ชั่วโมงที่ 48, 72, 96, 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



□ complete medium สภาวะ stationary

\+ complete medium สภาวะ batch fermenter

◇ น้ำทิ้ง สภาวะ stationary

△ น้ำทิ้ง สภาวะ batch fermenter

รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร	ค่า OD. ที่ 660 nm.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (μg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (μg/g)
C.M. stationary	0.21	0.23	0.029	0.126
C.M. mixing	0.33	0.33	0.04	0.121
น้ำทิ้ง stationary	0.3	0.301	0.05	0.166
น้ำทิ้ง mixing	0.34	0.35	0.05	0.143

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และ น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เติมกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ yeast extract 2 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และ batch fermenter ณ ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร	ค่า OD. ที่ 660 nm.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (μg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (μg/g)
C.M. stationary	0.4	0.42	0.044	0.1
C.M. mixing	0.43	0.52	0.047	0.09
น้ำทิ้ง stationary	0.5	0.53	0.122	0.23
น้ำทิ้ง mixing	0.55	0.59	0.3	0.51

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และ น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เติมกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ yeast extract 2 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และ batch fermenter ณ ชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร	ค่า OD. ที่ 660 nm.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (µg/g)
C.M. stationary	0.64	0.69	0.045	0.065
C.M. mixing	0.67	0.71	0.024	0.034
น้ำทิ้ง stationary	0.65	0.7	0.075	0.11
น้ำทิ้ง mixing	0.69	0.73	0.072	0.099

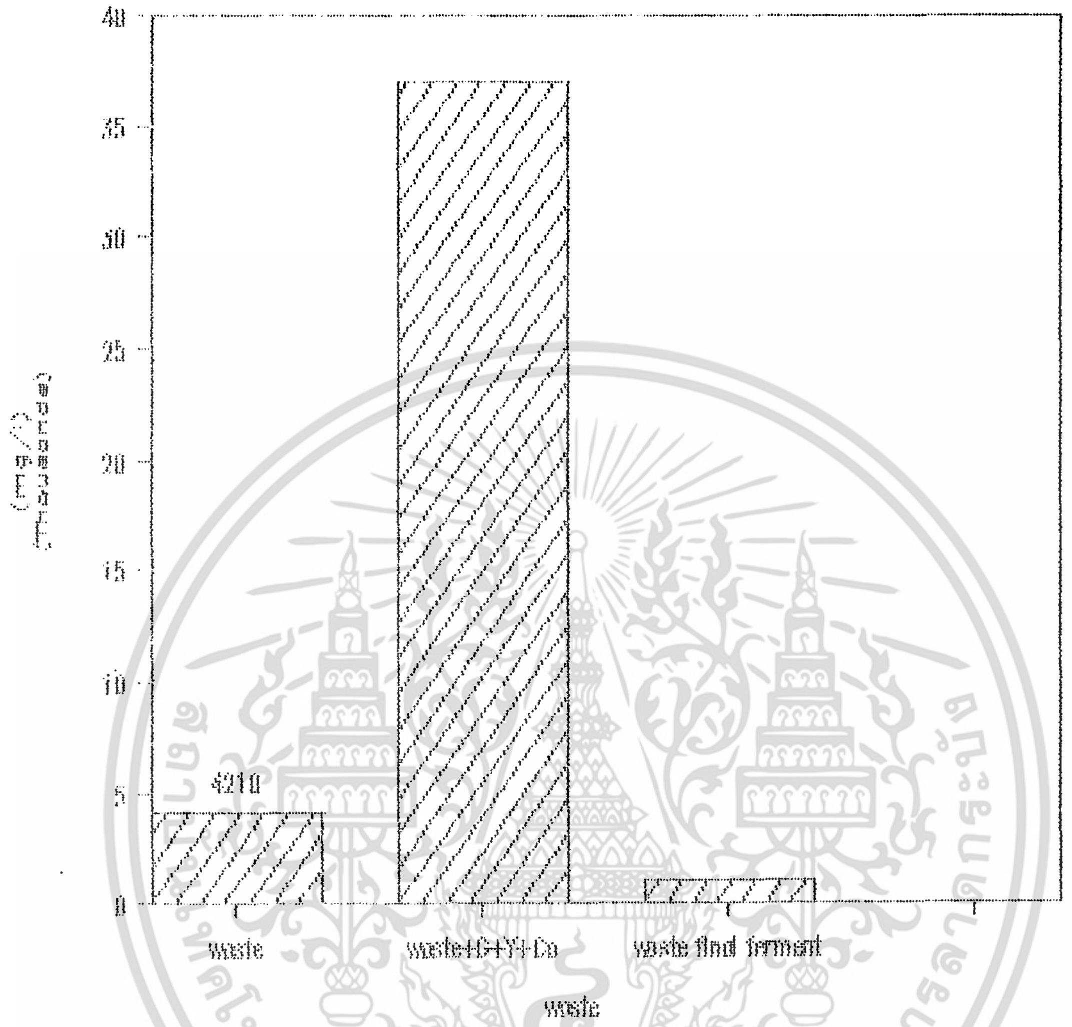
ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และ น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เติมกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ yeast extract 2 เปอร์เซนต์, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และ batch fermenter ณ ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร	ค่า OD. ที่ 660 nm.	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (μg/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (μg/g)
C.M. stationary	0.67	0.71	0.02	0.028
C.M. mixing	0.7	0.74	0.02	0.027
น้ำทิ้ง stationary	0.71	0.76	0.039	0.051
น้ำทิ้ง mixing	0.83	0.81	0.05	0.062

ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ complete medium และ น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เติมกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ yeast extract 2 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และ batch fermenter ณ ชั่วโมงที่ 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



waste = น้ำทิ้ง

waste+g+y+Co+met+ri = น้ำทิ้งเติมสาร

waste final ferment = น้ำทิ้งหลังจากการหมักชั่วโมงที่ 120

รูปที่ 4.**20** แสดงค่าปริมาณ BOD (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของน้ำทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เปรียบเทียบกับ complete medium

สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium freudenreichii ใน complete medium พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ดีที่สุด คือ pH 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (initial O.D. = 0.5) = 0.53 กรัมต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร จุลินทรีย์เจริญดีในสภาพ stationary flask เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมเลี้ยงเชื้อ P. freudenreichii ในอาหาร complete medium ได้วิตามินบี 12 เป็น 0.126 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 48 และเมื่อเลี้ยงเชื้อ P. freudenreichii ในอาหาร complete medium โดยมีการกวน จะได้วิตามินบี 12 ปริมาณ 0.121 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้งในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งพบว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ ณ สภาวะ stationary flask เท่ากับใน complete medium ที่มีการกวน เพราะการกวนอาหารจะทำให้เกิด vortex ดังนั้นอาจทำให้จุลินทรีย์และอาหารไม่ได้ผสมกันอย่างทั่วถึง เพียงแต่หมุนตามกันไป อีกทั้งในฟลาสก์นั้นไม่มีระบบควบคุมระดับ pH ให้ได้ประมาณ 7.0 เนื่องจากเชื้อจะผลิต propionic acid และ acetic acid ในอัตรา 2:1 ซึ่งทำให้อาหารในฟลาสก์มีสภาพเป็นกรด จึงทำให้การผลิตวิตามินบี 12 ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในน้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์นม คือ กลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ ปริมาณธาตุไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ yeast extract 2 เปอร์เซนต์ ปริมาณโคบอลท์ที่เหมาะสม คือ $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมวิตามินเพื่อช่วยการผลิตวิตามินบี 12 คือ methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะได้วิตามินบี 12 0.23 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ณ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งน้อยกว่าในน้ำทิ้งจากกการผลิตภัณฑ์นมที่เติมสารดังกล่าวที่มีการรบกวนได้ปริมาณวิตามินบี 12 0.51 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ณ ชั่วโมงที่ 72

จากการวิเคราะห์ค่า BOD. ของน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม และน้ำทิ้งเติมธาตุคาร์บอน ไนโตรเจนและวิตามินด้วยปริมาณที่เหมาะสม ค่า BOD.ก่อนการเลี้ยงเชื้อได้ 4,210 และ 37,000 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนน้ำเหลือจากน้ำทิ้งที่เลี้ยงเชื้อ P. freudenreichii ชั่วโมงที่ 120 มีค่า BOD.เท่ากับ 1,075.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าสามารถลดค่า BOD.ได้ 74.46 เปอร์เซนต์ และลดค่า BOD. เมื่อเทียบจากน้ำทิ้งเติมธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน โคบอลท์ และวิตามิน ในปริมาณที่เหมาะสม ได้ 97.09 เปอร์เซนต์ แต่ค่า BOD. ของน้ำที่เหลือจากการหมักยังมีค่าสูง ดังนั้นจึงควรใช้การผลิตวิตามินบี 12 ร่วมกับกรรมวิธีการกำจัดน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (stock culture media)

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenriechii ที่ใช้คือ MRS medium มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tri-ammonium citrate	2	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$Mnso_4$	0.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อเตรียมขึ้นตามสูตรนี้ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้ออัดความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : ถ้าจะทำเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus leichmannii ที่ใช้คือ tomato juice yeast- extract milk agar มีส่วนประกอบดังนี้

Skimmed milk	100.0	กรัม
Tomato juice (pH 7)	100.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

แต่เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรนี้มี skimmed milk เมื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดปฏิกิริยา caramelization ดังนั้นจึงใช้ tomato-juice agar แทน อาหารสูตร tomato-juice agar มีส่วนประกอบดังนี้

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

ปรับ pH ให้ได้ 7.2

หมายเหตุ : filtrate tomato juice เตรียมได้ดังนี้

ชั่งมะเขือเทศ 200.00 กรัม บดให้ละเอียด ต้มน้ำปริมาตร 1 ลิตร ประมาณ 15 นาที กรองเอากากมะเขือเทศออก เหลือแต่น้ำใส เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

2. <u>อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตวิตามินบี12 คือ complete medium มีส่วนประกอบดังนี้</u>

Acid hydrolysis of casein	1.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	1.5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaH_2PO_4	1.6	กรัม
K_3PO_4	1.6	กรัม
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4$	10.0	มิลลิกรัม
$CoSO_4$	12.0	มิลลิกรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Pancreatic acid	4.0	มิลลิกรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

ปรับ pH 6.6 ด้วย HCl 15 เปอร์เซนต์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ Carbohydrate โดยใช้ phenolic method

1.1 conc. H_2SO_4

1.2 สารละลายฟีนอล 5 %

ละลายฟีนอล 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ Crude proteinโดยวิธี Semi-micro Kjeldahl method

2.1 สารละลาย H_2SO_4 0.1 N.

ปิเปตกรด 2.78 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask

2.2 สารละลาย Na_2CO_3

ชั่ง Na_2CO_3 6.7 กรัม ใส่ขวดนำไปอบที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงทิ้งให้เย็นใน desicator ชั่ง Na_2CO_3 ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.2 กรัม ใส่ใน Erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร หยด methyl orange 2-3 หยด นำไปไตเตรทกับสารละลาย H_2SO_4 เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ H_2SO_4 (ในข้อ 2.1)

2.3 สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 40 เปอร์เซนต์

ชั่ง NaOH 40 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

2.4 สารละลายกรด H_2BO_4 ความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์

ชั่ง H_2BO_3 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5 screened methyl red indicator

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่ง methyl red 0.2 กรัม ใน ethanol 95 เปอร์เซนต์ 100 มิลลิลิตร เป็น solution A และ ละลาย brom cresol green 0.2 กรัม ใน ethanol 95 เปอร์เซนต์ 100 มิลลิลิตร เป็น solution B ผสม solution A 1 ส่วน กับ solution B 2 ส่วน เข้าด้วยกัน

3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ BOD ตามวิธีของ American Public Health Association

3.1 สารละลาย H_2SO_4 1 N.

เตรียมโดยใช้กรด H_2SO_4 เข้มข้น (ความถ่วงจำเพาะ 1.8) ปริมาตร 27.8 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางโดยเติมลงในน้ำกลั่น จนปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2 สารละลาย NaOH 1 N.

เตรียมโดยชั่ง NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

3.3 สารละลาย phosphate buffer

เตรียมโดยละลาย

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 8.5 กรัม

Dipotassium hydrogen phosphate (K_2PO_4) 21.75 กรัม

Disodium hydrogen phosphate (Na_2KPO_4) 33.4 กรัม

Ammonium chloride (NH_4Cl) 1.7 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.4 สารละลาย magnesium sulfate

เตรียมโดยละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ จำนวน 11.25 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

3.5 สารละลาย calcium chloride

เตรียมโดยละลาย anhydrous $CaCl_2$ จำนวน 13.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

3.6 สารละลาย ferric chloride

เตรียมโดยละลาย $FeCl_3.6H_2O$ 0.125 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.7 สารละลาย manganese sulfate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมโดยละลาย $MnSO_4.4H_2O$ จำนวน 480 กรัม

หรือ $MnSO_4.2H_2O$ จำนวน 400 กรัม

หรือ $MnSO_4.H_2O$ จำนวน 364 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น กรองแล้วเติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

3.8 สารละลาย Alkali- Iodide- Azide (A-I-A)

3.8.1 ละลาย KOH 700 กรัม หรือ NaOH 500 กรัม และ KI 150 กรัม หรือ NaI 175 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.8.2 ละลาย NaN_3 10 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.1 ทิ้งไว้ค้างคืนจึงนำมาใช้

3.9 สารละลาย Sodium thiosulfate 0.025 N.

เตรียมโดยชั่ง $Na_2S_2O_3$ จำนวน 6.205 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆซึ่งทำให้เย็น จำนวน 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายใส่ขวดสีชาที่สะอาด ถ้าต้องการจะเก็บไว้นานโดยกำลังของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง ให้เติม NaOH ลงไป 0.4 กรัม

การทำให้ Sodium thiosulfate ได้มาตราฐานทำตามขั้นตอนดังนี้

3.9.1 ละลาย KI 2 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.9.2 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นจำนวน 10 มิลลิลิตร

3.9.3 เติม $K_2Cr_2O_7$ 0.025 N. ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.10 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3.9.4 เก็บไว้ในที่มืดนาน 5 นาที

3.9.5 ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรทั้งหมดเป็น 400 มิลลิลิตร

3.9.6 นำมาไตเตรทกับ thiosulfate solution จนสารละลายมีสีเหลืองเรื่อๆ

3.9.7 เติมน้ำแป้ง (ในข้อ 3.11) 3-4 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ไตเตรทต่อจนสีเริ่มใสถึงจุดยุติ จดปริมาตรของ sodium thiosulfate solution ที่ใช้ไปนำมาคำนวณหาความเข้มข้น โดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

สารละลาย sodium thiosulfate 0.025 N. จำนวน 20 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลาย potassium dicromate 0.025 N. จำนวน 20 มิลลิลิตร

3.10 สารละลาย Potasssium dicromate 0.025 N.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมโดยการชั่ง $K_2Cr_2O_7$ อบให้แห้งที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำเข้า desicator รอให้เย็นชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1.226 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask

3.11 สารละลายแป้ง

เตรียมโดยชั่งแป้งมัน 5-6 กรัม ละลายน้ำเล็กน้อย เทลงในน้ำกลั่นที่เดือด ปล่อยให้เดือดนาน 2-3 นาที แล้วรินเอาแต่น้ำใสไว้ใช้ ถ้าต้องการเก็บไว้นานๆเติม salicylic acid 1.25 กรัมต่อน้ำแป้ง 1 ลิตร

4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้ turbidimetric method of microbiological assay

4.1 0.1 M. Acetate buffer pH 4.6

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B

สารละลาย A : 0.1 M. CH_3COOH (Acetic acid 5.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.1 M. CH_3COONa (Sodium acetate 8.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

นำสารละลาย A 25.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย B 24.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.2 Buffer cyanide solution

เตรียมโดยชั่ง KCN 1 กรัม ละลายใน 0.1 M. acetate buffer pH 4.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย KCN 0.05 เปอร์เซนต์

ละลาย KCN 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

4.4 วิตามินบี 12 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผลึกวิตามินบี 12 (Cyanocobalamin)ของ Merck & Co;Inc 1 มิลลิกรัม ในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2 100 มิลลิลิตร ดูดใส่ ampule 1 มิลลิลิตร หลอมปลาย ampule ให้เชื่อมกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บเป็น stock solution ไว้ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 Micro-inoculum broth ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii มีส่วนประกอบดังนี้

Bacto-yeast extract	20	กรัม
Proteose peptone (Difco)	5	กรัม
Bacto-dextrose	10	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2	กรัม
Sobitan monocleate complex (span 80)	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.6 สารละลาย single strength assay medium

ชั่ง vitamin B_{12} assay medium (Difco) 4.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาทีแบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที สารละลายชนิดนี้ใช้สำหรับล้างเซลและทำ dilution ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii

4.7 สารละลาย double strength assay medium

ชั่ง vitamin B_{12} assay medium (Difco) 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที สารละลายนี้ใช้สำหรับใส่ใน sample และ vitamin B_{12} working stantard

สารละลาย vitamin B_{12} assay medium ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำการ assay

4.9 อาหารที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12

vitamin B_{12} assay medium ของ lactobacillus leichmannii

Casein hydrolysate	100	มิลลิลิตร
DL-Tryptophane	100	มิลลิลิตร
L-Cystine	100	มิลลิลิตร
Adenine sulfate solution	10	มิลลิลิตร
Guanine solution	10	มิลลิลิตร
Uracil solution	10	มิลลิลิตร
Xantine solution	10	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salt solution A	10	มิลลิลิตร
Salt solution B	10	มิลลิลิตร
Glucose	40	กรัม
Sodium acetate (anhydrous)	12	กรัม
DL-¿-Alanine	1	กรัม
Guanosine	200	มิลลิกรัม
Guanylic acid	200	มิลลิกรัม
$CaCl_2$	50	มิลลิกรัม
Vitamin mixture	10	มิลลิลิตร
p-Aminobenzoic acid	10	มิลลิลิตร
Biotin	10	มิลลิลิตร
Folic acid	10	มิลลิลิตร
Pyridoxal	10	มิลลิลิตร
Tween 80	2	มิลลิลิตร
Thiomalic acid	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ผล

1. การหาปริมาณ Crude protien โดยวิธีของ Semi-micro Kjiedahl method

ปิเปตน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด digest tube

↓

เติม K_2PO_4 5 กรัม และ $CuSO_4$ 0.1 กรัม

↓

เติม H_2SO_4 เข้มข้น 10 มิลลิลิตร

ใส่เศษกระเบื้อง ป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง

↓

ย่อยโปรตีนเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

จนได้สารละลายเขียว

↓

ทิ้งให้เย็น

↓

เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

↓

เติม NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์ 50 มิลลิลิตร

↓

ทำการกลั่นโดยเก็บแก๊ซแอมโมเนียในกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งหยด screened methyl red indicator

2-3 หยด เป็นเวลา 5 นาที

↓

ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N. H_2SO_4

หมายเหตุ : ทำการทดลองแบบเดิมอีกครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง (blank)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการทดลองเพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหาปริมาณ total Carbohydrate โดยใช้ phenolic method

เจือจางน้ำทิ้ง 1, 1:10, 1:100 1 มิลลิลิตร

↓

เติม phenol 5 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

↓

เติม conc. H_2SO_4 หลอดละ 5 มิลลิลิตร

↓

แช่ในน้ำแข็งขณะเติมสาร

↓

นำไปวัด O.D. ที่ 488 nm.

↓

นำค่าที่วัดได้ไปอ่านค่า total carbohrdrate
กับ กราฟมาตรฐานกลูโคส

การเขียนกราฟมาตรฐานกลูโคส

นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เตรียมได้ตามวิธีในภาคผนวก ข มาวัดปริมาณ carbohydrate โดยวิธี phenolic method นำผลไปเขียนกราฟโดยให้ค่า O.D. อยู่แกนตั้ง และค่าความเข้มข้นอยู่ในแกนนอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. <u>การวิเคราะห์หา Biochemical Oxygen Demand (BOD) ตามวิธี American Public Health Association</u>

3.1 ปรับ pH ของน้ำทิ้ง

น้ำทิ้ง

pH > 7 หรือ pH < 7

↓ ↓

เติม H_2SO_4 1 N | เติม NaOH 1 N

↓ ↓

จน pH = 7 | จน pH = 7

3.2 การเตรียม dilution water

น้ำกลั่น

↓

เติม phosphate buffer

magnesium sulfate

calcium chloride

ferric chloride

อย่างละ 1 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกลั่น 1 ลิตร

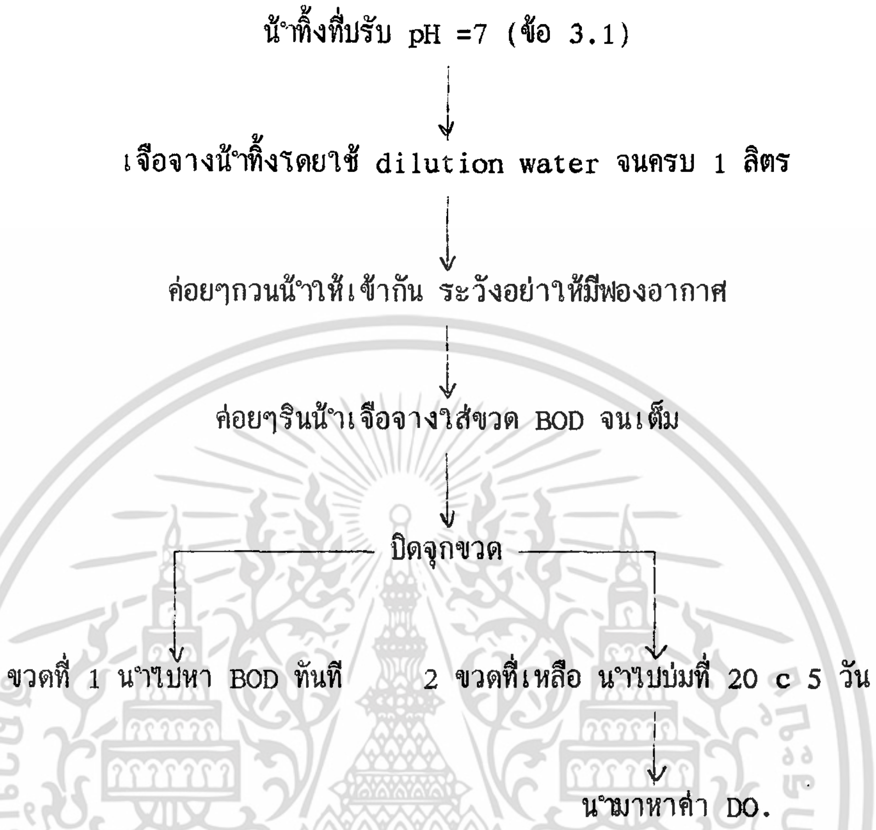
↓

พ่นอากาศโดยใช้ air pump

อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การเตรียม diluted sample



หมายเหตุ : การเตรียม diluted sample ควรเตรียม 3 dilution โดยเลือกเปอร์เซนต์ตัวอย่างโดยการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD. อยู่ในช่วงที่กำหนด และเลือกเปอร์เซนต์ตัวอย่างเปอร์เซนต์ที่สูงกว่า และต่ำกว่าที่อยู่ติดกันอีก 2 ขั้นของตาราง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรู้ค่า BOD. โดยประมาณก่อน ซึ่งอาจประมาณได้จากค่า COD.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การหา dissolved oxygen

ตัวอย่างน้ำในขวด BOD.

↓

เติม $MnSO_4$ 2 มิลลิลิตร (โดยที่ปลายปิเปตจมอยู่ในตัวอย่างน้ำ)

↓

เติม A-I-A 2 มิลลิลิตร (โดยที่ปลายปิเปตจมอยู่ในตัวอย่างน้ำ)

↓

ปิดจุก

↓

จับขวดคว่ำหงายสลับกัน 15 ครั้ง

↓

ตั้งทิ้งไว้จนได้น้ำใสส่วนบนประมาณ 100 มิลลิลิตร

↓

เติม conc. H_2SO_4 2 มิลลิลิตร

ให้กรดไหลไปตามคอขวด

↓

ปิดจุก

↓

เขย่าจนตะกอนละลายหมด

↓

ตวงสารละลายที่ได้ 203 มิลลิลิตร

↓

ไตเตรทด้วยสารละลาย $Na_2S_2O_3$ 0.025 N.

จนได้สีเหลืองอ่อนๆ

↓

เติมน้ำแป้ง 3-4 หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

↓

ไตเตรทด้วยสารละลาย $Na_2S_2O_3$

จนสีน้ำเงินหายไป ได้สารละลายใส

↓

จดปริมาตรสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ทั้งหมด

4. <u>การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12</u> ใน fermentation liquor ใช้วิธี turbidimetric method of microbiological assay โดยเชื้อ <u>Lactobacillus leichmannii</u> เป็น test organism ใช้ assay medium ของ Difco ซึ่งไม่มีวิตามินบี 12 มีเฉพาะสารที่สำคัญต่อการเจริญของ <u>Lactobacillus leichmannii</u>

4.1 การเตรียม sample assay tube

ปิเปต sample ลงใน test tube 10 มิลลิลิตร

↓

เติม buffer cyanide solution 1 มิลลิลิตร

↓

เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer

↓

ฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ ตาอตารางนิ้ว 15 นาที

↓

centrifuge ด้วยความเร็ว 4000 rpm , 15 นาที

เก็บ supernatant ไว้

↓

เจือจาง supernatant ที่ได้ในอัตราส่วน

1,1:10, 1:100, 1:1000 โดยใช้น้ำกลั่น ทำ 2 ซ้ำ

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิเปต supernatant ที่เจือจางแล้วในแต่ละ dilution
ปริมาตร 0.2 , 0.5 และ 1 มิลลิลิตร ลงใน assay tube
ขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร

↓

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1.5 มิลลิลิตร

↓

เติม double strength assay medium
ทุกหลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร

↓

เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer
ใส่ใน rack หุ้มปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส
ด้วยความดันไอ15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที

↓

ทิ้งให้เย็น

↓

หยด suspension ของ Lactobacillus leichmannii
หลอดละหยดโดยใช้ micropipete

↓

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

↓

วัด O.D. ที่ 660 นาโนเมตร

หมายเหตุ :

- blank ให้เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แต่ไม่ต้องถ่ายเชื้อทำตามขั้นตอนเหมือนกับการเตรียม sample assay tube
- เนื่องจากวิตามินบี 12 ที่สร้างขึ้นอยู่ในเซล จึงต้องมีการ break cell

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้ออยู่ cobalamin จะถูกปล่อยออกจากเซล และเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนของ supernatant

4.2 การเตรียม working vitamin B_{12}

ดูด stock solution vitamin B_{12}

ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

เจือจางเป็น 100 เท่า โดยใช้น้ำกลั่น

↓

ดูดมา 0.1 มิลลิลิตร

↓

เจือจางด้วย KCN 0.05 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร

↓

ได้ working standard มีวิตามินบี 12

เข้มข้น 5 x 10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

ปิเปต working standard 0.0, 0.1, 0.2,

0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร

ใส่ใน assay tube ขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร ทำ 2 ซ้ำ

↓

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร ทุกหลอด

↓

เติม double strength assay medium 1.5 มิลลิลิตร

↓

เขย่าโดยใช้ cyclo-mixer

↓

ใส่ rack หุ้มปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส
ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

↓

ทิ้งให้เย็น

↓

หยด suspension ของ Lactobacillus leichmannii
หลอดละหยด โดยใช้ micropipette

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

วัด O.D. ที่ 660 นาโนเมตร

หมายเหตุ : ในการ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องทำการ calibration curye ทุกครั้ง เพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก calibration curve

4.3 การเตรียม suspension ของ Lactobacillus liechmannii

ถ่ายเชื้อ L. liechmannii จาก stock culture
ลงใน tomato-juice agar แบบ stab inoculum ทุกวันใน 1 สัปดาห์

↓

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง
ให้เชื้ออยู่ในสภาพ active

↓

เขี่ยเชื้อ L. liechmannii ที่ active แล้ว
ลงใน micro-inoculum broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

↓

วัด OD. ให้ได้ 0.5

↓

ใส่หลอดนำไป centrifuge

นำไปปั่น

↓ → ส่วนใส

ตะกอนเซล

↓

ล้างตะกอนเซลเพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 เหลืออยู่

โดยใช้ single strength assay medium (ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว)

↓

ผสมโดยใช้ cyclo-mixture

↓

นำไปปั่นเซล ทำเช่นเดิม 3-4 ครั้ง

↓

ถ่ายเซลลงใน single strength assay medium

10 มิลลิลิตร

↓

เจือจางเป็น 1:10 ด้วย single strength assay medium

ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

↓

inoculum cell suspension

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ผล

1. การคำนวณหาปริมาณ total Carbohydrate ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม

X = ความเข้มข้นกลูโคสจาก standard curve (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

น้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร มีปริมาณ glucose $X \times 10^{-6}$ กรัม

" 100 " " $X \times 10^{-4} \times$ dilution factor กรัม

$\therefore$ % total carbohydrate = $X \times 10^{-4} \times$ dilution factor

2. การคำนวณหาปริมาณ crude protein ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม

2.1 การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ H_2SO_4 0.1 N.

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$$\text{ความเข้มข้นของ } H_2SO_4 \times \text{ปริมาณของ } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้} = \frac{\text{น้ำหนักของ}Na_2CO_3}{\text{น้ำหนักสมมูล}Na_2CO_3} \times \frac{50}{1000} \times 50$$

2.2 การหาปริมาณโปรตีน

$$\% N = \frac{(a-b) \times c \times 1.4}{w}$$

$$\% \text{ protien} = \% N \times 6.25$$

a = ปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ในการไทเตรทสารตัวอย่าง

b = ปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ในการไทเตรท bank

c = ความเข้มข้น H_2SO_4 (N)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การคำนวณหาค่า BOD. ในน้ำทิ้ง

3.1 กรณีไม่เติมเชื้อ

$$\text{BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{D_1 - D_2}{P} \times 100$$

3.2 กรณีเติมเชื้อ

$$\text{BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(D_1 - D_2) - (B_1 - B_2)f}{P} \times 100$$

เมื่อ D_1 = D_0 ของตัวอย่างที่ทำการเจือจาง ของวันที่ 0

D_2 = D_0 ของตัวอย่างที่ทำการเจือจางและบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส

P = % mixture

B_1 = D_0 ของเชื้อคุม (seed control) ก่อนเพาะเลี้ยง

B_2 = D_0 ของเชื้อคุม (seed control) หลังจากบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

f = อัตราส่วนของน้ำเชื้อในตัวอย่างกับใน seed control

$= \frac{\text{\% น้ำเชื้อใน } D_1}{\text{\% น้ำเชื้อใน } B_1}$

การพิจารณาผลเพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า BOD

ผลที่น่าเชื่อถือ และจะใช้ในการคำนวณต่อไปนั้นจะต้องมีค่าปริมาณ DO เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลลิลิตรต่อลิตร และจะต้องมีการลดปริมาณ DO ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้ค่า BOD ที่คำนวณออกมาได้นั้นถูกต้องที่สุด

ในกรณีที่มีค่าปริมาณ DO อยู่ในเกณฑ์ดังกล่าวมากกว่า 1 ค่า ให้เลือกค่า DO ที่อยู่ในช่วง % mixture ที่สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. <u>การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12</u>

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

ปริมาณวิตามินบี12= <u>ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินบี12(10^{-5}ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)</u>xความเจือจาง

(10^{-5}ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)   ปริมาตรของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

ตารางแสดงผลการทดลอง

วันที่	ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร		
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0	0.000	0.000	0.000
	18	0.180	0.196	0.188
1	24	0.336	0.356	0.346
	42	0.470	0.468	0.469
2	48	0.495	0.469	0.482
	66	0.498	0.474	0.486
3	72	0.504	0.489	0.496
	90	0.504	0.532	0.518
4	96	0.533	0.520	0.526
	114	0.523	0.510	0.516
5	120	0.507	0.507	0.507
	150	0.508	0.521	0.510

<u>ตารางที่ จ.1</u> แสดงผลการเจริญของเชื้อ <u>Propionibacterium</u> <u>freudenreichii</u> ใน complete medium ณ. pH =7 ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างน้ำ	DO ณ วันที่ 0 (มิลลิกรัม/ลิตร)	DO ณ วันที่ 5 (มิลลิกรัม/ลิตร)			ผลต่างของ DO (มิลลิลิกรัม/ลิตร)
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
0.05	8.28	6.10	6.25	6.175	2.105
0.1	8.32	7.76	7.64	7.7·	0.62
0.2	8.3	7.28	6.97	7.125	1.175
0.5	8.16	6.74	6.54	6.64	1.52

ตารางที่ จ.2 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม ของบริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด

ค่า O.D. ที่ 660 nm.	น้ำหนักแห้ง ครั้งที่ 1 (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักแห้ง ครั้งที่ 2 (กรัม/ลิตร)	ค่าเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)
0.75	0.87	0.71	0.79
0.4	0.42	0.39	0.405
0.2	0.3	0.25	0.275
0.11	0.19	0.22	0.205

ตารางที่ จ.3 แสดงผลระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.)และน้ำหนักแห้งของเชื้อ (dry weight cell) เมื่อเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในสภาพ stationary flask pH =7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	28	56	84	112	140
ค่าO.D.ที่ 448 นาโนเมตร	0.23	0.54	0.87	1.17	1.42

ตารางที่ จ.4 แสดงผลการวิเคราะห์ total carbohydrate ของสารละลายมาตรฐานกลูโคส โดย phenolic method

เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างน้ำ	DO ณ วันที่ 0 (มิลลิกรัม/ลิตร)	DO ณ วันที่ 5 (มิลลิกรัม/ลิตร)			ผลต่างของ DO (มิลลิกรัม/ลิตร)
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
0.01	8.65	5.05	5.05	5.05	3.6
0.02	8.2	7.55	6.8	7.18	1.03
0.05	8.75	7.6	7.6	7.6	1.15

ตารางที่ จ.5 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เมื่อเติม glucose 0.2%, yeast extract 2%, $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ก่อนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างน้ำ	DO ณ วันที่ 0 (มิลลิกรัม/ลิตร)	DO ณ วันที่ 5 (มิลลิกรัม/ลิตร)			ผลต่างของ DO (มิลลิกรัม/ลิตร)
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
0.1	9.5	8.75	7.5	8.13	1.38
0.2	8.2	7.5	6.25	6.88	1.33
0.5	9.0	3.8	3.75	3.78	5.23

ตารางที่ จ.6 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ชั่วโมง 120

อาหาร	BOD(มิลลิกรัม/ลิตร)
น้ำทิ้ง	4,210
น้ำทิ้งเติมสาร	37,000
น้ำทิ้งหลังจากการหมัก	1,075.2

ตารางที่ จ.7 แสดงค่า 5-day BOD ของน้ำทิ้ง

หมายเหตุ : น้ำทิ้งเติมสาร คือ น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เมื่อเติม glucose 0.2%, yeast extract 2%, $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

น้ำทิ้งหลังการหมัก คือ น้ำทิ้งที่เติมสารแล้วหมัก ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่/ อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตร				
	น้ำทิ้ง	น้ำทิ้ง+ y 0.5%	น้ำทิ้ง+ glu 1%	น้ำทิ้ง+ y 0.5%+ glu 1%	complete medium
22	0.11	0.09	0.09	0.19	0.13
66	0.218	0.140	0.247	0.503	0.29
71	0.283	0.224	0.277	0.66	0.402
89	0.288	0.568	0.290	0.74	0.57
95	0.312	0.611	0.310	0.87	0.698
136	0.292	0.608	0.308	0.81	0.673
143	0.286	0.604	0.302	0.79	0.664
162	0.272	0.602	0.300	0.404	0.661

ตารางที่ จ.8 ผลการศึกษาสภาวะอิทธิพลของ glucose และ yeast extract ต่อการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์นม ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : y = yeast extract

glu = glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่ / อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร					
	น้ำทิ้ง + y 0.5% + glu 0.1%	น้ำทิ้ง + y 0.5% + glu 0.2%	น้ำทิ้ง + y 0.5% + glu 0.3%	น้ำทิ้ง + y 0.5% + glu 0.5%	น้ำทิ้ง + y 0.5% + glu 0.7%	น้ำทิ้ง + y 0.5% + glu 0.8%
43	0.664	0.672	0.642	0.496	0.397	0.392
48	0.695	0.675	0.646	0.537	0.399	0.392
66	0.732	0.697	0.658	0.586	0.404	0.403
74	0.743	0.715	0.662	0.599	0.425	0.407
116	0.839	0.923	0.866	0.669	0.518	0.420
122	0.796	0.897	0.845	0.618	0.498	0.403
141	0.728	0.874	0.803	0.607	0.436	0.403

<u>ตารางที่ จ.9</u> แสดงผลการศึกษาสภาวะอิทธิพลของ glucose ปริมาณต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ <u>Propionibacterium</u> <u>freudenreichii</u> โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์เมื่อเติม yeast extract 0.5 % ในสภาพ stationary flask ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่/อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตร				
	น้ำทิ้ง + glu 1% + y 2%	น้ำทิ้ง+ glu 1%+ y 2.5%	น้ำทิ้ง+ glu 1%+ y 3%	น้ำทิ้ง+ glu 1%+ y 3.5%	น้ำทิ้ง+ glu 1%+ y 4%
21	0.651	0.646	0.66	0.634	0.615
67	0.760	0.758	0.742	0.706	0.773
72	0.807	0.808	0.780	0.787	0.802
90	0.85	0.842	0.845	0.825	0.831
98	0.822	0.815	0.820	0.778	0.818
127	0.775	0.753	0.714	0.762	0.716
134	0.762	0.734	0.694	0.731	0.714
154	0.735	0.732	0.685	0.721	0.708

<u>ตารางที่ จ.10</u> ผลการศึกษาสภาวะอิทธิพลของ yeast extract ปริมาณต่างๆต่อการเจริญของเชื้อ <u>Propionibacterium</u> <u>freudenreichii</u> โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นมเมื่อเติม glucose 1% ในสภาวะ stationay flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : y = yeast extract

glu = glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่ / อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร					
	Co 8 mg	Co 12 mg	Co 16 mg	Co 20 mg	Co 24 mg	Co 28 mg
21	0.151	0.143	0.121	0.160	0.051	0.031
67	0.467	0.455	0.365	0.406	0.162	0.145
72	0.589	0.524	0.500	0.430	0.215	0.202
88	0.637	0.621	0.615	0.589	0.244	0.320
95	0.75	0.67	0.63	0.605	0.395	0.390
136	0.73	0.61	0.59	0.57	0.389	0.360
143	0.69	0.58	0.54	0.53	0.377	0.356

ตารางที่ จ.11 แสดงผลการศึกษาสภาวะอิทธิพลของเกลือโคบอลท์ ปริมาณต่างๆต่อการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม เมื่อเติม glucose 0.2 % และ yeast extract 2 % ในสภาวะ stationary flask ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของ working standard (x 10^{-5} μg/tube)	0.0	0.5	1	2	3	4	5
ค่า O.D.660 nm.	0.08	0.13	0.22	0.3	0.48	0.62	0.71

ตารางที่ จ.12 แสดงค่า O.D.ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร

ปริมาตร / อาหาร	dilution 1			dilution 10^{-1}			dilution 10^{-2}			dilution 10^{-3}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
C.M. stationary	0.14	0.26	0.36	0.07	0.08	0.1	0.06	0.06	0.04	0.05	0.06	0.05
C.M. mixing	0.15	0.22	0.41	0.08	0.06	0.09	0.06	0.07	0.08	0.06	0.05	0.05
น้ำทิ้ง stationary	0.2	0.4	0.66	0.06	0.08	0.08	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
น้ำทิ้ง mixing	0.18	0.4	0.62	0.08	0.07	0.08	0.07	0.05	0.06	0.07	0.07	0.07

ตารางที่ จ.13 แสดงค่า O.D. ของปริมาณวิตามินบี 12 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น working standard ($x10^{-5}$ μg/tube)	0.0	0.5	1	2	3	4	5
ค่า O.D.ที่ 660 nm.	0.291	0.375	0.39	0.496	0.538	0.593	0.644

ตารางที่ จ.14 แสดงค่า O.D.ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร

ปริมาตร / อาหาร	dilution 1			dilution 10^{-1}			dilution 10^{-2}			dilution 10^{-3}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
C.M. stationary	0.27	0.44	0.58	0.28	0.28	0.28	0.22	0.19	0.23	0.21	0.23	0.27
C.M. mixing	0.31	0.39	0.64	0.23	0.28	0.28	0.27	0.27	0.28	0.27	0.28	0.27
น้ำทิ้ง stationary	0.49	0.79	1.11	0.3	0.33	0.37	0.28	0.26	0.28	0.24	0.25	0.28
น้ำทิ้ง mixing	0.54	0.82	1.05	0.33	0.38	0.42	0.28	0.31	0.28	0.28	0.27	0.27

ตารางที่ จ.15 แสดงค่า O.D.ของปริมาณวิตามินบี 12 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับเอกชนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น working standard ($x10^{-5}$ μg/tube)	0.0	0.5	1	2	3	4	5
ค่า O.D.ที่ 660 nm.	0.14	0.24	0.365	0.523	0.627	0.7	0.78

ตารางที่ จ.16 แสดงค่า O.D.ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร

ปริมาตร / อาหาร	dilution 1			dilution 10^{-1}			dilution 10^{-2}			dilution 10^{-3}		
	0.2	0.5	1	0.2	0.5	1	0.2	0.5	1	0.2	0.5	1
C.M. stationary	0.23	0.36	0.52	0.19	0.24	0.23	0.13	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16
C.M. mixing	0.22	0.37	0.55	0.14	0.15	0.17	0.12	0.13	0.13	0.14	0.15	0.15
น้ำทิ้ง stationary	0.31	0.68	1.11	0.18	0.21	0.27	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.15
น้ำทิ้ง mixing	0.36	0.85	1.01	0.17	0.18	0.28	0.15	0.16	0.16	0.13	0.14	0.16

ตารางที่ จ.17 แสดงค่า O.D.ของปริมาณวิตามินบี 12 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น working standard (x10^{-5} μg/tube)	0.0	0.5	1	2	3	4	5
ค่า O.D.ที่ 660 nm.	0.08	0.13	0.22	0.3	0.48	0.62	0.71

ตารางที่ จ.18 แสดงค่า O.D.ของ working standard ที่ 660 นาโนเมตร

ปริมาตร / อาหาร	dilution 1			dilution 10^{-2}			dilution 10^{-2}			dilution 10^{-3}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
C.M. stationary	0.25	0.4	0.5	0.18	0.19	0.23	0.14	0.15	0.16	0.13	0.15	0.14
C.M. mixing	0.3	0.41	0.51	0.2	0.22	0.24	0.14	0.15	0.16	0.14	0.15	0.15
น้ำทิ้ง stationary	0.35	0.7	0.99	0.15	0.2	0.22	0.16	0.15	0.18	0.17	0.14	0.16
น้ำทิ้ง mixing	0.4	0.7	1.0	0.17	0.21	0.24	0.16	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14

ตารางที่ จ.19 แสดงค่า O.D. ของปริมาณวิตามินบี 12 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สภาวะ ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ภาพแสดงอุปกรณ์และผลิตภัณฑ์ในการทดลอง

ฉ.1 แสดงน้ำทิ้งจากการผลิตผลิตภัณฑ์นม และน้ำทิ้งที่ผ่านการกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.2 แสดงการวิเคราะห์ carbohydrate ในน้ำทิ้งโดย phenolic method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.3 แสดงการวิเคราะห์ crude protein ในน้ำทิ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.4 แสดงการหาค่า DO. ตามวิธี Aamerican Public Health Assciation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูป.5 แสดง P. freudenreichii ใน complete medium ณ สภาวะ stationary flask

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.6 แสดง L. leichmannii ใน micro inoculum broth

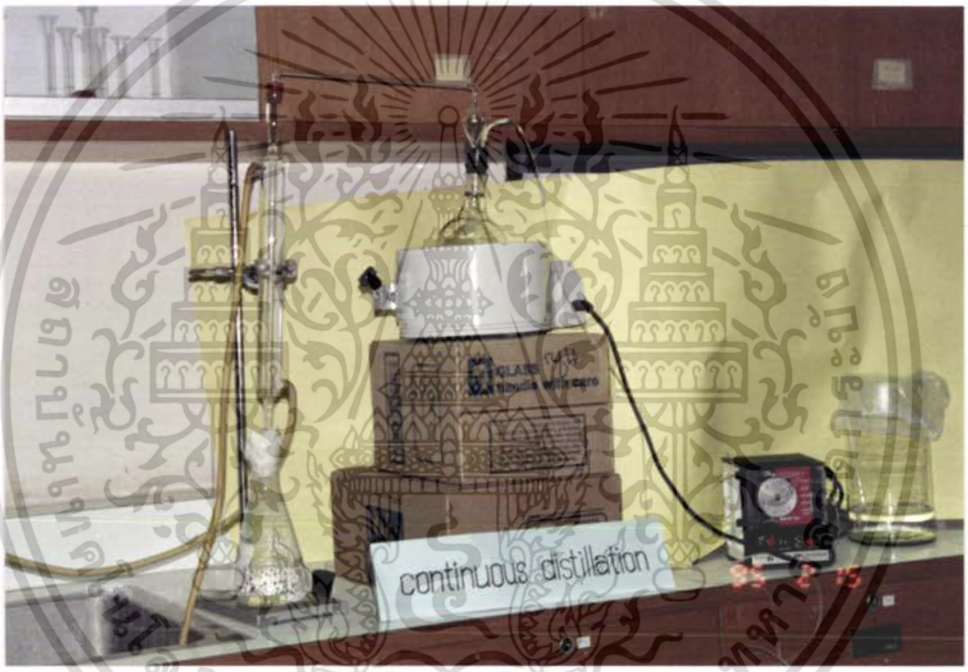
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.7 แสดง P. _freudenreichii_ ใน complete medium ณ สภาวะ batch fermenter ที่มีระบบการกวน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.8 แสดงน้ำทิ้งเติมน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์, yeast extract 2 เปอร์เซนต์ $CoSO_4.7H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ batch fermenter ที่มีระบบการกวน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ฉ.9 แสดงการกลั่นน้ำแบบ continuous distillation

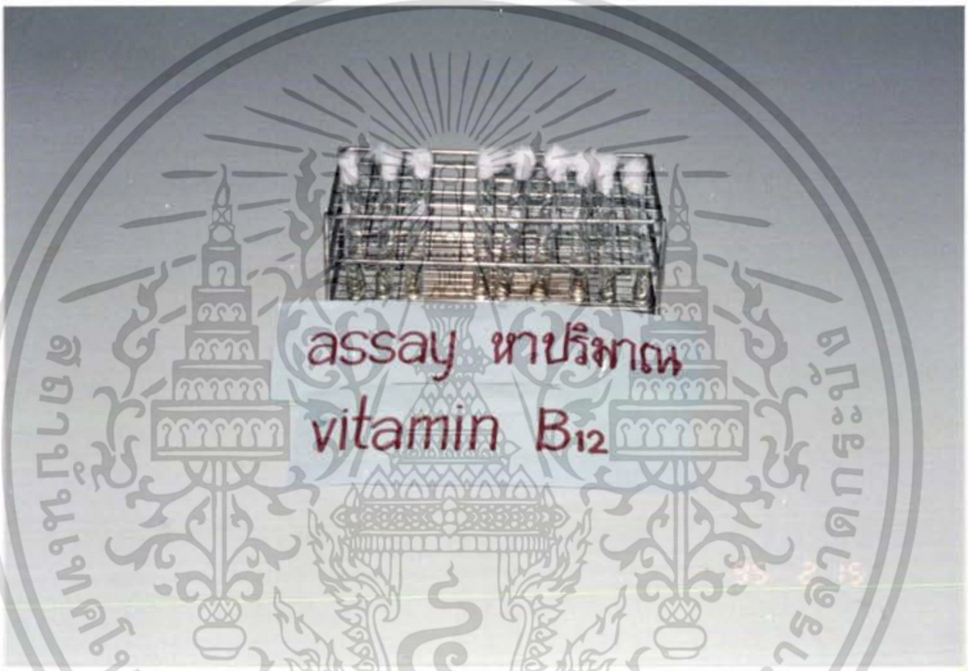
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉ.10 แสดงผลึกของวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

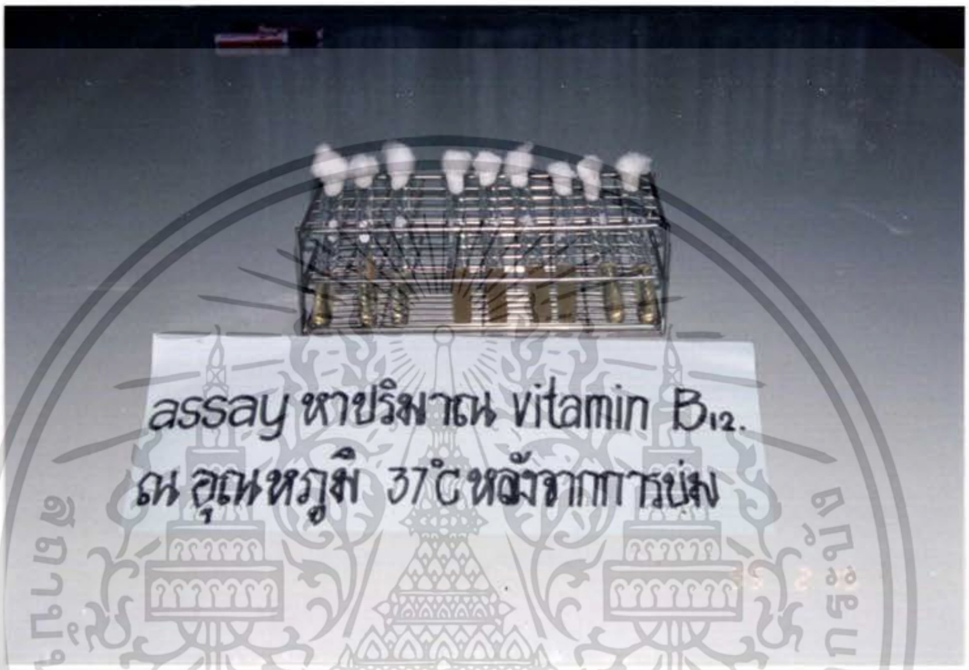
ฉ.11 แสดงวิตามินบี 12 stock solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ฉ.12 แสดงการหาปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้ง ก่อนการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ฉ.13 แสดงความขุ่นของอาหาร หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์. "การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ <u>Propionibacterium</u> <u>freudenreichii</u> subsp. shermanii (ATCC 13673)โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ." วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัญฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2518.

2. พิณทิพย์ พุลโภคา. "การคัดเลือกสายพันธุ์ <u>Pseudomonas</u> spp. และการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12." วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2523.

3. บุษบา ยงสมิทธ์ ทอรายา เฟตซูโอะ และ ยามาเน ทซูเนโอะ. "การผลิตวิตามินบี 12 โดยแบคทีเรียที่ใช้เมทธานอลเป็นวัตถุดิบ" รวบรวมเรื่องย่อสาขาพืช <u>การประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยา</u> ครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2518.

4. ประชา บุญศิริกุล. การไปฝึกอบรม "การแปรรูปถั่วเหลืองให้เป็นอาหาร" <u>วารสารอาหาร</u> 7(3) : 21-34. 2518.

5. วรพงษ์ สุริยจันทราทอง จินดา สุรสุโชค สุวิทย์ ผลลาภ ฉายแสง สาระผล และ อุทัย พิสณย์. การใช้ข้าวเป็นอาหารของกระบือเมื่อเสริมด้วยยูเรียและกากน้ำตาล. <u>วิทยาสารเกษตรศาสตร์</u>. 8(2) : 103-108. 2517.

6. เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. <u>การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชน</u>. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย. 2518.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. โสภน กิติสิน วุฒิศักดิ์ บุตรธน มณฑา นันทพันธ์ และ ประเทือง สง่าวงศ์. "การศึกษาพันธุ์ถั่วที่ต้านทานโรครัสต์. " รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์ และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 13. โรงพิมพ์การศาสนา. 2518.

9. อโณทัย คมเศวต. "การศึกษาการเจริญของยีสต์อาหารสัตว์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ." วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2519.

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

11. Association of vitamin ghemists, Inc. 1951. " Methods of vitamin assay." Interscience, New York.

12. American Type Culture Collection. 1972. The American Type Culture Collection Cattalogue of Strains. American Type Culture Collection, Maryland.

13. APHA AWWA and WPCF. 1971. Standard methods for the examination of water and waste water. 13[th] edition, American Public Health Association, Newyork.

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

15. 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.

16. 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Development Corp, New Jersey.

17. Bennett, R.E. and T. Haute. 1950. "Process for the Production of animal protein factor." U.S. Patent 2,681,881, June 22, 1954.

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

19. Borrows, W. ; J.W. Moulder; R.M. Lewert and J.W. Rippon.1968. Textbook of microbiology. Toppon Company Limited, Tokyo, Japan.

20. 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 Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore.

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

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

23. Cleasby, T.G. 1963. "The Feeding Value of Molasses." S.A. Sugar J. 47 : 260-267.

24. Committee of Rivision and Published by the Board of trustus. 1965. The Pharmacopeia of the United States of America.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The United State Pharcopeial Convention. Inc. Washington D.C.

25. Darken,M.A.1953. "Production of vitamin B_{12} by microorganism and its occurence in plant tissues." Cited in Gleason, H.A. and E.H. Fulling. 1953. Boton. Rev. 19: 99-129.

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

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

28. Garibaldi, J.A. ; I. Kosuke; N.S. Snell and J.C. Lewis. 1953. " Bacillus megaterium for biosynthesis of cobalamin " Ind. Eng. Chenm. 45: 838-846.

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

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

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

32. Hall, H.H.; R.G. Benedict; C.F. Wieson; C.E. Smith and R.W.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jacksons.1953. " Vitamin B_{12} production by fermentation with Steptomyces olivaceus." Appl. Microbiol. 1: 124-129.

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

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

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

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

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

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

39. Hoogerheide, J.C.1954. " Production of vitamin B_{12} by Agrobacterium radiobacter." U.S. Patent 2,798,840.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

July 9, 1957.

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

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

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

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

44. Lewis, J.C.; K. Ijichi; N.S. Snell and J.A. Garbildi.1949. "Fermentation process for production of vitamin B_{12}. " U.S. Dept. Agr., Bur. Agr. and Ind. Chem., Mimeographed Circ. Ser., AIC 254. Cited in Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. Industrial Microbiology. Mc Graw-Hill Book Co., Inc., New York, Toronto and London.

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

46. Manothirawat, N. 1973. " Factor affecting vitamin B_{12} Production by Bacillus megaterium (ATCC 13639) in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

waste water. " Bangkok ; M.S. Thesis, Kasetsart University.

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

48. Masao Yamamoto, Rokuro Okamoto, Taiji Inui. "Application of a Marine-utilizing Bacteria for Bioassay of vitamin B_{12} in Sea Water." Central Research Laboratories, Sanrako-Ocean Co., Ltd., Fujisawa 251.

49. Meyer, C.F. and W.H. de Vries. 1949. "Preparation of vitamin B_{12} concentrates from Streptomyces griseus cultures." U.S. Patent 2,595,159. Apr. 29, 1952.

50. Milner, M. 1966. General outlook for seed protein concentrates p.52-59. In : Gould R.F. 1966, World Protein Resourcees. Adv. in Chem. Series. American Chemical Social, Washington D.C.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

53. Napavarn Manothirawat. " Factor Affecting vitamin B_{12} Production by Bacillus megaterium (ATCC 13639) in waste water" Thesis Mahidol University. 1973.

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

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

56. Norris, J.R. and D.W. Ribbons.1971. Methods in Microbiology. vol. 5B. Academic prees. New York.

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

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

59. Osman, H.G. and M.S. Chhenouda. 1968. Biosynthesis of vitamin B_{12} by Proopionibacterium shermanii II. The suitability of differrent carbon and nitrogen sources as wel as the effect of vitamins, purines and pyrimidines on the growth and vitamin B_{12} synthesis. J. chem. UAR. 11,353-361. Abstract in Microbiol. Abstracts section A Industrial Microbiology.

60. Osman, H.G. and M.S. Cheneuda. 1968. Biosynthesis of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 Microbiol. Abstract Secstion A Industrial Microbiology

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

62. Peppler, H.J. 1967. Microbial Thecnology, Reinhold Publishing Cororation.

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

London.

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

69. 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.

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

71. Rudy, H.; J. Rauch; K.R. Dietrich and C. Constabel. 1963. Citric acid mycelium. U.S. Patent 3,085,049 ; April 9, 1964. In : Noyes, R., 1969, Vitamin B_{12} manufacture, Noyes Development Corp, New Jersey.

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

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

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

75. Speedie, J.D. and G.W. Hall.1960. " Vitamin B_{12} production by Propionibbacteium shermanii." U.S.Patent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2,951,317. July 15, 1963.

76. 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.

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

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้