สำนักหอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตวิตามิน B_{12} จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมนม โดยเชื้อ Pseudomonas fluorescens TISRT781

นางสาวทิพย์วรรณ แสวงศรี

นางสาวทัสนี เสือธนู

ปพ
ท๔๖๘ก
2535

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

612547618

โครงงานนิเศษที่เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A Study of Vitamin B_{12} Production in waste water from Thai Dairy Industry Company Limited by *Pseudomonas fluorescsen* TISTR781

Thippawan Sweangsri

Tassanee seartanoo

A Speciaol Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1992

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การศึกษาประสิทธิภาพการผลิต วิตามิน B_{12} จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมนม โดยเชื้อ Pseudomonas fluorescens TISTR781
โดย	นางสาวทิพย์วรรณ แสวงศรี
	นางสาวทัสนี เสือธนู
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

(ผศ.สุขใจ ชูจันทร์) กรรมการ

(ผ.ศ.ดร.ศรีเรือน สุทธิมนัส) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตวิตามิน B_{12} จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมนม โดยเชื้อ Pseudomonas fluorescens TISTR781
นักศึกษา	นางสาวทิพย์วรรณ แสวงศรี
	นางสาวทัสนี เสือธนู
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.สุขใจ ชูจันทร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2535

บทคัดย่อ

ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas fluorescens TISTR781 เพื่อสังเคราะห์วิตามิน B_{12} ในน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์นม ซึ่งมีโปรตีน 0.83 เปอร์เซนต์ คาร์โบไฮเดรต 0.25 เปอร์เซนต์ และมีค่า BOD 2200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำการศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆ พบว่า น้ำทิ้งที่เติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ Glucose 0.1 เปอร์เซนต์ Cobolt 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Choline chloride 0.5 เปอร์เซนต์นั้นให้อัตราการเจริญสูงสุด และสูงกว่าอัตราการเจริญที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร NB

ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตวิตามิน B_{12} จาก Ps. fluorescens ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมแหล่งอาหารที่เหมาะสมในปริมาณที่เหมาะสมกับปริมาณ B_{12} ที่ได้จากการเลี้ยง Ps. fluorescens ใน NB พบว่า Ps. fluorescens ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งเติมแหล่งอาหารสามารถผลิตวิตามิน B_{12} ได้ปริมาณสูงสุด $26.6 * 10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าที่เพาะเลี้ยงใน NB ซึ่งได้ปริมาณวิตามิน B_{12} สูงสุด $15.16 * 10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อลิตร

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า BOD ของน้ำทิ้ง โดยศึกษาค่า BOD แรกเริ่มเมื่อรับน้ำทิ้งจากโรงงาน พบว่ามีค่า 2200 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเติมแหล่งอาหารและสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อ Ps. fluorescens แล้ว พบว่ามีค่า BOD 12000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำน้ำทิ้งนั้นไปเพาะเลี้ยง Ps. fluorescens เพื่อผลิตวิตามิน B_{12} แล้ววัดค่า BOD หลังการเก็บเกี่ยว B_{12} พบว่ามีค่า 1100 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ค่า BOD หลังการทดลองลดลง 90.8 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับค่า BOD ก่อนการทดลอง และลดลง 50 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับค่า BOD แรกเริ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special project title	A Study of Vitamin B_{12} Production in Waste Water from Thai Dairy Industry Company Ltd.
Name	Miss Tippawan Sweangsri
	Miss Tassanee Seartanoo
Special Project Advisor	Asst.Prof. Sukjai Choojan
Department	Applied Biology
Acedemic Year	1992

Abstract

Waste water from Thai dairy industry limited which consisted of 0.83 percents protein, 0.25 percents carbohydrate and 2,200 milligrams per liter BOD was studied for cultivation of Pseudomonas fluorescens (TISTR781) for growth and vitamin B_{12} production.

Growth and vitamin B_{12} production experiment were performed using waste water with and without supplemented various chemicals. 0.5 Percents yeast extract was the best as N-source, 0.1 percents glucose was the best as C-source, 8 milligrams per liter $CoSO_4.7H_2O$ was the best as cobalt source and 0.5 percents choline choride was the best as growth factor source.

Vitamin B_{12} production, waste water with supplemented various chemicals contained $26.6 * 10^{-2}$ micrograms per liter compared with nutrient broth contained $13.16 * 10^{-2}$ micrograms per liter.

For non supplemented waste, up to 50 percents reduction of 5 days BOD was achieved, from 2,200 milligrams per liter to 1,100 milligrams per liter. For supplemented waste, up to 90.8 percents reduction of 5 days BOD was achieved, from 12,000 milligrams per liter to 1,100 milligrams per liter after bacterial separation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานโครงงานพิเศษ ฉบับนี้ จัดทำขึ้นตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต(เทคโนโลยีชีวภาพ) ซึ่งไม่อาจจะสำเร็จลุล่วงลงไปได้ หากไม่ได้รับการช่วยเหลือด้านปัจจัย วัตถุต่าง ๆ ตลอดจนคำแนะนำจากบุคคลและนิติบุคคล ดังนี้

ขอขอบพระคุณทาง บริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมนม และได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้ความช่วยเหลือในเรื่องของข้อมูล

ขอขอบพระคุณทางสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนคำแนะนำ วิธีการเลี้ยงจุลินทรีย์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สุขใจ ชูจันทร์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและได้กรุณาให้คำแนะนำการทำโครงงานพิเศษ ตลอดจนแนวทางการแก้ไขปัญหา

และขอขอบคุณเพื่อน ๆ และ น้อง ๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจในการทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงอัตราการเจริญเปรียบเทียบระหว่าง Pseudomonas aeroginosa และ Ps. fluorescens	43
ตารางที่ 2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความขุ่นของเชื้อ (O.D. ที่ 660 นาโนเมตร) กับน้ำหนักเซลแห้ง (dry weight กรัมต่อลิตร)	45
ตารางที่ 3	แสดงผลการเปรียบเทียบของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB, น้ำทิ้ง , น้ำทิ้งเติม 0.25 % Yeast extract และ 1 % Glucose , น้ำทิ้งเติม 0.25 % Yeast extract , น้ำทิ้งเติม 1 % Glucose	48
ตารางที่ 4	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาล Glucose 1 % และ เติม Yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ	51
ตารางที่ 5	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เลี้ยงใน NB และเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract และ เติม Glucose ในปริมาณต่าง ๆ	53
ตารางที่ 6	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract, 0.1 % Glucose และ เติม Cobalt ในปริมาณต่าง ๆ	57
ตารางที่ 7	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract, 0.1 % Glucose , Cobalt 8 mg/l และเติม Choline chloride ในปริมาณต่าง ๆ	60
ตารางที่ 8	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract, 0.1 % Glucose, Cobalt 8 mg/l และเติม Glutamic ในปริมาณต่าง ๆ	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Working Standard Solution และค่า O.D. ที่ชั่วโมงที่ 10 66

ตาราวที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Working Standard Solution และค่า O.D. ที่ชั่วโมงที่ 20 68

ตารางที่ 11 แสดงค่า O.D. ของน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract, 0.1 % Glucose , Cobalt 8 mg/l , 0.5 % Choline chloride หลังบ่มและปริมาณวิตามิน B_{12} ที่ Ps. fluorescens สร้างได้ 70

ตารางที่ 12 แสดงค่า O.D. ของ NB หลังบ่มและปริมาณวิตามิน B_{12} ที่ Ps. fluorescens 71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	การบ่มน้ำทิ้ง 5 วันในตู้เย็น	17
รูปที่ 2	การเติมสาร A-I-A และ $MnSO_4.7H_2O$	18
รูปที่ 3	การเตรียมน้ำสำหรับเจือจาง	19
รูปที่ 4	การเติม H_2SO_4	20
รูปที่ 5	การไตเตรทหาปริมาณออกซิเจน	21
รูปที่ 6	Stock เชื้อ Ps. fluorescens	23
รูปที่ 7	การกรองน้ำเสีย	27
รูปที่ 8	การหาปริมาณสารที่เหมาะสมของ Ps. fluorescens โดยเลี้ยงใน Shaker	28
รูปที่ 9	การเลี้ยง Ps. fluorescens ใน NB และน้ำทิ้งเติมแหล่งอาหารเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ B_{12}	31
รูปที่ 10	B_{12} Stock Standard in Ampule	32
รูปที่ 11	วิธีการเตรียมปริมาณ B_{12} Working Standard	33
รูปที่ 12	การเตรียมปริมาณ B_{12} ที่สร้างได้จาก Ps. fluorescens เพื่อการอ่านค่าโดยวิธี Microbioassay	35
รูปที่ 13	การบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส 40 ชั่วโมง เพื่อเหมาะสมแก่การเจริญของ Lactobacillus leichmannii	36
รูปที่ 14	กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญระหว่าง Ps. aeroginosa และ Ps. fluorescens	44
รูปที่ 15	กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความขุ่น กับน้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	46
รูปที่ 16	กราฟเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้ง , น้ำทิ้งเติม 0.25 % Yeast extractและ 1 % Glucose , น้ำทิ้งเติม 0.25 % Yeast extract , น้ำทิ้งเติม 1 % Glucose , NB	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

รูปที่ 17 กราฟเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% และเติม yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ 52

รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5% yeast extract และเติม glucose ในปริมาณต่างๆ 54

รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluoresccens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5% yeast extract, 0.1% glucose และเติม cobalt ในปริมาณต่างๆ 58

รูปที่ 20 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5% yeast extract, 0.1% glucose , cobalt 8 mg/l และเติม choline chloride ในปริมาณต่างๆ 61

รูปที่ 21 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5% yeast extract , 0.1% glucose , cobalt 8 mg/l และเติม glutamic acid ในปริมาณต่างๆ 64

รูปที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณ Working Standard Solution และ ค่า O.D. ชั่วโมงที่ 10 67

รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณ Working Standard Solution และ ค่า O.D. ชั่วโมงที่ 20 69

รูปที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ B_{12} ที่ Ps. fluorescens ผลิตได้ในช่วงเวลาต่าง ๆ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย		ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญตาราง		ง
สารบัญรูป		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3	การดำเนินงานวิจัย	14
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์	38
บทที่ 5	สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	73
ภาคผนวก	ก	
ภาคผนวก	ข	
ภาคผนวก	ค	
ภาคผนวก	ง	
ภาคผนวก	จ	
เอกสารอ้างอิง		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

มนุษย์มีความต้องการวิตามินบี 12 ในปริมาณที่น้อยมาก แต่วิตามินบี 12 มีความสำคัญคือ เป็นองค์ประกอบของตับที่ทำให้เม็ดเลือดแดงเจริญเติบโต ช่วยไม่ให้เป็นโรคโลหิตจางชนิด pernicious anaemia ถึงแม้ว่าร่างกายจะต้องการวิตามินบี 12 ในปริมาณน้อย แต่ถ้าขาดก็จะทำให้เกิดโรคโลหิตจางและเกิดอาการทางประสาท วิตามินบี 12 ที่ผลิตได้จะนำมาใช้ในทางการแพทย์ และเภสัชกรรม เพื่อเป็นยารักษาโรค ยาบำรุง และส่วนประกอบ ของยาบางชนิด ตลอดจนโภชนาการของมนุษย์และสัตว์

วิตามินบี 12 เป็นตะกอนสีแดงคล้ำในรูปของปริซึม มีสูตรโมเลกุล C_{63} H_{88} O_{14} PCo มีชื่อทางเคมีว่า 5,6 - dimethylbenzimidazolyl cobamide cynide หรือมีชื่อสั้น ๆ ว่า cyanocobalamin

วิตามินบี 12 ส่วนใหญ่ถูกจุลินทรีย์สร้างในรูปโคเอนไซม์บี 12 หรือ DBCC นอกจากนั้นก็ยังพบในรูปของ Methy Cobalamide และในกรณีจุลินทรีย์เป็นพวกต้องการอากาศก็อาจพบ hydroxocobalamin วิตามินทั้ง 3 รูปนี้ไม่คงตัว ส่วนวิตามินบี 12 ใน รูปคงตัวและร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่ จะอยู่ในรูป Cynoco balamine

ปัจบันอุตสาหกรรมการผลิตวิตามินบี 12 อาศัย กิจกรรมจากจุลินทรีย์เท่านั้น ส่วนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นยังไม่สามารถทำได้เนื่องจากเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้าง สลับซับซ้อน ได้มีผู้พยายามคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างวิตามินบี 12 ได้ในปริมาณสูง โดยใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น ซึ่ง Pseudomonas spp. เป็นบักเตรีที่ได้รับความสนใจชนิดหนึ่งเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้เร็วสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในระยะเวลาอันสั้น มีความสามารถใช้อาหารได้อย่างกว้างขวาง และไม่มีการสร้างปฏิชีวนะ ทำให้สะดวกต่อการนำวิตามินบี 12 ไปใช้ต่อไป

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมนม เป็นน้ำทิ้ง ที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ อาทิเช่น มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อยู่มากและแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนนี้ก็เป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดความเน่าเสียของน้ำ หากนำจุลินทรีย์ไปเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้ง ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในน้ำทิ้งเพื่อการเจริญเติบโตได้แล้วก็นับว่าจะเน้นการได้ใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งวิธีหนึ่ง และยังสามารถได้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งสร้างโดยจุลินทรีย์อีกด้วยที่น่าสนใจก็คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pseudomomas spp.

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษา การเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Pseudomonas spp. ในน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมนม เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม และเป็นแนวทางในการพัฒนาการผลิตวิตามินบี 12 ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ Pseudomonas fluorescens ในน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมนม
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Pseudomonas fluorescens ในน้ำทิ้งโรงงานอุสาหกรรมนม
3. ศึกษาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 จาก Psedomonas fluorescens ในระดับ shaker
4. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยี การผลิตวิตามินบี 12 อันจะเป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม
5. เพื่อเป็นแนวทาง ในการทำวิจัยเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งและการผลิตวิตามินบี 12 ต่อไป

ขอบเขตของโครงงานวิจัย

เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Pseudomonas fluorescens ในน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมนม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ใช้ประโยชน์ จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม และ ได้วิตามินบี 12 ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญต่อมนุษย์อย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะโครงสร้างของวิตามินบี 12

วิตามินบี 12 เป็นวิตามินละลายน้ำ มีลักษณะเป็นผลึกสีแดงเข้ม รูปเข็มหรือ ปริซึม มีสูตรทางเคมี คือ C_{63} H_{88} O_{14} N_{14} PCo มีชื่อทางเคมีว่า 5, 6 - dimethylbenzimidazolyl cobamide cyanide หรือที่เรียกสั้น ๆ ว่า cyanocobalamin (28, 29, 37)

โมเลกุลของวิตามินบี 12 แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ porphyrinlike planar group และ nucleotide side chain ส่วน porphyrinlike planar grop เป็นส่วนแกนกลางโครงสร้างเรียกว่า corrin ring ซึ่งประกอบด้วย 4 pyrrole ring เชื่อมกันโดยมีโคบอลท์เป็นแกนกลาง ส่วน nucleotide side chain คือ 5,6-dimethylbenzimidazole เชื่อมกับ corrin ring 2 ส่วน คือ phosphoric acid ของ nucleotide จะเชื่อมกับ propionamide group ของ ring D ด้วย aminopropanol bridge และ nitrogen ของ nucleotide จะ co-ordinate กับอะตอมโคบอลท์ ในแนวเกือบตั้งฉากกับ corrin ring ซึ่ง bond นี้ถูกทำลายได้ง่าย เช่น เมื่อเติม cyanide ลงไป จะได้สารประกอบ ที่เรียกว่า cyanocobalamin (13, 17, 28)

โดยปกติวิตามินบี 12 ที่ผลิตขึ้นมานั้นจะผลิตในรูป cyanocobalamin ซึ่งมีคุณสมบัติค่อนข้างอยู่ตัวกว่า cobalamin ในรูปอื่นๆ (17, 28) ดังนั้น วิตามินบี 12 ซึ่งเรียกทั่วๆ ไปนั้นจึงมักหมายถึง cyanocobalamin แต่อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติ การสังเคราะห์วิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์นั้นจะเกิดในรูป coenzyme B_{12} (cobamide coenzyme) ซึ่งอาจมี 5-deoxuadenodine หรือ methyl group แทนที่จะเป็น cyanide group (6, 28) นอกจากนี้อาจจะพบ cobalamin อยู่ในรูป hydroxocobalamin ซึ่งมี hydroxyl group แทนที่ cyanide หรือnitrito cobalamin ซึ่งมี nitrogen แทนที่ cyanied (33) สำหรับส่วนของ 5,6-dimethylbenzimidazole อาจถูกแทนที่ได้โดย nitrogenous base อื่น ๆ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2-methyl adenine หรือ guanine (6)

วิตามินบี 12 มีลักษณะโครงสร้างโมเลกุลสลับซับซ้อนมากกว่าวิตามินอื่นๆ Hodgkin et al. (21,22) สามารถศึกษาโครงสร้างโมเลกุลวิตามินบี 12 ได้ สำเร็จโดยใช้ x-ray crystallographic analyses

2. การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

อุตสาหกรรมการผลิตวิตามินบี 12 ในระยะแรกได้จากวัตถุพลอยได้จากขบวนการผลิตสารปฏิชีวนะของ Streptomyces spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตสเตรปโตมัยซิน และวัตถุพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิต acetone butanol (12) ต่อมามีผู้รายงานว่าน้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตต่าง ๆ เมื่อผ่านขบวนการกำจัดแล้วจะมีปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นในส่วนของ sludge โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเติมเกลือโคบอล์ทในระหว่างขบวนการกำจัด (12) Hoover et al. (23) พบว่าใน activated sewage sludge มีวิตามินบี 12 9.3 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งและในปี ค.ศ. 1952ได้รายงานว่า sludge จากอุตสาหกรรมนม มีวิตามินบี 12 7.3 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (24) ส่วน Kamikubo และ Takata (25) พบว่า activated sewage sludge ในญี่ปุ่นมีวิตามินบี 12 6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

Bernhauer et al. (7) รายงานว่า นอกจาก activated sewage sludge แล้ว digested sludge สามารถใช้เป็นแหล่งของวิตามินบี 12 ได้ดีกว่า activated sewage ซึ่ง Sjostrom et al. (42) รายงานว่า digested sludge มีวิตามินบี 12 22 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนในactivated sludge พบเพียง 11 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง

แต่อย่างไรก็ตามปริมาณวิตามิน 12 ที่สกัดได้จากน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมการผลิตสารปฏิชีวนะ และจาก sludge ต่าง ๆ นั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการ (15) Hoover et al. (23) รายงานว่า วิตามินบี 12 ที่พบใน activated sewage sludge ส่วนใหญ่อยู่ในรูปสารประกอบที่คล้ายวิตามินบี 12 (vitamin B_{12} analogues)ซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ไม่สามารถใช้ได้ในคนและสัตว์ (28) และในการกำจัดสารประกอบที่คล้ายวิตามินบี 12 ให้ได้เฉพาะ cyanocobalamin นั้นใช้ต้นทุนสูง ทำให้วิตา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มินบี 12 มีราคาแพง (23)

ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ใน ปริมาณสูง ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์นั้น อาจทำได้โดยการคัดเลือกโดยตรง หรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (21) ดังเช่นการคัดเลือกสายพันธุ์ของ Propionibacterium spp. พบว่า Propionibacterium บางสายพันธุ์สามารถผลิตวิตามินบี12 ได้ในปริมาณสูง ถึง 25,000 ไมโครกรัมต่อลิตร (34) จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 พบว่า จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 และสารที่มีคุณสมบัติคล้ายวิตามิน 12 ได้แก่ แบคทีเรีย แอคทิโมมัยซีส ยีสต์ รา และสาหร่ายเขียว แกมน้ำเงิน (15) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีบางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงเพียงพอและนำมาใช้ในการผลิตทางอุตสาหกรรม

Burton and Lochhead (11), Ordanik (32) และ Kodge et al รายงานว่าแบคทีเรียใน family Pseudomonadaceae สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ Rickes et al . (38) รายงานว่า Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. mucidolens, Ps. mildenbergii และ Ps. chlororaphis สามารถสร้างวิตามินบี 12 ได้ โดยปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารแต่ละชนิด

การศึกษาการสังเคราะห์วิตามินบี 12 โดย Pseudomonas sp. ส่วนใหญ่ศึกษาใน Ps. denitrificans ซึ่ง Long (27) รายงานว่าสามารถให้วิตามินบี 12 ได้สูงในเวลาสั้น ซึ่ง Ps. denitrificans สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ในปริมาณต่าง ๆ กัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และองค์ประกอบอาหารตลอดจนวิธีการในการผลิต ดังเช่นจากรายงานของ Noyes (31) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์วิตามินบี 12 โดย Ps. nitrificans ในอาหารที่ประกอบด้วย beet molasses และเกลือแร่ต่าง ๆ รวมทั้งโคบอลท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาเกี่ยวกับ Pseudomonas spp. ในด้านการสังเคราะห์วิตามินบี 12

ในปัจจุบันการผลิตวิตามินบี 12 ได้มีผู้ให้ความสนใจใช้เชื้อ Propionibacterium และ Pseudomonas บางสายพันธุ์ (18) เนื่องจาก Propionibacterium มีความสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในปริมาณสูง (15) Rapp (68) รายงานว่า Propionibacterium shermanii สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ 58,000 ไมโครกรัมต่อลิตรในเวลา 150 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงใน cornsteep liquor medium ภายใต้สภาพขาดออกซิเจน นอกจากนี้อุตสาหกรรมการผลิตวิตามินบี 12 ส่วนใหญ่ยังใช้ Streptomyces ซึ่งในขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ใช้เวลานาน และในขบวนการผลิตวิตามินบี 12 นั้นมีการสร้างสารปฏิชีวนะออกมาด้วย ทำให้เป็นข้อยุ่งยากในการทำวิตามินบี 12 ให้บริสุทธิ์ และเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต (58) สำหรับ Pseudomonas นั้นได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นบักเตรีที่เจริญได้เร็ว สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้สูงในระยะเวลาสั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Ps. denitrificans (51) ซึ่งคุณสมบัตินี้มีประโยชน์ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ในทางอุตสาหกรรม โดยวิธีการหมักแบบ continuous ซึ่งให้ผลผลิตได้สูงกว่าการหมักแบบ batch (58)

Pseudomonas เป็นบักเตรีรูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้าง endospore เคลื่อนที่โดย polar flagella ต้องการออกซิเจนในขบวนการหายใจ ยกเว้นบาง species สามารถใช้ไนเตรทเป็นตัวรับอีเลคตรอน มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์ oxidase สามารถพบได้ทั่วไปในดิน น้ำจืด น้ำทะเล ส่วนใหญ่ไม่ต้องการ growth factor ในการเจริญสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด แม้กระทั่งสารประกอบพวก ring compound (14)

4. ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Pseudomonas spp.

จุลินทรีย์สร้างวิตามินบี 12 อยู่ภายในเซล (40) ดังนั้น ปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการเจริญ หรือการเพิ่มปริมาณของเซลย่อมมีโอกาสทำให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงขึ้นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งคาร์บอน และพลังงาน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงานแต่ละชนิดได้แตกต่างกันออกไป (18) Pseudomonas spp. สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้หลายชนิด บางสายพันธุ์สามารถใช้สารอินทรีย์ได้มากกว่า 100 ชนิด Pseudomonas ทุก species สามารถใช้ acetate เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ดี ส่วน Lactate, succinate และ glucose นั้น Pseudomonas ส่วนใหญ่สามารถใช้ได้ ยกเว้นบาง species เท่านั้น (9)

Daniels (15) ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. denitrificans พบว่า ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดสำหรับการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 จะแตกต่างกันออกไป คือ Ps. denitrificans สามารถใช้น้ำตาล glucose, sucrose, lactose, mannitol และ sorbitol ได้ดีสำหรับการเจริญ และการสังเคราะห์แสงวิตามินบี 12 แต่จะมีการเจริญและการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ต่ำ เมื่อใช้น้ำตาล galactose, maltose และ raffinose เป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน

แหล่งคาร์บอนและพลังงานที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. lumichrome, Ps. mildenbergii, Ps. chlororaphis และ Ps. mucidolens นั้นใช้น้ำตาล glucose ในการศึกษา (38)

แหล่งไนโตรเจน

Pseudomonas ใช้แหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้แตกต่างกันออกไป Rickes et al. (38) รายงานว่า Ps. lumichrome และ Ps. mucidolens เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน การใช้ hydrolyzed protein ร่วมกับ beefextract ได้ปริมาณวิตามินบี 12 มากกว่า การใช้ Soybean meal หรือ distillers solubles

นอกจากนี้ แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ที่ใช้ในการเลี้ยง Pseudomonas spp. ได้แก่ yeast extract ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน และ growth factor , beef extract , N-Z amine , soybean meal (38) หรือ ใช้สารประกอบอนินทรีย์ไนโตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจนร่วมกับ yeast extract (31)

จากการศึกษาการใช้สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนแต่ละชนิด ในการกระตุ้นการเจริญ และสังเคราะห์วิตามินบี 12 ใน Ps. fluorescens An 91 (1) พบว่าสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนแต่ละชนิดมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญ และสังเคราะห์วิตามินบี 12 ใน Ps.fluorescens An 91 แตกต่างกันออกไป โดยมี yeast extract เป็นแหล่งสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน สำหรับ Ps. fluorescensAn 91 ที่ให้ปริมาณเซล และวิตามินบี 12 สูงที่สุด

แหล่งเกลือแร่

จุลินทรีย์ต้องการเกลือแร่ในปริมาณต่ำ เมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ซึ่งเกลือแร่นี้อาจได้มาจากการปนเปื้อนในองค์ประกอบต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เกลือแร่บางชนิดในปริมาณมากเกินไปก็อาจจะยับยั้งการเจริญและการสังเคราะห์สารบางอย่างได้ (18,28)

โคบอลท์ (Co) เป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญมากต่อการสังเคราะห์วิตามินบี 12 เนื่องด้วยเป็นแกนกลางในการเชื่อม 4 pyrrole ring ของ porphyrinlink planar group (17) โดยปกติ โคบอลท์จัดเป็นแร่ธาตุที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ (30) โคบอลท์ในปริมาณ 10-20 มิลลิกรัมต่อลิตร จะยับยั้งการเจริญของ Streptomyces griseus (28) จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการโคบอลท์สำหรับการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ในปริมาณที่แตกต่างกัน Hendlin and Ruger (19) พบว่า Ps. lumichrome ยังสร้างวิตามินบี 12 ได้ 66 ไมโครกรัมต่อลิตร ในอาหารที่ไม่เติมโคบอลท์ และเมื่อเติมโคบอลท์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Ps. lumichrome สามารถสร้างวิตามินบี 12 ได้ถึง 273 ไมโครกรัมต่อลิตร Daniels (14) ศึกษาปริมาณโคบอลท์ที่มีผลต่อการสร้างวิตามินบี 12 ของ Ps. denitrificans พบว่า เมื่อใช้โคบอลท์ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร Ps. denitrificans จะสร้างวิตามินบี 12 ได้ 7,200 ไมโครกรัมต่อลิตร และเมื่อใช้โคบอลท์ 1, 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร Ps. denitrificans สร้างวิตามินบี 12 ได้ 2100 , 3500 และ 5500 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณโคบอล์ทที่จุลินทรีย์ต้องการสำหรับการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ขึ้นอยู่กับปริมาณที่มีอยู่แล้วในอาหารที่ใช้ และความสามารถของจุลินทรีย์ที่จะทนต่อความเป็นพิษของโคบอลท์ได้ (28)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งอาหารเสริม (growth factors)

โดยทั่ว ๆ ไป การเติม yeast extract ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นการเพิ่มแหล่งอาหารเสริม เช่น กรดอมิโน หรือ วิตามินบี แก่จุลินทรีย์ได้ (18)

ความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร

ความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร มีผลต่อการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ (14) จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน Pseudomonase ทุก species สามารถเจริญได้ดีในสภาพ pH เป็นกลางถึงเป็นด่างประมาณ ph 7-8.5 และไม่สามารถเจริญได้ใน pH ต่ำกว่าหรือเท่ากับ 6 (9, 14) Noyes (31) รายงานว่า วิตามินบี 12 จะสลายตัว เมื่อ pH ต่ำกว่า 4 หรือสูงกว่า 9

การศึกษา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. fluorescensAn91 ใน basal medium พบว่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7-8 แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ pH เริ่มต้น 8.0 ปริมาณเซลสูงสุดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้น ช่วง pH7.0-7.5 จึงเหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. fluorescens

อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์วิตามินบี 12 จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อุณหภูมิที่ Pseudomonase spp. สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 4-43 องศาเซลเซียส ซึ่งส่วนใหญ่จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 30 องศาเซลเซียส (9) การศึกษาการสร้างวิตามินบี 12 ของ Pseudomonas spp. ส่วนใหญ่ใช้อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส (28, 38)

จากการศึกษาการเจริญของ Ps.fluorescens An91ที่อุณหภูมิที่ 4 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่า Ps.fluorescensAn91 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส Buchnan er al (9) รายงานว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ Ps.fluorescens คือ 30 องศาเซลเซียส

การให้อากาศ (O_2)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. fluorescens ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และ ในสภาพที่ให้อากาศโดยการใช้เครื่องเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหาร basal medium ซึ่งเติม น้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และ yeast extract 0.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในสภาพไม่มีอากาศ Ps. fluorescens สามารถเจริญ ได้น้ำหนักแห้ง 0.55 และ 0.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในเวลา 50 ชั่วโมง และสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ 18 และ 16 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อระยะ lag phase ของจุลินทรีย์ นอกเหนือจากปัจจัยอื่น ๆ (18) พบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้น มีผลต่อระยะ lag phase โดยเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ Ps.fluorescens จะมี lag phase ประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งนานกว่าเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แต่ได้ปริมาณเซลสูงสุดใกล้เคียงกัน ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ Ps.fluorescens An 91 จะมีระยะ lag phase สั้นลง มีการเจริญเร็วกว่าเมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่ำกว่า และได้ปริมาณเซลสูงสุดใกล้เคียงกัน ในเวลา 36-42 ชั่วโมง

เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ จะลดระยะ lag phase และได้ปริมาณเซลสูงสุดเร็วกว่า เมื่อใช้ปริมาณเริ่มต้นต่ำ ซึ่งในทางอุตสาหกรรม นิยมใช้ปริมาณเริ่มต้น 5-10 เปอร์เซ็นต์ (36)

การวิเคราะห์หาวิตามินบี 12

การวิเคราะห์หาวิตามินบี 12 นั้นที่นิยมใช้มีหลายวิธีด้วยกัน คือ spectrophotometric method, chemical method, isotopic dilution assays, nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance spectroscopy, biological assay และ microbiological assay (26, 33, 34, 40) ซึ่งแต่ละวิธีการมีความเหมาะสมแตกต่างกันออกไป เช่น spectrophotometric และ chemical method นิยมใช้ในการเตรียมวิตามินบี 12 เพื่อเป็นยา (39) nuclear magnetic resonance และ electron paramagnetic resonance spectroscopy (20) นิยมใช้ในการจำแนกชนิดต่าง ๆ ของวิตามินบี 12 รวมทั้งในรูป coenxyme สำหรับวิธีการทาง biological assay และ microbiological assay นั้น นิยมใช้หาวิตามินบี 12 ซึ่งอยู่ในรูป complex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

biological materials(76) ซึ่ง microbiological assay เป็นที่นิยมใช้มากกว่า biological assay เนื่องจากใช้เวลาสั้น และสะดวกกว่า

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12 คือ Lactobacillus leichmenii (ATCC 4797), Lactobaeillus leichmanii (ATCC 7830), Escherichia coli (mutant type), Euglena gracilis, และ Ochromonas malhamensis (5, 40, 43)

1) Lactobacillus

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาวิตามินบี 12 ตัวแรก คือ Lactobacillus iactis Dorner เนื่องจากพบว่าตอบสนองต่อสารที่สกัดได้จากตับ แต่เนื่องจากการใช้ L. lactis Dornor มีข้อยุ่งยากเพราะมีการแตกสลายของเซล ทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการวิเคราะห์ ดังนั้น จึงนิยมใช้ L. leichmanii ATCC 4797 และ L .leichmanii ATCC 7830 แทน วิธีการวิเคราะห์ที่นิยมใช้สำหรับ lactobacilli คือ turbidity method โดยวัดความขุ่นของเซลหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 18-40 ชั่วโมง หรือโดยการไตเตรท (titration method) หาปริมาณกรดที่สร้างขึ้นมาหลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 72 ชั่วโมง (4, 40)

ปัญหาในการใช้ lactobacilli วิเคราะห์วิตามินบี 12 คือ จุลินทรีย์พวกนี้ตอบสนองต่อ deoxyribosides, sensitive ต่อ sodium chloride และสามารถใช้สารที่คล้ายวิตามินบี 12 เช่น Factor A, pseudovitamin B_{12} และสารอื่น ๆ ที่พบใน rumen content, sewage sludge, intestinal content ได้ นอกจากนี้ในตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์วิตามินบี 12 ถ้ามีสารปฏิชีวนะอยู่ด้วย เช่น ผลพลอยได้จากการผลิตสเตปโตมัยซิน การวิเคราะห์วิตามินบี 12 โดย lactobacilli จะมีข้อผิดพลาดมาก (40) แต่อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่มีวิตามินบี 12 ในปริมาณมาก การทำให้เจือจางสามารถลดปัจจัยเหล่านี้ไปได้ (28, 40) ปริมาณวิตามินบี 12 ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 1.0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในรูป cyanocobalamin (40)

การตอบสนองต่อ deoxyribosides โดย L. leichmanii เนื่องจากจุลินทรีย์นี้ต้องการวิตามินบี 12 หรือ coenzyme B_{12} สำหรับการ reduce ribonucleotide ให้เป็น deoxyribonucleotide (41,44)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) Escherichia coli (mutant type)

โดยปกติจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่ต้องการวิตามินบี 12 สำหรับการเจริญ แต่ E. coli ที่ใช้วิเคราะห์วิตามินบี 12 นี้ เป็น mutant strant 113-3 ซึ่งแยกโดย Davis and Mingioli (16) โดยใช้ ultraviolet E. coli (mutant) นี้ ไม่ตอบสนองต่อ deoxyribosides ต้องการ methionine และวิตามินบี 12 สำหรับการเจริญ แต่อย่างไรก็ตาม การตอบสนองต่อ methionine จะต่ำกว่าการตอบสนองต่อวิตามินบี 12 E. coli (mutant) สามารถตอบสนองต่อ Factor B หรือสารซึ่งคล้ายคลึงวิตามินบี 12 ซึ่งมี purine หรือ benzimnazole ในส่วน nucleotide side chain ได้ (40) นิยมใช้ E. coli (mutant) ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ด้วยวิธี plate assay หรือ agar diffusion assay ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ใช้ในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 40-250 ไมโครไมโครกรัมต่อลิตร ในรูป cyanocobalamin (40)

3) Euglena gracilis (mutant type)

Euglena gracilis var. bacillarus เป็น grean photosynthetic flagellate ซึ่งต้องการวิตามินบี 12 และ thiamine สำหรับการเจริญตอบสนองต่อวิตามินบี 12 และสารที่คล้ายคลึงวิตามินบี 12 ใช้เวลานานในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงไม่ค่อยนิยมมากนักในการใช้ Euglena gracilis สำหรับวิเคราะห์วิตามินบี 12 ปริมาณวิตามินบี 12 ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.3-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในรูป cyanocobalamin (40)

4) Ochromonas malhamensis

Ochromonas malhamensis เป็น photosynthetic chrysomonads ซึ่งตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ได้คล้ายคลึงกับสัตว์ชั้นสูง แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองหาวิตามินบี 12 ในอาหาร พบว่า O. malhamensis ให้ค่าวิตามินบี 12 มากกว่า L. leichmanii ซึ่งแสดงว่า O. malhamensis ตอบสนองต่อสารอย่างอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วย ในขณะที่ L. leichmanii ไม่ตอบสนอง (40) O. malhamensis สามารถตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ได้ดีมาก แม้ว่าปริมาณวิตามินบี 12 ในตัวอย่างจะมีเพียง 0.05 มิลลิไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็สามารถกระตุ้นการเจริญของ O. malhamensis ได้ (28) ปริมาณวิตามินบี 12 ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 0.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในรูปของ cyanocobalamin (40) การวิเคราะห์วิตามินบี 12 โดย O. malhamensis ไม่ใช้มากนัก เนื่องจากใช้เวลานาน 5-7 วัน สำหรับการวิเคราะห์ (40)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการ

1. น้ำทิ้ง

น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์นม ซึ่งได้รับจาก บริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด สำโรง จังหวัดสมุทรปราการ

การวิเคราะห์น้ำทิ้ง

- การวิเคราะห์ Crude protein โดยวิธี Semi-micro Kjiedahl method
- การวิเคราะห์ Total carbohydrate โดยวิธี Chenolic method
- การวัดค่า pH โดยใช้อีเลคโทรดแก้ว
- การวิเคราะห์ BOD โดยวิธี American Public Health Association

สารเคมีและการวิเคราะห์ Guide protein โดยวิธี Semi-micro kjiedahl method

สารเคมี (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2)

วิธีการวิเคราะห์

1. ปิเปตน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด digest tube
2. เติม Catalyst คือ K_2PO_4 5 กรัมและ $CuSO_4$ 0.1 กรัม
3. เติม H_2SO_4 เข้มข้น 10 มิลลิลิตร ใส่เศษกระเบื้อง เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง
4. ย่อยโปรตีนเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายใส
5. เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร
6. เติม NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร
7. ทำการกลั่นโดยเก็บแอมโมเนียในกรดบอริก 4 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งหยด screened methyl red indicator 2-3 หยด เป็นเวลา 5 นาที
8. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N. H_2SO_4
9. ทำการทดลองอีกครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง (blank)

หมายเหตุ : วิเคราะห์โดยการใช้ชุดวิเคราะห์ไนโตรเจน (Kjectec system 1002 distilling Unit)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณผล

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{W}$$

A : ปริมาณกรดที่ใช้ในการไตรเตรตสารตัวอย่าง

B : ปริมาณกรดที่ใช้ในการไตรเตรต blank

C : Normality ของกรดที่ใช้ไตรเตรต (ในที่นี้ = 0.1)

ค่า 1.4 : ค่า factor ในการหาไนโตรเจน

W : น้ำหนักของตัวอย่าง

% โปรตีน = % ไนโตรเจน x 6.25

สารเคมี และการวิเคราะห์ Carbohudrate

สารเคมี (ภาคผนวก ข. หมายเลข 1)

วิธีการ

1. เจือจางน้ำทิ้ง 1 , 1:10 , 1:1000 ส่วน
2. เติม Phenol 5 เปอร์เซนต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตรจนครบทุกหลอด
3. เติม H_2SO_4 เข้มข้น หลอดละ 5 มิลลิลิตร โดยแช่น้ำแข็งขณะเติมสาร
4. นำไปวัด O.D ที่ได้ไปอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.)

การคำนวณผล Carbohydrate

x : ความเข้มข้น Glucose ที่ได้จาก standard curve (ไมโครกรัมต่อลิตร)

น้ำทิ้ง 1 มิลลิกรัม มีปริมาณ Glucose $X \times 10^{-6}$ กรัม

" 100 " "-------" $X \times 10^{-6}$ x dilution factor กรัม

∴ % carbohydrate = $X \times 10^{-6}$ x dilution factor กรัม

สารเคมี และการวัดค่า pH โดยใช้อีเลคโทรดแก้ว

สารเคมี (ภาคผนวก ข. หมายเลข 3)

วิธีการ

1. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างอีเลคโทรดแก้ว และคาโลเมลอีเลคโทรดให้สะอาด ใช้กระดาษซับน้ำให้แห้ง
2. ปรับค่ามาตรฐานเครื่องมือด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีค่า pH ใกล้เคียงกับค่าตัวอย่างของน้ำที่จะวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างอีเลคโทรดอีกครั้ง ซับน้ำให้แห้ง

4. วัดค่า pH ของตัวอย่างน้ำ

<u>สารเคมีและการวิเคราะห์ BOD</u> (การวิเคราะห์โดย --> รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ง)

<u>สารเคมี</u> (ภาคผนวก ข. หมายเลข 4)

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. พิจารณาช่วง BOD จากตารางมาตรฐาน เพื่อให้ได้ค่าเปอร์เซนต์ตัวอย่างการเจือจาง โดยเราต้องทราบช่วง BOD ของสารตัวอย่างที่จะหาโดยคร่าว ๆ
2. เมื่อพิจารณาแล้วจะเลือกค่าเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางที่สูงกว่า และต่ำกว่าที่อยู่ติดกันอีก 2 ค่า ตามตาราง
3. นำไปเจือจางด้วยน้ำเจือจาง
4. รินใส่ขวด BOD 3 ขวด นำ 2 ขวดไปเก็บในตู้ 20 องศาเซลเซียส ส่วนที่เหลือนำมาหา DO. ทันที
5. ทำเช่นเดียวกัน สำหรับเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางที่ต่ำกว่าและสูงกว่า

หมายเหตุ : ในการวิจัยนี้ จะวิเคราะห์หา BOD ของน้ำทิ้งจากโรงงานที่ได้รับมา หา BOD ของน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่คัดเลือกแล้ว ก่อนและหลัง inoculate เชื้อ

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

D_1 : DO. โดยทันทีของตัวอย่างที่เจือจางแล้ว

D_2 : DO. ของตัวอย่างที่ทำการเจือจาง และบ่มที่ 20 องศาเซลเซียสในตู้มืดเป็นเวลา 5 วัน

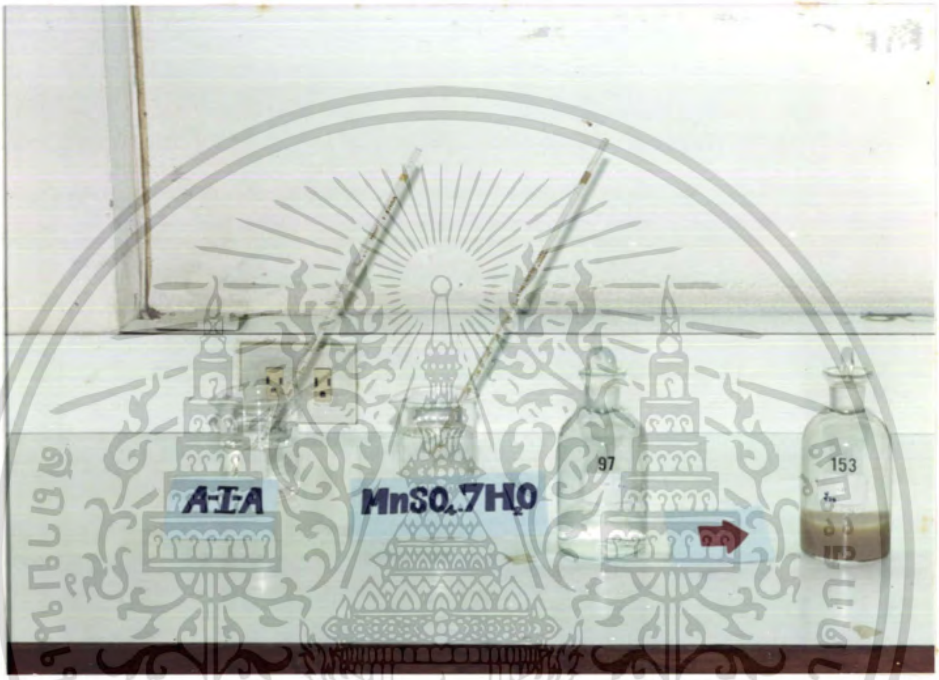
P : เปอร์เซนต์ตัวอย่างที่นำไปเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รูปที่ 1 การบ่มน้ำทิ้ง 5 วันในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

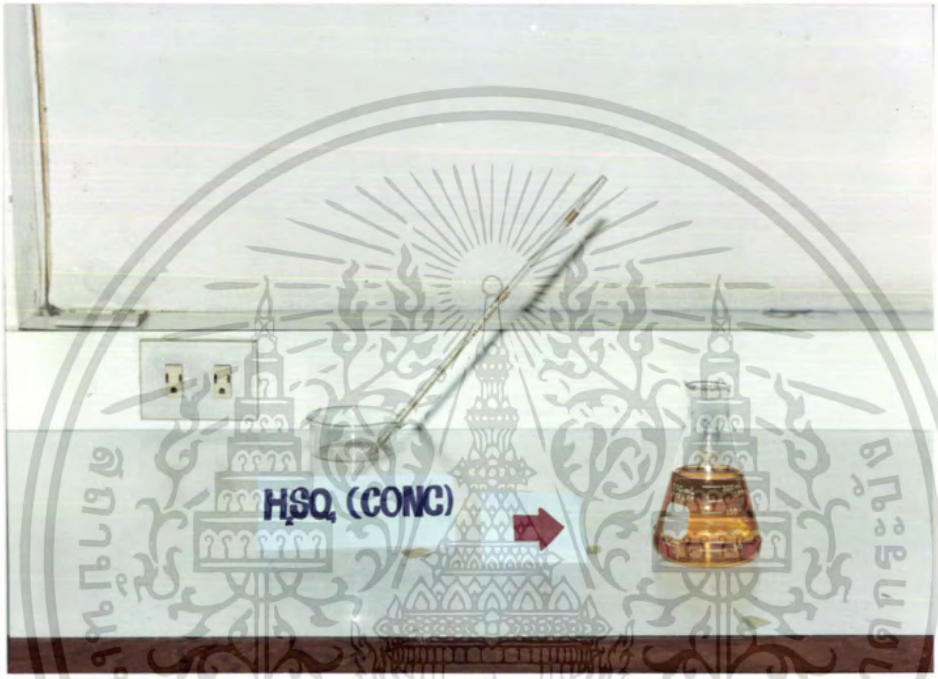


รูปที่ 2 การเติมสาร A-I-A และ $MnSO_4 \cdot 7H_2O$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

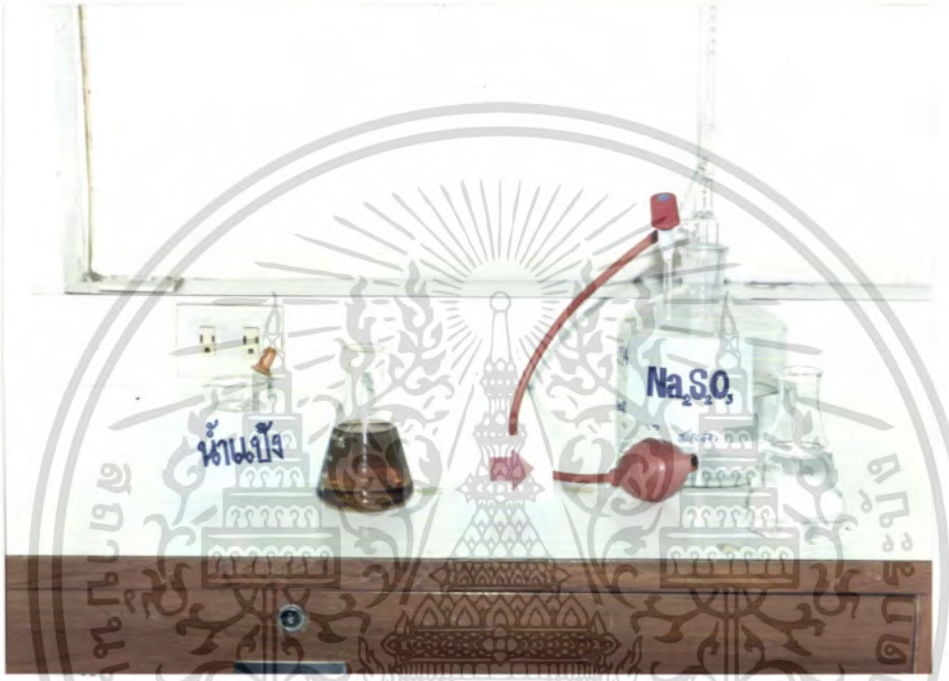
รูปที่ 3 การเตรียมน้ำสำหรับเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 การเติม H_2SO_4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 การไตเตรทหาปริมาณออกซิเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. จุลินทรีย์

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

Pseudomonas fluorescens TISTR 781 ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ lyophilization จากนั้นนำมาถ่ายเชื้อและเก็บในสภาพ stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน NA slant

บักเตรีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ได้แก่ Lactobacillus leichmanii ATCC 7830 ได้รับจาก The American type Culture Collection รัฐแมรีแลนด์ สหรัฐอเมริกา เก็บ stock culture ใน Tomato juice yeast extract milk agar โดยวิธี stab (3,4)

2.2 การตรวจสอบจุลินทรีย์ที่ได้รับ

เมื่อได้รับเชื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยมาแล้ว นำมาทำการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีการย้อมแกรม ดังนี้

1. เกลี่ยเชื้อ 1 ลูป ลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งแล้ว fix เชื้อโดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
2. หยด Crystal Violet ลงให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที
3. ล้างด้วย Gram Iodine แล้วหยดให้ท่วมทิ้งไว้ 1 นาที
4. ล้างด้วย Alcohol 95 % ไม่เกิน 20 วินาที แล้วล้างตามด้วยน้ำเปล่า
5. หยด Sarfranine O ให้ท่วมแล้วทิ้งไว้ 1 นาที
6. จากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่า
7. ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

Pseudomonas เป็นบักเตรีรูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ ไม่สร้าง endospore เคลื่อนที่โดยใช้ Polar flagella

Lactobacillus เป็นบักเตรีรูปท่อนสั้น ติดสีแกรมบวก

3. การคัดเลือกเชื้อ จากอัตราการเจริญ (Growth rate) และปริมาณเซลสูงสุด (Maximum growth)

คัดเลือกเชื้อระหว่าง Ps. fluorescens และ Ps. aeroginosa โดยใช้อาหาร NB เพื่อหาเชื้อที่สร้างเซลได้ปริมาณสูง เพื่อมาทำการใช้ในการวิเคราะห์วิตามิน B_{12} ต่อไป โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 6 stock เชื้อ Ps. fluorescens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 การเตรียม inoculum

เตรียม inoculum โดยถ่ายเชื้อ Pseudomonas sp. ซึ่งเจริญลงบน nutrient agar slant ลงในอาหารเหลว NB ซึ่งบรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ในปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำฟลาส์กเข้าเครื่องเขย่าแบบ gyratory ของ New Brunswic Scientific ใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 ชั่วโมง โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดความขุ่นของเชื้อเป็น optical-density (O.D.) ที่ความยาวช่วงคลื่นแสง 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ของ Coleman Junior II modal 6/35 ทำให้เชื้อเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ O.D. 0.5 ใช้ suspension นี้เป็น inoculum ในการทดลองแต่ละครั้ง

3.2 การวัด O.D ในช่วงเวลาต่างกัน

เตรียมอาหารที่จะศึกษาบรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาส์กละ 50 มิลลิลิตร inoculate ด้วย inoculum จากข้อ 1 ฟลาส์กละ 0.5 มิลลิลิตร ทำข้อสองซ้ำทุกการทดลอง นำฟลาส์กเข้าเครื่องเขย่าแบบ gyratory ของ New Brunswic Scientific, ความเร็ว 200รอบต่อนาที โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัด O.D. ที่ความยาวช่วงคลื่น 660 นาโนเมตร ทุก ๆ ชั่วโมง ใช้อาหารชนิดเดียวกันเป็น Blank ถ้า O.D. มากกว่า 1 ทำให้เจือจางลงจนได้น้อยกว่า 1 ด้วยน้ำกลั่น และทำ Blank ให้เจือจางในอัตราส่วนเดียวกัน

3.3 การเขียน growth curve

เขียน growth curve ระหว่างค่า O.D. ซึ่งเฉลี่ยจากสองซ้ำ และเวลา โดยใช้แกนตั้งเป็นค่า O.D. และแกนนอนเป็นค่าของเวลา

3.4 การเปรียบเทียบอัตราการเจริญ และปริมาณเซลสูงสุดของเชื้อทั้งสอง

พิจารณาจาก growthcurve ที่ได้ เชื้อที่มีอัตราการเจริญสูงกว่าจะได้ curve ที่ชันกว่าเข้าสู่ log phase ได้เร็วกว่า เชื้อที่มีปริมาณเซลสูงสุดนั้นสูงกว่า จะได้เส้น curve ที่สูงกว่าเส้น curve ของอีกเชื้อหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การหาปริมาณของน้ำหนักเซลแห้งของเชื้อที่คัดเลือกแล้ว

1. นำเอาอาหาร NB ที่ inoculate เชื้อ Pseudomonas fluorescens ไว้แล้ว 17 ชั่วโมง นำไปแบ่งปั่นในเครื่อง centrifuge (ภาคผนวก จ. หมายเลข) ที่ 4,000 รอบ 15 นาที

2. เทส่วนของเหลวที่เป็นอาหารทิ้งไป

3. รวบรวมเซลที่ได้มาทำเป็น suspension โดยน้ำกลั่น แล้วแบ่งปั่นในเครื่อง centriluae ที่ 4,000 รอบ 15 นาทีอีกครั้ง เป็นการล้างเซล ทำการล้างเซลทั้งหมด 3 ครั้ง

4. นำ suspension ที่สะอาดแล้วนี้มาใช้

5. นำไปวัด O.D. ค่าแรก แล้วปิเปตออกมา 3 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระทงฟลอยด์ 3 กระทงที่นำไปอบแห้งที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desicator แล้วชั่งจนได้น้ำหนักที่คงที่ แล้วใส่กระทงละ 10 มิลลิลิตร

6. นำไปอบที่ 180 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน desicator ทำซ้ำจนได้น้ำหนักที่แน่นอน

7. เติมน้ำกลั่นลงใน suspension ที่เหลือเท่าตัว เพื่อให้เจือจางลงครึ่งหนึ่ง

8. จากนั้นนำไปวัด O.D. แล้วปิเปตออกมา 3 ครั้ง ครั้งละ 10 มิลลิลิตร ใส่กระทงฟลอยด์ที่เตรียมไว้กระทงละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบ หาน้ำหนักแห้งของเซลที่แน่นอน ทำซ้ำเช่นนี้เพื่อทำการวัดหา O.D. และน้ำหนักแห้งที่ได้รวม 4 ค่า

9.นำค่าไปเขียน curve ระหว่างค่าO.D. และน้ำหนักเซลแห้ง โดยใช้แกนตั้งเป็น O.D. และแกนนอนเป็นปริมาณเซลแห้ง

ความสัมพันธ์ของ O.D. และน้ำหนักแห้งของเซลนี้ ใช้ในการรายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งของเซล เมื่อทราบค่า O.D. ในการวิจัย

5. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Pseudomonas ที่คัดเลือกได้

5.1 ศึกษาความต้องการแหล่ง Carbon และ แหล่ง Nitrogen

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Pseudomonas ที่คัดเลือกแล้วลงเลี้ยงใน อาหารต่าง ๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- น้ำทิ้ง
- น้ำทิ้ง + 0.25% yeast extract + 1% glucose
- น้ำทิ้ง + 0.25% yeast extract
- น้ำทิ้ง + 1% glucose
- NB

แล้ววัดค่า O.D. ทุก ๆ 2 ชั่วโมงโดยใช้ช่วงเวลาต่าง ๆ ดังนี้ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 (ใช้ช่วงเวลาเช่นนี้ในการศึกษาต่อไป) เพื่อศึกษาว่า แหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนรวมกับแหล่งไนโตรเจน วิธีใดจะช่วยเพิ่มการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยพิจารณาจาก Growth curve ที่ได้จากการใช้อาหารแต่ละชนิด ในที่นี้ใช้ Glucose เป็นแหล่งคาร์บอนและ Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน นำผลที่ได้มาทำการศึกษาต่อไป

5.2 ศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งเติม glucose 1 เปอร์เซนต์ และเติม yeast extract 0.25 , 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซนต์

5.3 ศึกษาปริมาณโคบอลท์ที่เหมาะสม

เปรียบเทียบการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. fluorescens ในน้ำทิ้งเติม glucose 0.1 เปอร์เซนต์ และ yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ และเติมโคบอลท์ในรูปเกลือโคบอลท์ซัลเฟต ($CoSO_4.7H_2O$) ปริมาณ 0, 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.4 ศึกษาอิทธิพลของ Choline chloride

เปรียบเทียบการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งเติม glucose 0.1 เปอร์เซนต์ yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ โคบอลท์ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม choline chloride ในปริมาณ 0, 0.1, 0.5, และ 1.5 เปอร์เซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 การกรองน้ำเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 8 การหาปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมของ Ps. fluorescens โดยเลี้ยงบนเครื่องเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 ศึกษาอิทธิพลของ glutamic acid

เปรียบเทียบการเจริญ และการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งเติม glucose 0.1 เปอร์เซนต์ yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ โคบอลท์ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม glutamic acid 0, 0.1, 0.5 และ 1.5 เปอร์เซนต์

6. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ในของเหลวที่ได้จากการหมักใช้วิธี Turbidmetric method of microbiological assay ใช้ Lactobacillus leichmannii (ATCC 7830) เป็น test organism และใช้ assay medium ซึ่งไม่มีวิตามินบี 12 ของ Difco มีเฉพาะสารที่สำคัญต่อการเจริญเท่านั้น (B_{12} Assay Medium USP for Lactobacillus)

6.1 การเตรียมเชื้อ Lactobacillus leichmannii (ATCC 7830)

ถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงในอาหาร tomato juice yeast extract milk agar (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1.2) โดยวิธี stab บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อต่อเนื่องกัน 7-10 ครั้งเพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพ Active

6.2 การเตรียม inoculum

ถ่ายเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1 ลงใน microinoculum broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง นำไปปั่นเซลให้ตกที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที รินน้ำใสทิ้ง ต้องทำในสภาพที่ปราศจากการปะปนของเชื้อ ล้างเซลไม่ให้มีวิตามินบี 12 ด้วย single strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วทำการล้าง 3 ครั้ง แล้วทำให้เจือจางเป็น 1:10 ด้วย assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จะได้ inoculate cell suspension ที่เหมาะสมในการ assay

6.3 การเตรียมสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.3 การเตรียมสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐาน

เตรียมวิตามินบี 12 stock standard โดยละลายผลึกวิตามินบี 12 (cyanocobalamin) ของ Merck, Sharp & Dohme 1 มิลลิกรัม และ KCN 1 กรัม ใน acetate buffer 0.1 M pH 4.6 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ดูดใส่ ampule 1 มิลลิลิตร หลอมปลาย ampule ให้ติดกัน ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้ในตู้เย็น stock solution มีวิตามินบี 12 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมวิตามินบี 12 working standard โดยเปิด ampule ดูด stock solution มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายนี้มา 0.1 มิลลิลิตร เติม KCN 0.05 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ working standard ที่มีวิตามินบี 12 อยู่ 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.4 การเตรียมเครื่องแก้วที่ใช้

เครื่องแก้วที่จะใช้ในการ assay วิตามินบี 12 ต้องแช่ใน cleaning solution 6-12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปาให้หมดกรด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ทำให้แห้ง นำเข้าตู้อบ 180 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

6.5 การเตรียมตัวอย่างที่จะวิเคราห์

pipette fermentation liquor ของ Ps. fluorescens TISTR 781 ที่ได้จากการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ มา 10 มิลลิลิตร เติม buffer cyanide solution 1 มิลลิลิตร (0.01 เปอร์เซนต์ KNC + 0.1 M acetate buffer pH 4.6) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บ supernate ไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้อ โปรตีนของ sample จะถูก denatured จะปล่อย cobalamin ออกมาจากเซล และเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin ใน supernatant เจือจางสารละลาย sample ด้วย glass-distilled water เพื่อให้ปริมาณวิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้ โดยเจือจางในอัตราส่วน 1, 1:10, 1:100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 9 การเลี้ยง Ps. fluorescens ใน NB และในน้ำทิ้งแหล่งอาหาร เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ B_{12} ที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 10 B_{12} Stock Standard in Ampule

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 11 วิธีการเตรียม B_{12} Working Standard

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.6 วิธีการวิเคราะห์วิตามินบี 12

การทำ standard calibration curve ดูด working standard ของวิตามินบี 12 ที่มีวิตามินบี 12 อยู่ 5 x 10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ใน assay tube ในปริมาณ 0.0, 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิลิตร แต่ละหลอดเจือจางให้เป็น 1.5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติม assay medium 1.5 มิลลิลิตร จะได้ปริมาตรรวม3มิลลิลิตรทำ 2 ชุดเขย่าให้เข้ากัน ใส่ rack หุ้มปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

สำหรับตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ ดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้จากข้อ 5 ใส่ใน assay tube ในปริมาณ 0.2, 0.5 และ 1 มิลลิลิตร เจือจางเป็น 1.5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติม assay medium หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวมเป็น 3 มิลลิลิตร ทำ 2 ชุด ผสมให้เข้ากัน ใส่ rack ปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

นำ standard assay tube และ sample assay tube ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 5 นาที ทำให้เย็นทันที

ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12 ทุกครั้ง จะต้องทำ standard curve พร้อมกันไปด้วยทุกครั้ง เนื่องจากสภาพของการ autoclave และอุณหภูมิที่ใช้บ่มเชื้อจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อ

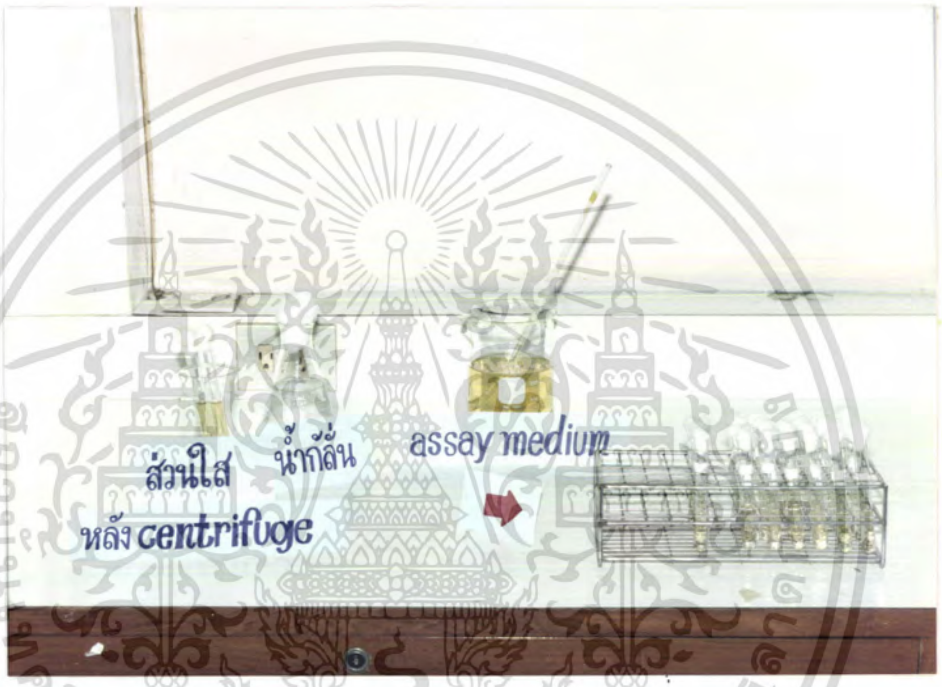
6.7 การ inoculate เชื้อ L.Leichmannii (ATCC 7830)

inoculate เชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ลงใน standard assay tube และ sample assay tube ในข้อ 6.6 หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ใช้ long tip pipette ยกเว้นหลอดที่ใช้เป็น blank บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

6.8 การวัดความเจริญของ L.leichmanni (ATCC 7830)

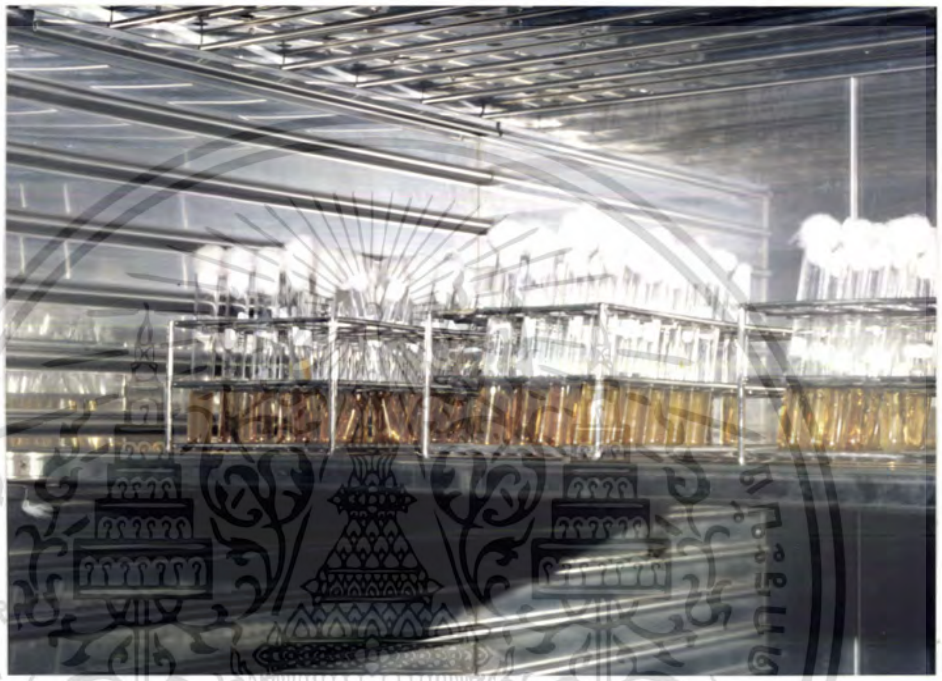
วัดการเจริญของ L.leichmanni (ATCC 7830) โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่อง sprctrophotometer ของ Coleman model 6/35 ความยาวช่วงคลื่น 660 นาโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 การเตรียมปริมาณ B_{12} ที่สร้างได้จาก Ps. fluorescens เพื่อการอ่านค่าโดยวิธี Microbioassay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 การบ่ม Lactobacillus leichmannii ในตู้บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 40 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมตร หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 40 ชั่วโมง

6.9 การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12

ปริมาณวิตามินบี 12 หาได้จาก calibration curve และสูตร

ปริมาณวิตามินบี 12 = ค่าเฉลี่ยวิตามินบี 12 x dilution factor

(10^{-6} ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตรตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลและวิจารณ์ผล

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำทิ้ง

ผลการวิเคราะห์ Cruce protein

จากการวิเคราะห์ผลตามวิธี Semi - micro Kjiedahl method ได้ผลดังนี้

ปริมาณของกรดซัลฟุริกที่ใช้ในการไตเตรตสารละลายตัวอย่าง = 1.13 มิลลิลิตร

ปริมาณของกรดซัลฟุริกที่ใช้ในการไตเตรต blank = 0.22 มิลลิลิตร

น้ำหนักของสารละลายตัวอย่าง = 1 กรัม

การคำนวณ

เปอร์เซนต์ไนโตรเจน = 0.132

เปอร์เซนต์โปรตีน = 0.132 x 6.25

แสดงว่าในน้ำทิ้งที่รับมานั้นมีโปรตีนสำหรับเป็นแหล่งอาหารให้จุลินทรีย์ 0.83 %

ผลการวิเคราะห์ total carbohydrate

จากการวิเคราะห์ผลตามวิธี Phenolic

ได้ค่า O.D. จากการหา Total carbohydrate จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง ได้ค่า 0.37 และ 0.23 ตามลำดับ เมื่อทำการเฉลี่ยได้ 0.30 เมื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตราฐานกลูโคสจะได้ค่า 25 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

X = ความเข้มข้น Glucose ที่ได้จาก standard curve

เปอร์เซนต์ carbohydrate = X x 10^{-3} x dilution factor

= 25 x 10^{-3} x 10^{2} x 10^{-2}

= 25 x 10^{-3} g/l =0.025 g/l

หรือ = 0.25 %

ผลการวิเคราะห์หาค่าpH

เป็นการวิเคราะห์หาค่า pH โดยใช้อิเล็คโทรด ซึ่งผล pH นั้นเท่ากับ 6.55

ผลการวิเคราห์หาค่า BOD

โดยใช้วิธี American Public Health Association จากข้อมูลที่ได้รับจากโรงงานนั้น BOD = 6.60 มิลลิกรัม/ลิตร

- ผลการหา BOD ของน้ำทิ้งที่ได้รับจากโรงงาน

การวิเคราะห์ชุดที่	เปอร์เซนต์ของตัวอย่างที่ใช้	ปริมาณ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ (มิลลิลิตร)		ปริมาณ DO ที่ลดลง (มิลลิลิตร)
		ก่อนปม (D_1)	ค่าเฉลี่ยหลังปม (D_2)	
1	0.02	8.2	7.3	0.9
2	0.05	8.0	6.2	1.8
3	0.10	8.0	5.8	2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

การพิจารณาเลือกค่าเพื่อคำนวณผล BOD ให้ถูกต้อง จะต้องมีค่าปริมาณ DO เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลลิกรัม/ลิตร และต้องมีการลดปริมาณ DO ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัม/ลิตร และให้เลือกค่าที่ทำการเจือจางสูงสุด จะได้ค่า BOD ที่คำนวณออกมาถูกต้องที่สุด

ในที่นี้ เลือกค่าการวิเคราะห์ชุดที่ 3 ใช้เปอร์เซนต์ตัวอย่างใช้ 0.1เปอร์เซนต์ ค่าปริมาณ $Na_2S_2O_3$ ก่อนปม 8.0 มิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยของปริมาณ $Na_2S_2O_3$ 5.8 มิลลิลิตร ได้ปริมาณที่ DO ลดลง คือ 2.2 มิลลิลิตร

$$\text{ค่า BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(2.2) \times 100}{0.1}$$

$$= 2200$$

ดังนั้น BOD ที่เป็นสค่าเริ่มต้นของน้ำทิ้งที่นำมาทำการวิจัย คือ 2200 มิลลิกรัม/ลิตร

- ผลการหา BOD ของน้ำทิ้งเมื่อเติมสารอาหารที่เหมาะสมแก่การเจริญของ Pseudomonas fluorescens

การวิเคราะห์ชุดที่	เปอร์เซนต์ของตัวอย่างที่ใช้	ปริมาณ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ (มิลลิลิตร)		ปริมาณ DO ที่ลดลง (มิลลิลิตร)
		ก่อนปม (D_1)	ค่าเฉลี่ยหลังปม (D_2)	
1	0.01	8.2	6.4	1.8
2	0.02	7.8	5.4	2.4
3	0.05	7.8	5.9	1.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกใช้ค่าการทดลองชุดที่ 2 ใช้เปอร์เซนต์และตัวอย่างที่ใช้ 0.02 เปอร์เซนต์ ปริมาณ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ก่อนบ่ม 7.8 มิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยหลังบ่ม 5.4 มิลลิลิตร

$$\text{ค่า BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(\quad 2.4 \quad) \times 100}{0.02}$$

$$= 12,000$$

ดังนั้นค่า BOD ของน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารแล้ว คือ 12,000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจะเห็นว่าค่า BOD เพิ่มขึ้น

- ผลการหา BOD ของน้ำทิ้งหลังการใช้เลี้ยง Ps. fluorescens เพื่อการ assay วิตามิน B_{12}

การวิเคราะห์ชุดที่	เปอร์เซนต์ของตัวอย่างที่ใช้	ปริมาณ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้(มิลลิลิตร)		ปริมาณ DO ที่ลดลง (มิลลิลิตร)
		ก่อนปม (D_1)	ค่าเฉลี่ยหลังปม (D_2)	
1	0.10	8.0	6.2	1.8
2	0.20	8.0	5.3	1.3
3	0.50	7.8	5.9	1.9

เลือกใช้ค่าการทดลองชุดที่ 2 ใช้เปอร์เซนต์และตัวอย่างที่ใช้ 0.2 เปอร์เซนต์ ปริมาณ $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ก่อนปม 8.0 มิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยหลังปม 5.8 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ค่า BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(\ 2.3\ ) \times 100}{0.2}$$

$$= 1{,}100$$

ดังนั้นค่า BOD ของน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารแล้ว คือ 1,100 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งจะเห็นว่าลดลงจากเดิมมาก

2. จุลินทรีย์

- ผลการคัดเลือก Pseudomonas aeroginosa และ Pseudomonas fluorescens

จากการคัดเลือกเชื้อโดยการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ Pseudomonas ทั้งสองในอาหาร NB และเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุดของทั้งสองพบว่า

Pseudomonas aeroginosa มีค่า O.D. สูงสุดคือ 0.68 เวลาที่เจริญได้สูงสุด คือ ชั่วโมงที่ 16

Pseudomonas fluorescens นั้นมีค่า O.D. สูงสุดคือ 0.835 เวลาที่เจริญสูงสุด คือ ชั่วโมงที่ 17

จึงพิจารณาเลือก Ps. fluorescens เป็นเชื้อที่ใช้สำหรับทำการวิจัยในการผลิตวิตามิน B_{12} ต่อไป เนื่องจากมีอัตราการเจริญสูงกว่า Ps. aeroginosa

- ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเซลจากเชื้อที่ได้รับการคัดเลือกและน้ำหนักเซลแห้ง

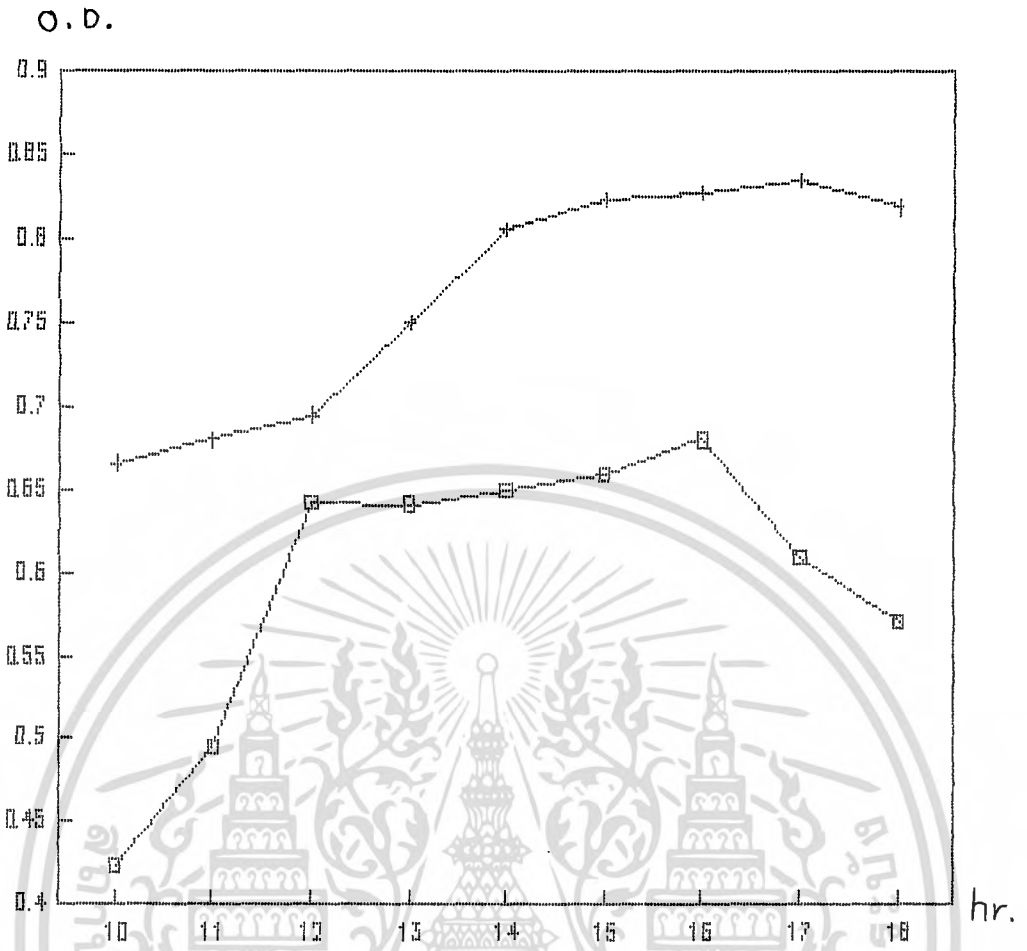
จากกราฟความสัมพันธ์ที่สร้างขึ้นจะพบว่า Ps. fluorescens ที่ค่า O.D. สูงสุด 0.835 ได้น้ำหนักเซลแห้ง 0.78 กรัม/ลิตร และจากกราฟจะพบว่า ค่า O.D. สูงขึ้น จะได้น้ำหนักเซลแห้งสูงขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์แปรผันโดยตรงต่อกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการเจริญเปรียบเทียบระหว่าง Pseudomonas aeroginosa และ Ps. fluorescens

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่วัดได้	
หาการวัด	Pseudomonas aeroginosa	Ps. fluoreseens
10	0.423	0.666
11	0.495	0.680
12	0.642	0.695
13	0.641	0.750
14	0.650	0.806
15	0.660	0.823
16	0.680	0.828
17	0.609	0.835
18	0.571	0.819

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจริญระหว่าง Pseudomonas aeroginsa และ Pseudomonas fluorescens

□ แสดงอัตราการเจริญของ Ps. aeroginsa

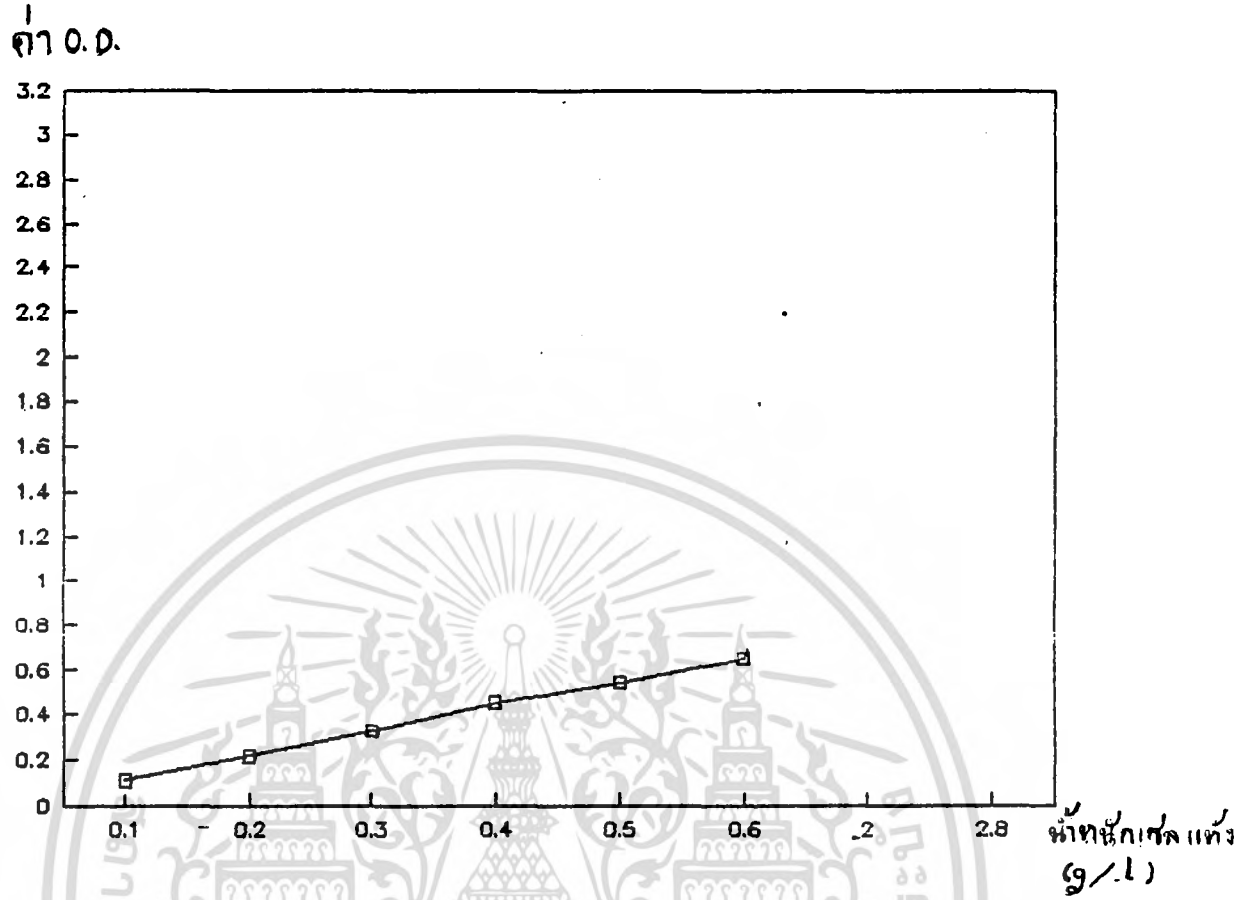
\+ แสดงอัตราการเจริญของ Ps. fluorescens

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ความขุ่นของเชื้อ (O.D. ที่ 660 นาโนเมตร) กับน้ำหนักเซลแห้ง (dry weight กรัมต่อลิตร)

ค่า O.D.ที่วัดได้	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/10 มิลลิลิตร)	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร)
0.700	0.0063	0.63
0.385	0.0037	0.37
0.195	0.0019	0.19
0.100	0.0009	0.09
0.054	0.0006	0.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่น กับ น้ำหนักเซลแห้ง (กรัม/ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลของการเปรียบเทียบความต้องการแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเลี้ยง Ps. fluoreseens ลงในน้ำทิ้งและน้ำทิ้งเติมสารอาหารต่าง ๆ ได้ผลดังนี้

- เลี้ยงในน้ำทิ้ง จะได้ค่า O.D. สูงสุดที่ 0.496 ได้ปริมาณเซลแห้ง 0.47 กรัม/ลิตร เมื่อชั่วโมงที่ 18
- เลี้ยงในน้ำทิ้งเติม Yeast extract 0.25 เปอร์เซนต์และ Glucose 1 เปอร์เซนต์ ได้ค่า O.D. สูงสุด 0.164 ได้ปริมาณเซลแห้ง 0.15 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 20
- เลี้ยงในน้ำทิ้งเติม Yeast extract 0.25 เปอร์เซนต์ ได้ค่า O.D. สูงสุด 1.484 ได้ปริมาณเซลแห้ง 1.38 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 16
- เลี้ยงในน้ำทิ้งเติม Glucose 1 เปอร์เซนต์ ได้ค่า O.D. สูงสุด 0.249 ได้ปริมาณเซลแห้ง 0.24 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18
- เลี้ยงใน NB ได้ O.D. สูงสุดที่ 0.835 ได้ปริมาณเซลแห้ง 0.78 กรัมต่อลิตร

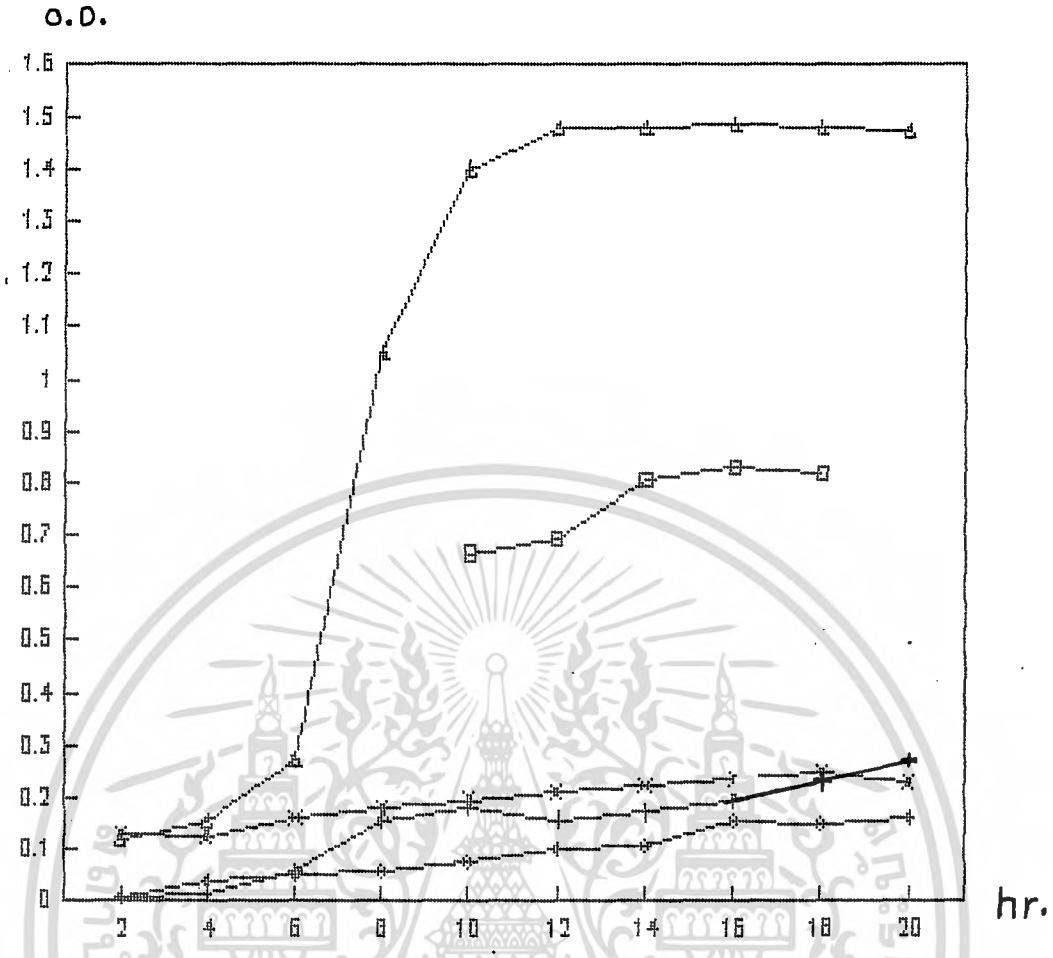
เมื่อพิจารณาจากกราฟที่ 16 นั้น จะเห็นว่า Ps. fluorescens นั้นสามารถเจริญได้ในน้ำทิ้งที่ได้รับจากโรงงานที่ผลิตผลิตภัณฑ์นมและเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์โบไฮเดรตให้จะช่วยเสริมให้ Ps. fluorescens นั้นเจริญได้ดีขึ้น โดยเฉพาะการเพิ่มแหล่งไนโตรเจน แสดงว่า Ps. fluorescens นั้นจะเจริญในน้ำทิ้งได้ดีขึ้นถ้าเพิ่มแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์โบไฮเดรต แต่เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งเติม Yeast extrace 0.25 เปอร์เซนต์ร่วมกับ Glucose 1 เปอร์เซนต์ ผลกลับทำให้การเจริญลดลง แสดงว่า Yeast extract และ Glucose นั้นมีผลร่วมกันต่อการเจริญของ Ps. fluorescensแต่ปริมาณความเข้มข้นที่ใช้นั้นอาจยังไม่เหมาะสม จึงทำการหาปริมาณของ Yeast extract และ Glucose ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB, น้ำทิ้ง , น้ำทิ้งเติม 0.25 % Yeast extract และ 1 % Glucose , น้ำทิ้งเติม 0.25 % Yeast extract , น้ำทิ้งเติม 1 % Glucose

ชั่วโมงที่	ค่าความขุ่นเหี่ยวัดแสง (O.D. 660 nm.)				
	NB	น้ำทิ้ง	น้ำทิ้งเติม 0.25% Yeast extract 1% Glucose	น้ำทิ้งเติม 0.25% Yeast extract	น้ำทิ้งเติม 1% Glucose
2	-	0.009	0.007	0.119	0.129
4	-	0.016	0.039	0.154	0.138
6	-	0.055	0.053	0.273	0.164
8	-	0.154	0.055	1.053	0.178
10	0.666	0.179	0.077	1.402	0.196
12	0.695	0.159	0.100	1.480	0.214
14	0.806	0.172	0.104	1.482	0.226
16	0.828	0.195	0.155	1.484	0.236
18	0.819	0.248	0.148	1.480	0.249
20	-	0.255	0.164	1.475	0.229

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงกราฟความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของ Ps. fluorescens ในอาหารน้ำทิ้ง, น้ำทิ้งเติม 0.25% Yeast extract และ 1% Glucose, น้ำทิ้งเติม 0.25% Yeast extract, น้ำทิ้งเติม 1% Glucose, NB

\+ น้ำทิ้ง

◇ น้ำทิ้งเติม 0.25% Yeast extract และ 1% Glucose

△ น้ำทิ้งเติม 0.25% Yeast extract

× น้ำทิ้งเติม 1% Glucose

□ NB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลการศึกษาปริมาณไนโตรเจนและแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสม

จากข้อ 3 นั้นทำให้รู้ว่า เมื่อเติมแหล่งคาร์โบไฮเดรตและแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ Ps. fluorescens มีอัตราการเจริญสูงขึ้น แต่ปริมาณความเข้มข้นของทั้งสองแหล่งยังไม่เหมาะสมจึงทำการหาปริมาณที่เหมาะสมดังนี้

4.1. ผลการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งเติม Glucose 1 เปอร์เซนต์ และเติม Yeast extract ปริมาณต่าง ๆ กันคือ 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 เปอร์เซนต์ จะพบว่าอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ ได้ O.D. สูงสุด คือ 0.3725 ได้น้ำหนักเซลแห้ง 0.37 กรัม/ลิตร ที่ 18 ชั่วโมง แสดงว่าปริมาณ Yeast extract ที่เหมาะสมในการวิจัยครั้งนี้เท่ากับ 1.5 เปอร์เซนต์ แล้ว ใช้ปริมาณนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Glucose ที่เหมาะสมต่อไป แต่ปริมาณที่เหมาะสมนี้ก็ยังให้ค่า O.D. ที่ต่ำกว่าเลี้ยงใน NB

4.2. ผลการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

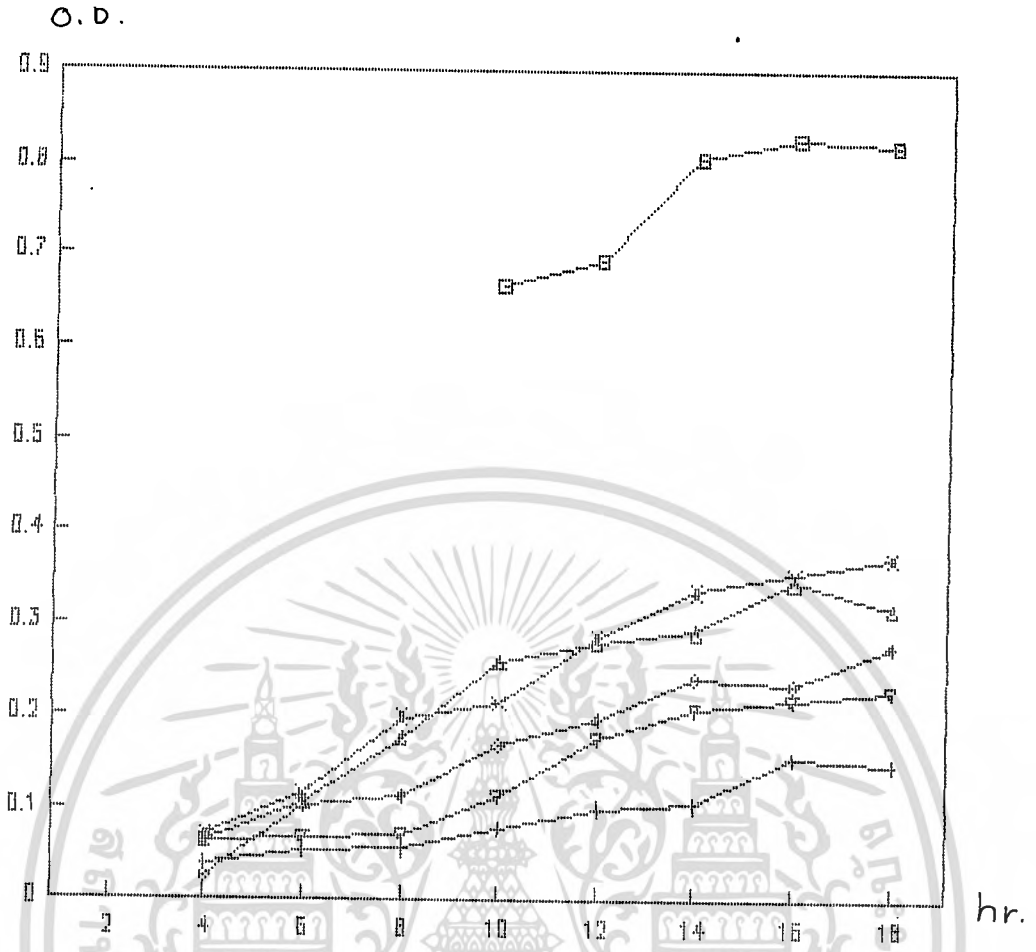
ผลการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญ Ps. flurescens ในน้ำทิ้งเติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ และเติม Glucose ในปริมาณต่าง ๆ คือ 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 เปอร์เซนต์ พบว่าอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม Glucose ปริมาณ 0.1 เปอร์เซนต์ ได้ O.D. 2.233 ซึ่งได้น้ำหนักเซลแห้งเท่ากับ 2.08 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 และมีการเจริญที่สูงกว่าในการเลี้ยงใน NB คือ เมื่อเติม Glucose 0.1 และ 0.2 เปอร์เซนต์ และใช้ปริมาณ Glucose 0.1 เปอร์เซนต์ ในการทำการวิจัยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาล Glucose 1 % และ เติม Yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	ค่าความขุ่นที่วัดได้ (O.D. 660 nm.)					
	NB	ปริมาณ Yeast extract (%)				
		0.25%	0.5%	1%	1.5%	2%
2	-	-	-	-	-	-
4	-	0.039	0.024	0.063	0.0715	0.0622
6	-	0.053	0.103	0.105	0.1145	0.0677
8	-	0.055	0.113	0.174	0.1975	0.070
10	0.666	0.077	0.168	0.258	0.2145	0.1127
12	0.695	0.100	0.196	0.280	0.2865	0.1757
14	0.806	0.104	0.2425	0.292	0.3375	0.2077
16	0.828	0.155	0.234	0.348	0.355	0.2077
18	0.819	0.148	0.275	0.317	0.3725	0.2267

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1 % และเติม Yeast extract ในปริมาณ ต่าง ๆ

□ NB

\+ Yeast extract 0.25%

◇ Yeast extract 0.5%

△ Yeast extract 1%

× Yeast extract 1.5%

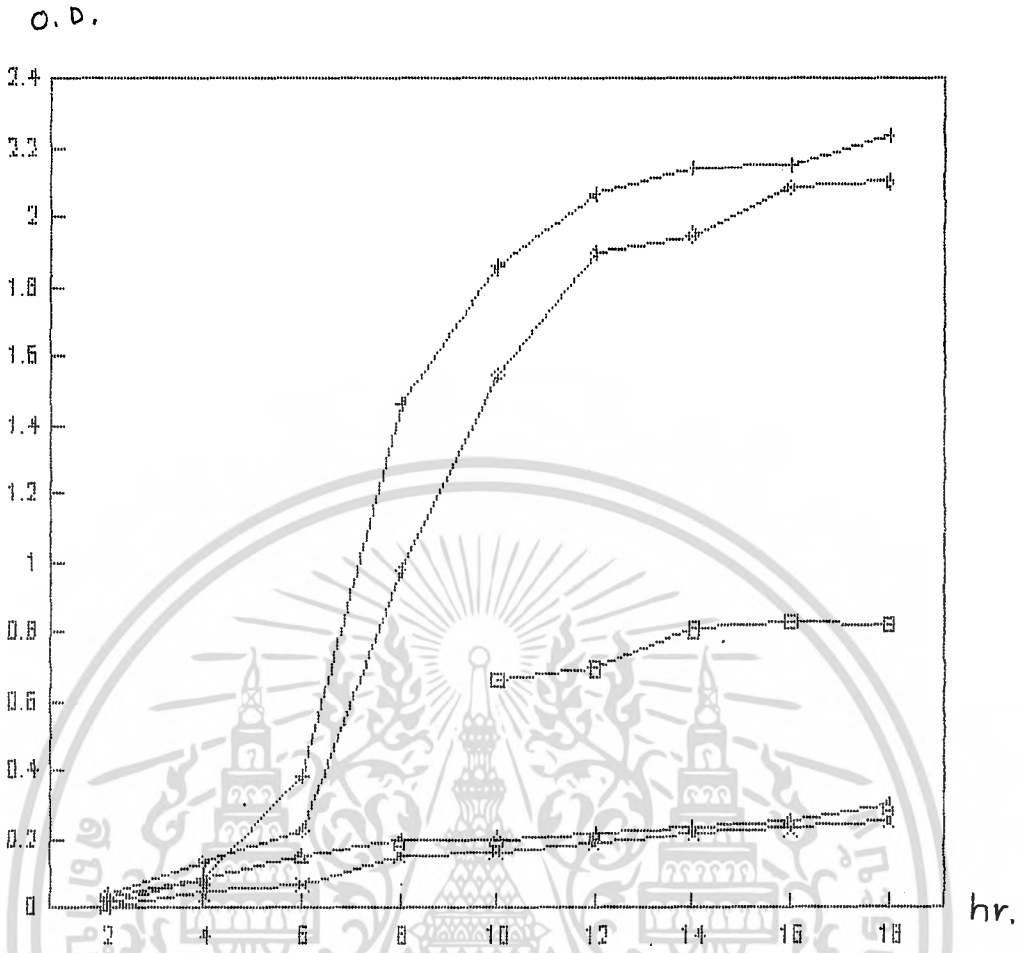
▽ Yeast extract 2.0%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เลี้ยงใน NB และเมื่อเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract และ เติม Glucose ในปริมาณต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	ค่าความขุ่นที่วัดได้ (O.D. 660 nm.)				
	NB	ปริมาณกลูโคส (%)			
		0.1%	0.2%	0.5%	1%
2	–	0.026	0.039	0.009	0.003
4	–	0.095	0.130	0.087	0.045
6	–	0.380	0.224	0.148	0.070
8	–	1.463	0.981	0.197	0.153
10	0.666	1.857	1.546	0.201	0.160
12	0.695	2.067	1.898	0.212	0.185
14	0.806	2.144	1.949	0.233	0.220
16	0.828	2.150	2.082	0.255	0.230
18	0.819	2.233	2.100	0.301	0.254

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract และเติม Glucose ในปริมาณต่าง ๆ

□ NB

\+ Glucose 0.1 %

◇ Glucose 0.2 %

△ Glucose 0.5 %

× Glucose 1.0 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลที่ออกมาทำให้รู้ว่าน้ำทิ้งที่นำมานั้นสามารถเลี้ยง Ps. flurescens ได้ และจะเลี้ยงได้เซลล์ขึ้นเมื่อเติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ ร่วมกับ Glucose 0.1 เปอร์เซนต์ จะเห็นว่า Ps. fluorescens ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งต้องการ Yeast extract เพื่อให้ได้เซลสูงแต่ต้องการ Glucose ในปริมาณที่ต่ำ ถ้าสูงจะทำให้เซลลดลงอาจเป็นเพราะการมีน้ำตาลปริมาณมากเกินไป มีผลต่อแรงดันออสโมซีสของเซลแต่ก็ขาด Glucose ไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. ผลการศึกษาปริมาณโคบอลท์ที่เหมาะสม

โคบอลท์ เป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญมาก ต่อการสังเคราะห์วิตามินบี 12 เนื่องด้วยเป็นแร่ธาตุที่เชื่อมระหว่าง 4 pyrrole ring ของ porphyrin - like planar group จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะตอบสนองต่อโคบอลท์ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยทั่วไป การให้โคบอลท์นิยมให้ในรูปเกลือคลอไรด์ เกลือซัลเฟท หรือเกลือไนเตรท

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญ เมื่อเติมโคบอลท์ในรูปเกลือโคบอลท์ซัลเฟต ($CoSO_4 . 7 H_2O$) ในปริมาณ 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิกรัม/ลิตร ในน้ำทิ้งที่เติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ และ Glucose 0.1 เปอร์เซนต์ จะเห็นว่า โคบอลท์ในปริมาณ 0, 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิกรัม/ลิตร จะได้ปริมาณเซลสูงสุดใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาคัดเลือกปริมาณที่ให้เซลสูงสุด คือ 8 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งได้ O.D. 2.354 น้ำหนักเซลแห้ง 2.19 กรัม/ลิตร และใช้เป็นปริมาณสำหรับการวิจัยต่อไป และเมื่อเทียบกับ NB นั้นจะได้ว่าน้ำทิ้งเติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์, Glucose 0.1 เปอร์เซนต์ และโคบอลท์ นั้นให้อัตราการเจริญที่สูงกว่า

4.4. ผลการศึกษาปริมาณ Choline

Choline จัดเป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มของวิตามินบี Demain (24) รายงานว่า Choline สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. denitrificans นอกจากนี้ Choline ยังสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ (58)

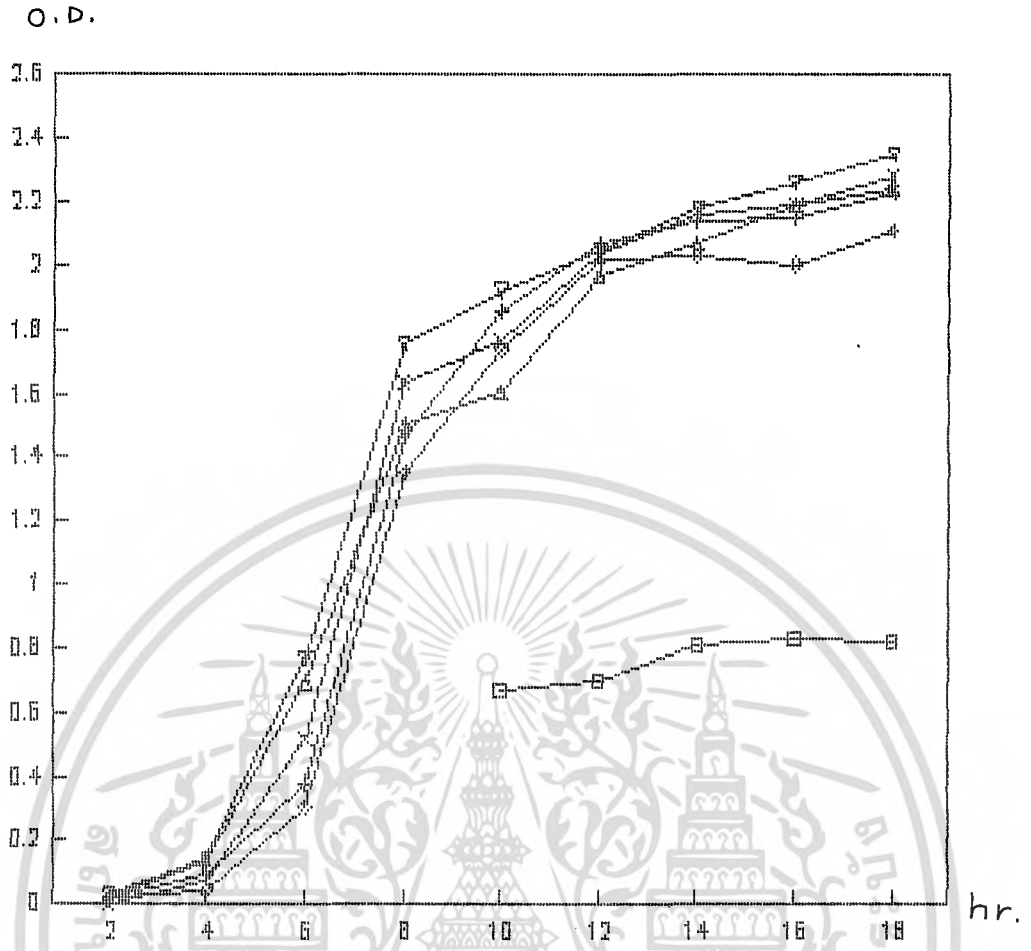
จากเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens ในอาหารที่มี Choline Chloride ในปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 เปอร์-เซนต์ ในอาหารจะพบว่าเมื่อเติม Chline Chloride ปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ จะได้ปริมาณเซลสูงสุด คือ ค่า O.D. 2.670 น้ำหนักเซลแห้ง เท่ากับ 2.49 มิลลิกรัม/ลิตร และเมื่อเทียบกับ NB แล้วจะพบว่า Choline Chloride กระตุ้นให้ได้ปริมาณเซลสูงขึ้นกว่าที่เลี้ยงใน NB ทุกปริมาณของ Choline Chloride จะให้อัตราการเจริญสูงกว่าที่เลี้ยง Ps. fluorescens ใน NB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract, 0.1 % Glucose และ เติม Cobalt ในปริมาณต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	ค่าความขุ่นที่วัดได้ (O.D. 660 nm.)						
	NB	ปริมาณ cobalt (mg/l)					
		0	2	4	6	8	10
2	-	0.026	0.022	0.022	0.003	0.034	0.022
4	-	0.095	0.042	0.129	0.075	0.145	0.191
6	-	0.380	0.305	0.693	0.519	0.769	0.556
8	-	1.463	1.358	1.504	1.638	1.759	1.73
10	0.666	1.857	1.740	1.505	1.766	1.923	1.987
12	0.695	2.067	2.021	1.971	2.035	2.045	1.932
14	0.806	2.144	2.028	2.068	2.164	2.185	2.146
16	0.828	2.150	2.004	2.195	2.194	2.262	2.254
18	0.819	2.233	2.11	2.238	2.278	2.354	2.316

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract , 0.1 % Glucose และเติม cobalt ในปริมาณต่าง ๆ

□ NB

◇ Cobalt 2 mg/l

△ Cobalt 4 mg/l

× Cobalt 6 mg/l

▽ Cobalt 8 mg/l

+ Cobalt 10 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ได้ปริมาณเซลสูงขึ้นกว่าที่เลี้ยงใน NB ทุกปริมาณของ Choline Chloride จะให้อัตราการเจริญสูงกว่าที่เลี้ยง Ps. Fluorescens ใน NB

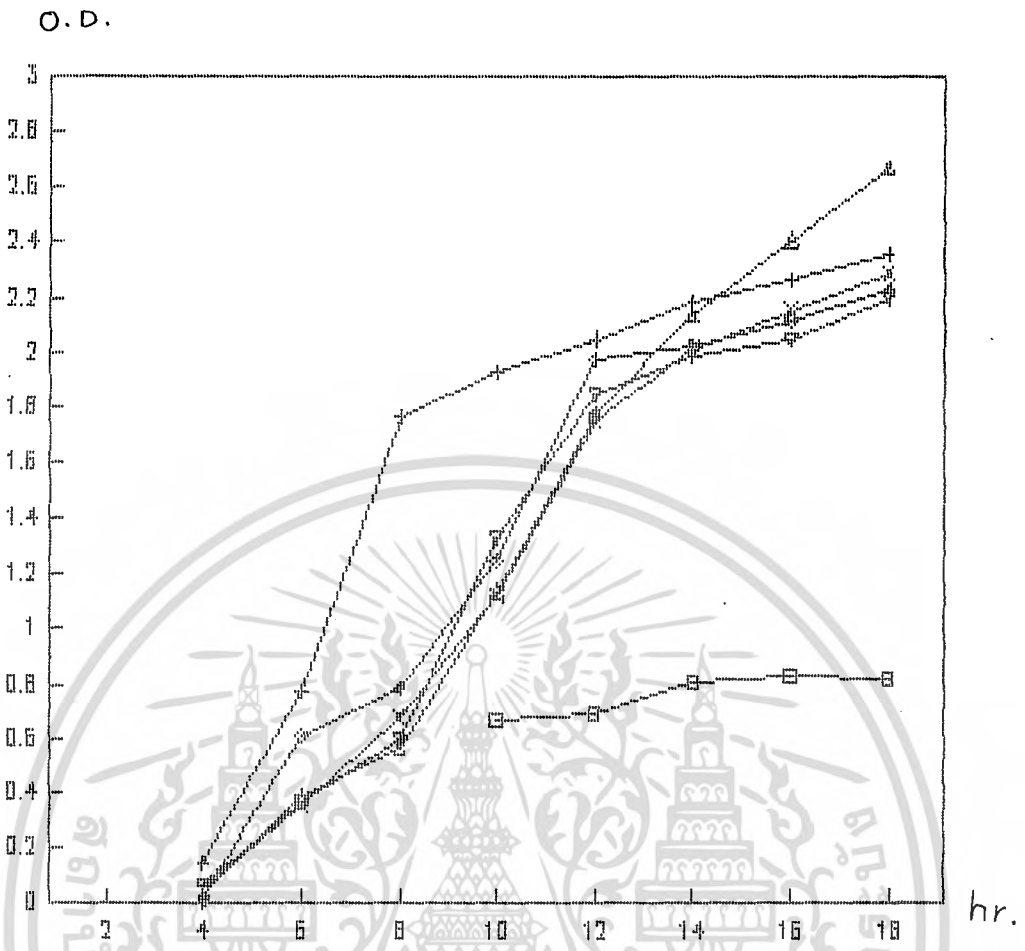
จากการทดลองจะเห็นได้ว่า Choline Chloride สามารถกระตุ้นการเจริญและการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. fluorescens An 91 ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจาก Choline มีคุณสมบัติในด้านการให้ methyl group (12) หรือมีคุณสมบัติด้านเป็น growth factor แต่อย่างไรก็ตามบทบาทที่แท้จริงของ Choline นั้น ยังไม่เป็นที่พิสูจน์อย่างแน่ชัด ถึงแม้ว่า Valecia ได้รายงานว่า methionine, betaine และ Choline สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ใน Streptomyces olivaceus แต่ Bray and Shemin รายงานว่า 6 methyl group ของ corrin ring ซึ่งเป็นแกนกลางโครงสร้างของวิตามินบี 12 ใน Streptomyces sp. ได้จาก methionine สำหรับ methyl group ของ betaine และ choline นั้น ไม่พบในส่วน corrin ring ของวิตามินบี 12 ซึ่ง Valencia กล่าวว่า ความสามารถของสารประกอบเหล่านี้ในการกระตุ้นการสังเคราะห์วิตามินบี 12 อาจขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract, 0.1 % Glucose , Cobalt 8 mg/l และเติม Choline chloride ในปริมาณต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	ค่าความขุ่นที่วัดได้ (O.D. 660 nm.)					
	NB	ปริมาณ choline chloride (%)				
		0	0.1	0.5	1	1.5
2	–	–	–	–	–	–
4	–	0.145	0.01	0.023	0.047	0.063
6	–	0.769	0.261	0.382	0.357	0.361
8	–	1.759	0.78	0.560	0.682	0.592
10	0.666	1.923	1.251	1.140	1.127	1.330
12	0.695	2.048	1.977	1.770	1.752	1.842
14	0.806	2.185	2.015	2.135	2.013	1.985
16	0.828	2.262	2.117	2.410	2.152	2.041
18	0.819	2.354	2.233	2.670	2.292	2.190

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract , 0.1 % Glucose , โคบอลท์ 8 mg/l และเติม choline cholride ในปริมาณต่าง ๆ

□ NB

\+ Choline cholride 0 %

◇ Choline cholride 0.1 %

△ Choline cholride 0.5 %

× Choline cholride 1.0 %

▽ Choline cholride 1.5 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3. ผลการศึกษาอิทธิพลของ glutamic acid

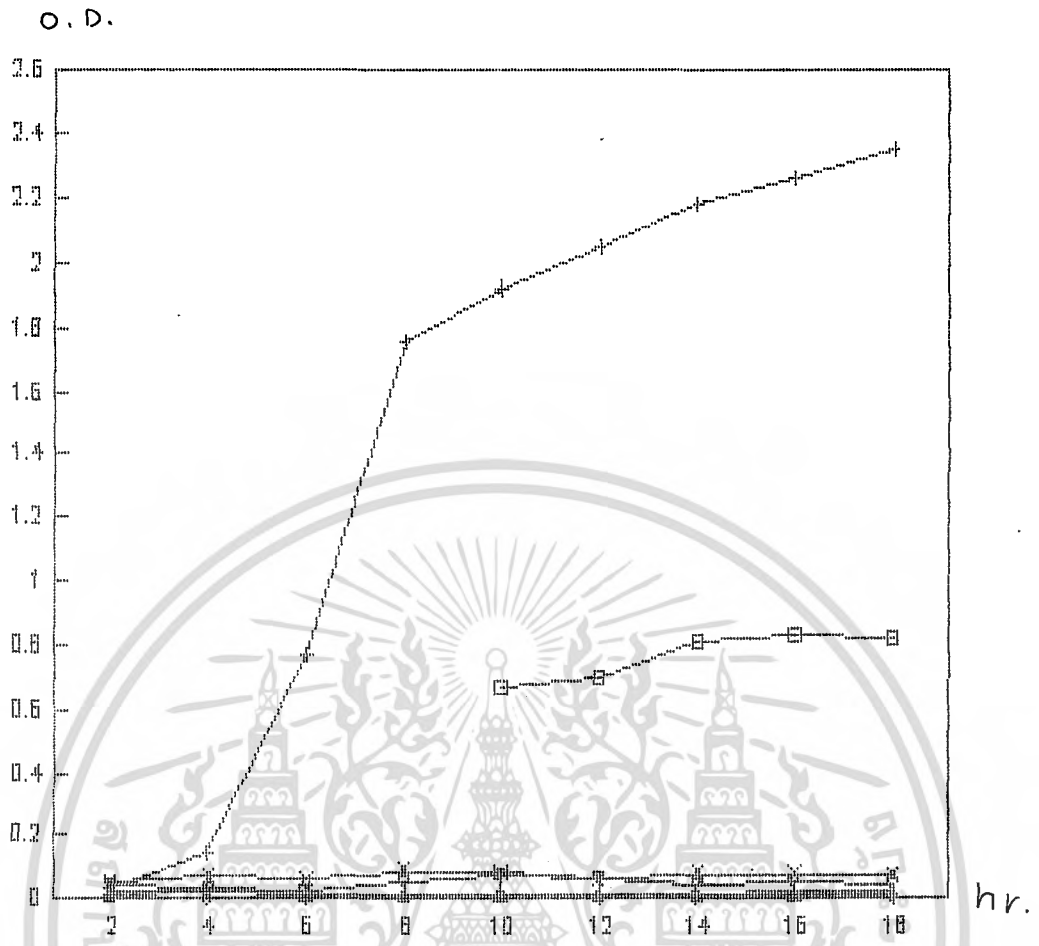
กรดอะมิโนหลายชนิด สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์วิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ได้ Daniels และ Noyes รายงานว่า glutamic acid สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของ Ps. denitrificans ดังนั้น จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของ glutamic acid ต่อการเจริญ โดยเพื่อเลี้ยง Ps. fluorescens ในน้ำทิ้งที่เติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์, Glucose 0.1 เปอร์เซนต์, โคบอล์ท 8 มิลลิกรัม/ลิตร, Choline chloride 0.5 เปอร์เซนต์ และ glutamic acid ในปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 เปอร์เซนต์ พบว่ากลับทำให้อัตราการเจริญลดลงอย่างมาก มี Ps. fluorescens ที่เลี้ยงโดยไม่ได้เติม glutamic เท่านั้นที่ให้ผลการเจริญสูง จึงสรุปได้ว่าในน้ำทิ้งนี้อาจมี glutamic acid มากอยู่แล้ว เมื่อเติมลงไปจะทำให้เกิด toxic จึงทำให้อัตราการเจริญลดลง เมื่อเทียบกับ NB จะพบว่าเมื่อเติม glutamic อัตราการเจริญลดต่ำกว่าใน NB มาก ซึ่งผิดกับเมื่อไม่เติม glutamic จะได้ว่าอัตราการเจริญที่สูงกว่า NB ซึ่งได้ค่า O.D. สูงถึง 2.254 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.19 กรัม/ลิตร เมื่อเทียบกับในอาหารเพื่อเติม glutamic ที่ให้ปริมาณเซลสูงสุด คือ O.D. 0.021 ได้น้ำหนักเซลแห้ง 0.02 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % Yeast extract, 0.1 % Glucose, Cobalt 8 mg/l และเติม Glutamic ในปริมาณต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	ค่าความขุ่นที่วัดได้ (O.D. 660 nm.)					
	NB	ปริมาณ กรด Glutamic (%)				
		0	0.1	0.5	1.0	1.5
2	-	0.034	0.016	0.019	0.05	0.041
4	-	0.145	0.007	0.02	0.07	0.028
6	-	0.769	0.008	0.016	0.067	0.025
8	-	1.759	0.011	0.013	0.087	0.052
10	0.666	1.923	0.014	0.01	0.087	0.069
12	0.695	2.048	0.008	0.017	0.065	0.063
14	0.806	2.185	0.008	0.017	0.078	0.043
16	0.828	2.262	0.011	0.019	0.078	0.053
18	0.819	2.354	0.008	0.021	0.075	0.041

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 21 เปรียบเทียบการเจริญของ Ps. fluorescens เมื่อเลี้ยงใน NB และน้ำทิ้งที่เติม 1.5 % , Yeast extract 0.1 % , Glucose โคบอลท์ 8 mg/l และเติม glutamic acid ในปริมาณต่าง ๆ

□ NB

\+ Glutamic acid 0 %

◇ Glutamic acid 0.1 %

▽ Glutamic acid 0.5 %

× Glutamic acid 1.0 %

△ Glutamic acid 1.5 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การคำนวณ</u> ปริมาณวิตามิน B_{12}

$$X = \frac{c}{\text{ปริมาณ sample}} \times \text{dilution}$$

c = ค่าปริมาณวิตามิน B_{12} ที่อ่านได้จากกราฟมาตราฐาน Working Standard ที่ชั่วโมงนั้น ๆ

<u>ตัวอย่างการคำนวณ</u> คำนวณหาปริมาณ B_{12} ในอาหาร NB ที่ชั่วโมงที่ 20 ปริมาณส่วนใสที่ใช้ 0.2 มิลลิลิตร ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ค่า O.D. เฉลี่ย 0.162

ที่ค่า O.D. 0.162 นั้นอ่านค่าจากกราฟ Working Standard ที่ชั่วโมงที่ 20 ได้ค่า $0.25 * 10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อลิตร

ปริมาณวิตามิน $B_{12} = \frac{0.25 * 10}{0.2} * 10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

$= 12.5 \times 10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อลิตร

วิธีการคำนวณ

1.เลือกอ่านค่า O.D. ที่วัดได้ โดยตัดค่าที่ต่ำกว่าจุดเริ่มของค่า O.D. ใน working standard และตัดค่าที่สูงสุดออกไป

2.นำค่า O.D.ที่วัดได้จาก sample assay tube ไปอ่านค่าที่ปริมาณวิตามิน B_{12} จากกราฟของ working standard

3.ปริมาณ B_{12} นี้มีหน่วยเป็น 10^{-5} ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งคือค่า c

4.นำแทนค่าในสูตร $x = \frac{c}{\text{ปริมาณsample}} * \text{dilution}$

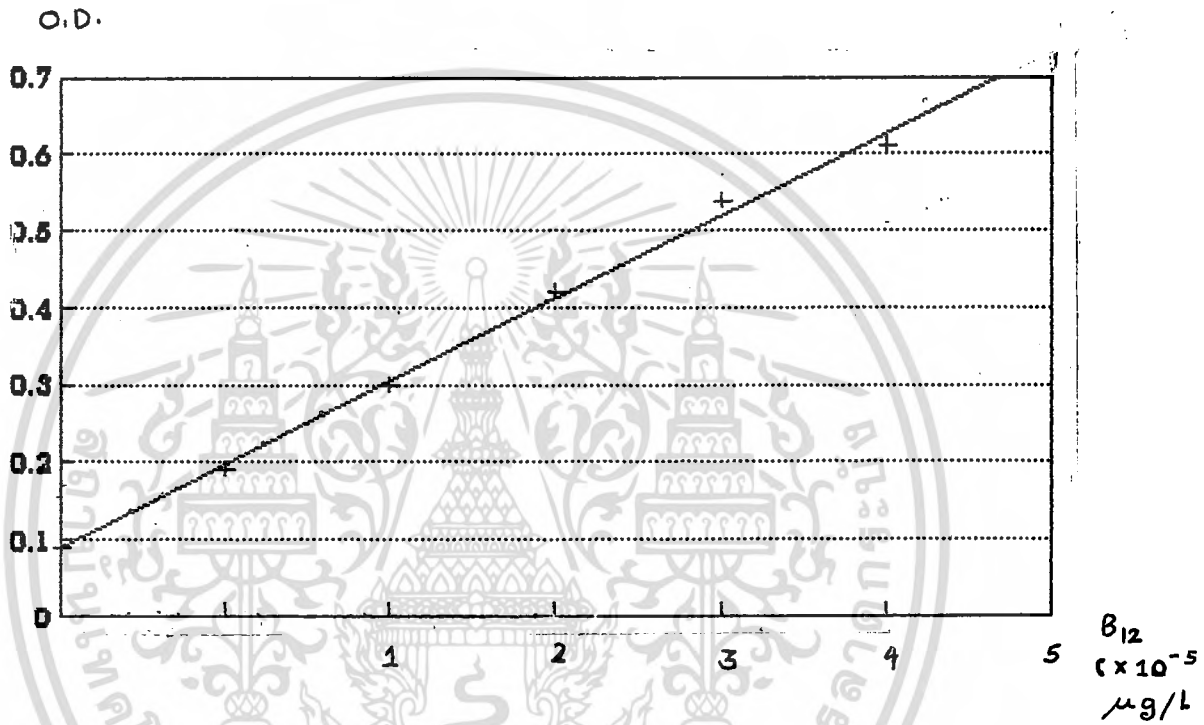
จะได้ค่า B_{12} ตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ working standard solution และค่า O.D. ที่ชั่วโมงที่ 10

ปริมาณ working standard solution	ค่า O.D.(660 nm)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	0.08	0.10	0.09
0.2	0.21	0.18	0.19
0.4	0.29	0.32	0.30
0.6	0.41	0.44	0.42
0.8	0.52	0.55	0.54
1.0	0.58	0.62	0.61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



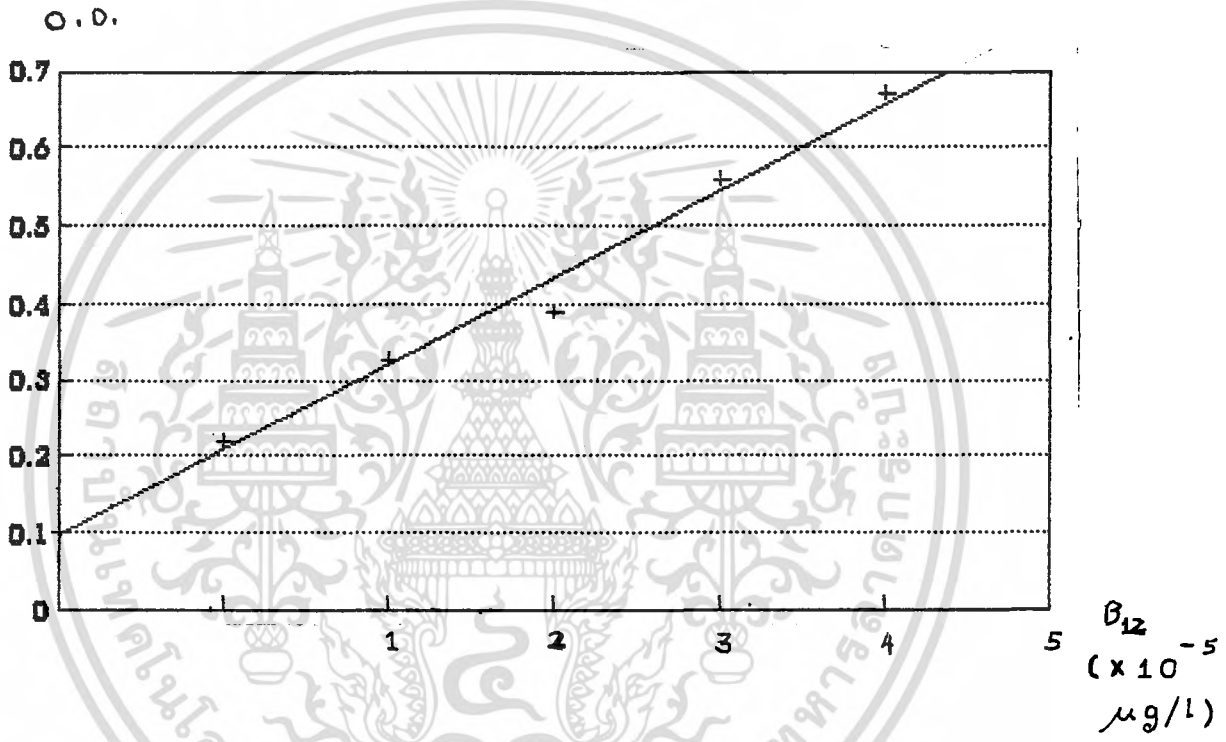
รูปที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณ Working Standard Solution และค่า O.D. ชั่วโมงที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ working standard solution และค่า O.D. ที่ชั่วโมงที่ 20

ปริมาณ working standard solution	ค่า O.D. (660 nm)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0	0.10	0.10	0.10
0.2	0.23	0.21	0.22
0.4	0.35	0.30	0.325
0.6	0.40	0.39	0.39
0.8	0.57	0.55	0.56
1.0	0.69	0.66	0.67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ Working Standard Solution และค่า O.D. ชั่วโมงที่ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีวิตามิน B_{12}				ที่มี B_{12}
	1	2	เฉลี่ย	($*10^{-2}$ µg/l)
1.0	0.25	0.28	0.265	0.75
0.5	0.21	0.23	0.220	1.30
0.2	0.15	0.12	0.135	1.25
1.0	0.290	0.288	0.289	8.75
0.5	0.201	0.198	0.199	9.6
0.2	0.132	0.130	0.131	9.0
1.0	0.301	0.310	0.305	10.0
0.5	0.220	0.230	0.225	11.60
0.2	0.150	0.170	0.160	15.00
1.0	0.400	0.420	0.410	18.0
0.5	0.230	0.250	0.240	15.0
0.2	0.160	0.165	0.162	12.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ แสดงค่า O.D.ของน้ำทิ้งที่เติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์ Glucose 0.1 เปอร์เซนต์ , Cobolt 8 มิลลิกรัม / ลิตร , Choline Choride 0.5 เปอร์เซนต์ หลังบ่มและปริมาณวิตามิน B_{12} ที่ Ps. fluorescens สร้างได้

ชั่วโมงที่	ระดับความเจือจางที่อ่านได้	ปริมาณส่วนใสที่มีวิตามิน B_{12}	ค่า O.D.			ปริมาณ B_{12}
			1	2	เฉลี่ย	($*10^{-2}$ µg/l)
5	10^{-1}	1.0	0.194	0.146	0.170	1.25
		0.5	0.133	0.168	0.150	1.50
		0.2	0.110	0.135	0.120	3.12
10	10^{-1}	1.0	0.345	0.350	0.352	12.50
		0.5	0.257	0.280	0.269	15.00
		0.2	0.135	0.155	0.145	12.50
15	10^{-1}	1.0	0.470	0.510	0.490	25.00
		0.5	0.280	0.340	0.310	17.50
		0.2	0.200	0.175	0.187	18.70
20	10^{-1}	1.0	0.550	0.600	0.570	32.50
		0.5	0.325	0.380	0.352	24.00
		0.2	0.217	0.190	0.190	23.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ B_{12} ที่ Ps. fluorescens ผลิตได้ในช่วงเวลาต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือก Pseudomonas sp.ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามิน B_{12} จากเชื้อ 2 สายพันธุ์ คือ Pseudomonas aeroginosa และ Pseudomonas fluorescens ผลปรากฏว่า การเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อทั้งสองในอาหาร NB นั้น เชื้อ Ps. fluorescens มีอัตราการเจริญและน้ำหนักเซลแห้งสูงสุดกว่า Ps. aeroginosa จึงเหมาะแก่การนำมาศึกษาวิจัยการสร้างวิตามิน B_{12}

จากการศึกษาสภาวะน้ำทิ้งจาก บริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด พบว่ามีสภาวะที่ Ps. fluorescens จะเจริญได้เมื่อเติมสารที่จำเป็นแก่การเจริญลงไปจะช่วยกระตุ้นให้ Ps. fluorescens เจริญได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์สารอาหารที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง พบว่ามีโปรตีนอยู่ 0.83 เปอร์เซนต์ และมีคาร์โบไฮเดรต 0.25 เปอร์เซนต์ ซึ่งเป็นอาหารที่ทำให้ Ps. fluorescens เจริญได้ แต่ก็ยังเป็นสภาวะที่ยังไม่เหมาะสมนัก

เมื่อศึกษาค่า BOD แรกเริ่มของน้ำทิ้งที่ได้ คือ 2,200 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อนำเติมสารอาหารที่เหมาะสมลงไปแล้วค่า BOD เปลี่ยนเป็น 12,000 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้น เพราะน้ำทิ้งนั้นได้เพิ่มแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์โบไฮเดรตลงไป และเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ BOD ที่ได้หลังการเลี้ยง Ps. fluorescens เพื่อการ assay วิตามิน B_{12} นั้นพบว่าค่า BOD ลดต่ำลง คือ มีค่าเท่ากับ 1,100 มิลลิกรัม/ลิตร

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมแก่การเจริญของ Ps. fluorescens คือ น้ำทิ้งเติม Yeast extract 1.5 เปอร์เซนต์, Glucose 0.1 เปอร์เซนต์, Choline chloride 0.5 เปอร์เซนต์, โคบอลท์ 8 มิลลิกรัม/ลิตร แต่สำหรับ Glutamic acid ซึ่งน่าจะช่วยเสริมให้ Ps. fluorescens สร้างเซลได้สูงขึ้น แต่ในกรณีวิจัยนี้กลับทำให้ผลการเจริญลดลง อาจเป็นได้ที่เกิด Glutamic acid เกิดการ toxic เนื่องจากในน้ำทิ้งมี Glutamic acid มากเพียงพออยู่แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการเจริญของ Pseudomonas fluorescens พร้อมทั้งเก็บเกี่ยวผลของ วิตามิน B_{12} ที่ชั่วโมงต่างๆ จะพบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสังเคราะห์วิตามิน B_{12} มีลักษณะแบบ growth associate คือการสังเคราะห์วิตามิน B_{12} เกิดขึ้นพร้อมๆ กับการเจริญของเซล และวิตามิน B_{12} สูงสุดเมื่อเซลเจริญสูงสุด

จากผลการเก็บเกี่ยววิตามิน B_{12} ที่ผลิตได้จาก Ps. fluorescens ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมแหล่งอาหารที่เหมาะสมแล้ว ได้วิตามิน B_{12} สูงสุด $26.6*10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 20 ซึ่งเป็นปริมาณวิตามิน B_{12} ที่สูงกว่าการเลี้ยง Ps. fluorescens ใน NB ซึ่งให้ผลผลิตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 20 คือ $15.16*10^{-2}$ ไมโครกรัมต่อลิตร ดังนั้นจะเห็นว่า Ps. fluorescens นั้นสามารถที่จะเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งเพื่อผลิตวิตามิน B_{12} ได้โดยต้องศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสม และแหล่งอาหารหลักจำพวกไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas fluorescens อาหารที่ใช้คือ Nutrient broth ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
เติมน้ำจนครบ	1	ลิตร

ต้มส่วนผสมทั้งหมดให้ละลาย ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus leichmanii ที่ใช้คือ tomato yeast-extract milk agar มีส่วนประกอบ ดังนี้

skim milk	100.0	กรัม
tomato juice (pH7)	100.0	มิลลิลิตร
yeast extract	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

แต่เนื่องจาก อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรนี้ มี skimmed milk เมื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เกิดปฏิกิริยา Caramelization ดังนั้น จึงใช้ tomato-juice agar แทน ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

trytone	10.0	กรัม
yeast-extract	10.0	กรัม
filtrate tomato juice	200.0	กรัม
agar	11.0	กรัม

filtrate tomato juice เตรียมได้ ดังนี้

ชั่งมะเขือเทศ 200.00 กรัม บดให้ละเอียด ต้มน้ำจำนวน 1 ลิตร ประมาณ 15 นาที กรองเอากากมะเขือเทศ เหลือแต่น้ำใส เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ Carbohydrate โดยใช้วิธี Phenolic method

1.1 สารละลาย phenol 5 เปอร์เซนต์

1.2 กรดซัลฟุริกเข้มข้น (H_2SO_4 Conc.)

2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ Crude protein โดยวิธี Semi-micro Kjedahl method

2.1 สารละลาย H_2SO_4 0.1 N

ปิเปตกรด 2.78 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตรโดยใช้ volumetric flask

2.1 สารละลาย Na_2CO_3

ชั่ง Na_2CO_3 6.7 กรัม ใส่ขวดนำไปอบที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ครึ่งชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน deccicator ชั่ง Na_2CO_3 ให้ได้น้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer 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_3 ความเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์

ชั่ง H_2BO_3 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5 screened methyl red indicator

ชั่ง methyl red 0.2 กรัม ใน ethanol 95 เปอร์เซนต์ 100 มิลลิลิตร เป็น solution A และละลาย bron cresol green 0.2 กรัม ใน ethanol 95 เปอร์เซนต์ 100 มิลลิลิตร เป็น solution B ผสม Solution A 1 ส่วนกับ Solution B 2 ส่วนเข้าด้วยกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. น้ำยาเคมีในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน pH

สารละลายมาตรฐาน(โมลาร์)	ค่า pH ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
<u>มาตรฐานชั้นต้น</u> (Primary Standards)	
โปตัสเซียมไฮโดรเจนตาเตรท	3.557
0.05 โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนซิเตรท	3.776
0.05 โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟทาเลท	4.008
0.00025 โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	6.865
$^{+}$0.025 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	
0.008695โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	7.413
$^{+}$0.03043ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	
0.01 โซเดียมบอเรท ดีคาร์โบไฮเดรท (บอแรกซ์)	9.180
0.025 โซเดียมไบคาบอเนต $^{+}$ 0.025 โซเดียมคาร์บอเนต	10.012
<u>มาตรฐานชั้นที่ 2</u> (Secondary Standard)	
0.05 โปตัสเซียมเทตรอกซาเลทไดไฮเดรท	1.679
แคลเซียมไฮดรอกไซด์	12.454

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ BOD

4.1 สารละลาย H_2So_4 1 N.

4.2 สารละลาย NaOH 1 N.

4.3 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมได้ดังนี้ ละลาย potassium dihydrogen phosphate (KH_2Po_4) จำนวน 8.5 กรัม dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPD_4) 21.75 กรัม disodium hydrogen phosphale (Na_2 HPO_47H_2O) 33.4 กรัม และ ammonium chloride (NH_4Cl) 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ควรมี pH 7.2

4.4 สารละลาย แมกเนเซียมซัลเฟต

ละลาย $MgSO_4.7H_2o$ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.5 สารละลายแคลเซียมคลอไรด์

ละลาย $CaCL_2$ ที่อบแห้ง 27.5 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.6 สารละลาย เฟอริคคลอไรด์

ละลาย $FeCL_3.6H_2o$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.7 สารละลาย แมงกานีสซัลเฟต

เตรียมโดย ละลาย $MnSO_4.4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4.2H_2O$ 400 กรัม หรือ $MnSO_4.H_2O$ 364 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4.8 สารละลาย อัลคาไล-ไฮโอไลด์-อาไซด์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม และ โซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติมจนเป็น 1 ลิตร เสร็จแล้วเติมโซเดียมอาไซด์ (NaN_2) 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

4.9 สารละลาย Sodium thiosulfate 0.025 N. ใช้ในการไตเตรท

ละลาย $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 6.025 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดใหม่ ๆ และปล่อยให้เย็น แล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพอยู่ได้โดยเติม NaOH 0.4 กรัม ต่อลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ 1 มิลลิลิตร จะมีค่าเท่ากับปริมาณสารละลายออกซิเจน (DO.) 0.200 มิลลิกรัม

การหาค่ามาตรฐาน ของสารละลาย โซเดียมไธโอซัลเฟต ด้วยสารละลายไดโครเมท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9.1 ละลาย HI 2 กรัม ในขวดแก้ว Erlenmcyer flask ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4.9.2 เติม H_2So_4 (1+1) 10 มิลลิลิตร

4.9.3 เติมสารละลายมาตรฐาน $H_2Cr_2O_7$ 0.025 N. ที่เตรียมไว้ ในข้อ 3-10 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

4.9.4 ตั้งไว้ในมืด 5 นาที

4.9.5 เจือจางด้วยน้ำกลั่น จนปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร โดยปริมาณ

4.9.6 ไตเตรท ด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต จนสารละลายมีสีเหลืองอ่อน ๆ

4.9.7 เติมน้ำแป้ง (ในข้อ 3.11) 3-4 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ไตเตรทจนเริ่มใสถึงจุดยุติ จดปริมาตรของ Sodium thiosulfate Solution ที่ใช้ไป

4.9.8 นำมาคำนวณหาความเข้มข้น ของสารละลายไธโอซัลเฟต =

$$\frac{\quad\quad}{20}$$

a = มิลลิลิตร ไธโอซัลเฟต

n = Narmality ของสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$

4.9.9 ปรับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตให้มีความเข้มข้นแน่นอนเป็น 0.025 N.

4.10 สารละลาย มาตราฐานโปตัสเซียมไดโครเมท 0.025 N.

เตรียมโดยชั่ง $K_2Cr_2O_7$ อบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำเข้า desicator รอให้เย็น ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1.226 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้ Volumetric flask

4.11 น้ำแป้ง

ละลายแป้งมัน 5 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เท ลงในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ที่ต้มจนเดือดและคนจนเป็นเนื้อเดียว เติมน้ำอีกจนเป็น 1 ลิตร ปล่อยให้เดือดประมาณ 5 นาที ปิดไฟตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเติมกรด Salicylic 1.25 กรัม หรือใช้ Toluene 2-3 หยด เติมลงในสารละลายน้ำแป้งเพื่อกันบูด

5. <u>สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาตรวิตามินบี 12 โดยใช้ Turbidimetric method of microbiological assay</u>

5.1 0.1 M acetale buffir pH 4.6

เตรียมได้โดย ผสมสารละลาย CH_3COOH 0.1 M ปริมาณ 25.5 มิลลิลิตร ผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับสารละลาย CH_3COONa 0.1 M ปริมาณ 24.5 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

หมายเหตุ : 0.1 M CH_3COOH เตรียมได้จาก Acetic Acid 5.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

0.1 M CH_3COONa เตรียมจาก Acetate 2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

5.2 Buffer Cyanide solution

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

5.3 สารละลาย KCN 0.05 เปอร์เซนต์

ละลาย KCN 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

5.4 วิตามินบี 12 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผลึกวิตามินบี 12 (cyanocobalamln) ของ Merk & Co; Inc. 1 มิลลิกรัม ในสารละลายที่เตรียมไว้ใน ข้อ 4.2 ดูดใส่ ampule จำนวน 1 มิลลิลิตร หลอมปลาย ampule ให้เชื่อมกัน และนำไปฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 20 นาที เก็บ stock Solution ใช้ในตู้เย็น

5.5 Micro - inocculum broth ของเชื้อ Lactobacillus leichmanii

มีส่วนประกอบดังนี้

bacto - yeast extract	20	กรัม
proteose peptone (Difco)	5	กรัม
bacte - dihydragen phosphate	2	กรัม
Sorbitan moncleate complex	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส 15 นาที

5.6 สารละลาย Single streangth assay medium

ชั่ง Vitamin B_{12} assay medium (Difco) 4.25 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที สารละลายชนิดนี้สำหรับล้างเซล Lactobacillus Leichmanii

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.7 สารละลาย double strength assay medium

ชั่ง Vitamin B_{12} assay medium (Difco) 8.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที สารนี้ใส่ในสารละลาย Sample และ Vitamin B_{12} working standard สารละลาย Vitamin B_{12} assay medium ต้อง เตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะทำการ assay

5.8 อาหารที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน บี 12 Vitamin B_{12} assay medium ของ Lactobacillus leichmanii เป็นอาหารสำเร็จรูปของ Difco มีส่วนประกอบดังนี้

Casein hydro lyzale	100	มิลลิลิตร
Dl - Tryptophon	100	มิลลิลิตร
L - Cystone	100	มิลลิลิตร
Adenine sulfate Solution	10	มิลลิลิตร
Guanine , HCI Solutoon	10	มิลลิลิตร
Uracil Solution	10	มิลลิลิตร
Xanthine Solution	10	มิลลิลิตร
Salts Solution A	10	มิลลิลิตร
Salts Solution B	10	มิลลิลิตร
Glucose	40	กรัม
Sodium scetate (annydrous)	12	กรัม
Dl - x - Alanine	1	กรัม
Guanosine	200	มิลลิกรัม
Guanylic acid	200	มิลลิกรัม
$Cacl_2$	50	มิลลิกรัม
Vitamin mixture	10	มิลลิลิตร
P - Amino benzoic acid	10	มิลลิลิตร
Biotin	10	มิลลิลิตร
Folic acid	10	มิลลิลิตร
Pyridoxal	10	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tween 80	2	กรัม
Thiomalic acid	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การทำกราฟมาตรฐานของ น้ำตาลกลูโคส

1. การเตรียมสารละลายกลูโคส มาตราฐาน เตรียมได้ดังนี้

   ชั่งน้ำตาลกลูโคส 100 ไมโครกรัม ต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร คนให้ละลาย เตรียมประมาณ 5 มิลลิลิตร

2. ทำการเจือจาง ให้ได้ความเข้มข้น 20,40,60 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ดังนี้

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารละลายมาตราฐาน (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่นที่ใช้เจือจาง (มิลลิลิตร)
100	1.0	0.0
60	0.6	0.4
40	0.4	0.6
20	0.2	0.8

3. จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นมาเติม Phenol 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร
4. เติม H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาณ 5 มิลลิลิตร โดยเติมให้ปลายปิเปตสูงกว่าสารละลายในหลอดประมาณ 1 1/2 นิ้ว เพื่อให้สารละลายผสมเข้ากัน ถ้าเติมโดยให้ไหลลงข้างหลอด H_2SO_4 (ภาคผนวก ข.) จะไหลลงไปอยู่ด้านล่างจะไม่ผสมกัน
5. นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปวัดค่า O.D. โดยใช้เครื่อง spectrophotometor ที่ 488 นาโนเมตร
6. สร้างกราฟมาตรฐานของ Glucose โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Glucose ในสารละลาย และค่า O.D. ที่วัดได้

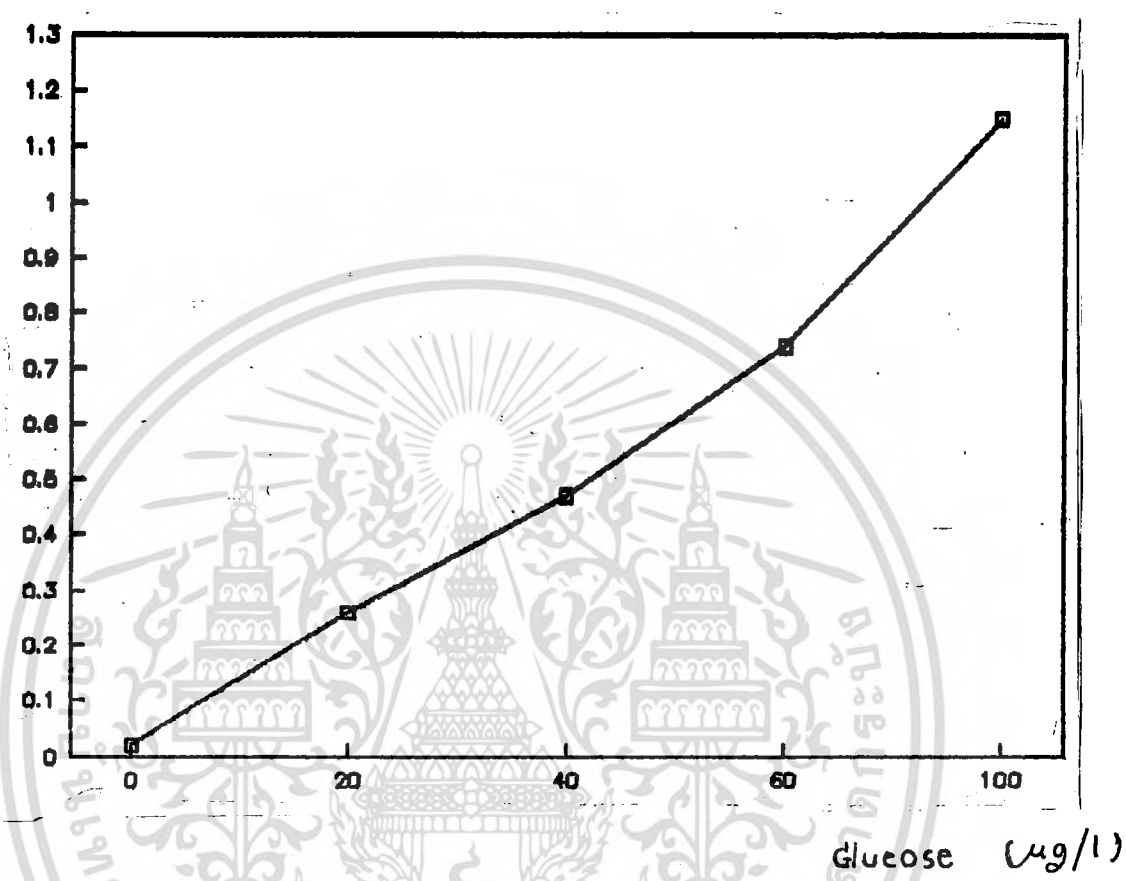
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลของ O.D. ที่วัดได้จากความเข้มของต่าง ๆ ของ Glucose เพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ปริมาณ Glucose (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่า O.D.
0	0.08
20	0.04
40	0.64
60	0.90
100	1.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่า O.D. ที่วัดได้จากความเข้มข้นต่าง ๆ ของ Glucose



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์หาค่า BOD จากน้ำทิ้ง

สารละลายออกซิเจน (Dissolved Oxygen) โดยวิธี Azide Modification of Iodometric

วิธีนี้เหมาะสำหรับการหาปริมาณสารละลายออกซิเจนในน้ำโสโครก, น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และน้ำในแม่น้ำลำคลอง นอกจากนี้ยังใช้ได้กับน้ำที่มีไนโตรเจนสูงกว่า 50 ไมโครกรัม/ลิตร แต่ใช้ไม่ได้ดีกับน้ำที่มีอนุภาคของเหล็กที่มีวาเลนซี่ 2 เกินกว่า 1 มิลลิกรัม/ลิตร หรือสารที่เป็นตัวเติมหรือลดออกซิเจนปนอยู่

น้ำยาเคมี

1) สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ละลาย $MnSO_4$, $4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4 2H_2O$ 400 กรัม หรือ $MnSO_4$, H_2O 364 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2) สารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-อาไซด์ ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 500 กรัม และโซเดียมไอโอไดด์ (NaI) 135 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติมจนเป็น 1 ลิตร เสร็จแล้วเติมโซเดียมอาไซด์ (NaN_3) 10 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

3) กรดซัลฟูริคเข้มข้น

4) น้ำแป้ง ละลายแป้งมัน 5 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 50 มิลลิลิตรค่อย ๆ เทลงในน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร ที่ต้มจนเดือดและคนจนเป็นเนื้อเดียว เติมน้ำอีกจนเป็น 1 ลิตร ปล่อยให้เดือดประมาณ 5 นาที ปิดไฟตั้งทิ้งไว้ให้เย็นเติมกรด Salicylic 1.25 กรัม หรือใช้ Toluene 2-3 หยด เติมลงในสารละลายแป้งเพื่อกันบูด

5) สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.0250 N ใช้ในการไตเตรท

ละลาย $Na_2S_2O_3 . 5H_2O$ 6.205 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือดใหม่ ๆ และปล่อยให้เย็น แล้วเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้สามารถเก็บรักษาให้คงสภาพอยู่ได้โดยเติม NaOH 0.4 กรัม ต่อลิตร สารละลายมาตรฐานนี้ 1 มิลลิลิตร จะมีค่าเท่ากับปริมาณสารละลายออกซิเจน (D.O.) 0.200 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาค่ามาตรฐานของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ด้วยสารละลายไดโครเมท

1) สารละลายมาตรฐานโปตัสเซียมไดโครเมท 0.025 N .

ละลาย $K_2Cr_2O_7$ ที่อบแห้งแล้ว 1.226 กรัม ในน้ำกลั่นและเติมจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2) ละลาย KI 2 กรัม ในขวดแก้ว Erlenmcyer flask ด้วยน้ำกลั่น 100-150 มิลลิลิตร

3) เติม H_2SO_4 (1+9) 10 มิลลิลิตร

4) เติมสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$ 20 มิลลิลิตร

5) ตั้งไว้ในที่มืด 5 นาที

6) เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร โดยประมาณ

7) ไตเตรท ไอโอดีน ที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

8) Normality ของสารละลายไธโอซัลเฟต = $\frac{a \times N}{20}$

a = มิลลิลิตร ไธโอซัลเฟตที่ใช้

N = Normality ของสารละลายมาตรฐาน $K_2Cr_2O_7$

9) ปรับสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟตให้มีความเข้มข้นแน่นอนเป็น 0.0250 N.

วิธีการหา

1) จากตัวอย่างน้ำที่เก็บได้ในขวด 250-300 มิลลิลิตร เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต 2 มิลลิลิตร

2) แล้วเติมสารละลาย อัลคาไลด์-ไอโดไดด์-อาไซด์ ตามลงไปทันที 2 มิลลิลิตร ให้ปลายหลอดจมอยู่ในตัวอย่างน้ำ

Biochemical Oxygen Demand (BOD)

การหาค่า BOD นี้ เป็นการหาปริมาณออกซิเจนที่ต้องการโดยแบคทีเรียเพื่อใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย ค่า BOD นี้จะบอกถึงคุณลักษณะของน้ำเสียนั้นว่ามีสารอินทรีย์ปนอยู่มากน้อยแค่ไหน ถ้ามีสารอินทรีย์ปนอยู่มากค่า BOD ก็จะมากด้วย และในทำนองเดียวกันถ้ามีสารอินทรีย์ปนอยู่น้อยค่า BOD ก็จะน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องมือและอุปกรณ์

1) ขวดมาตราฐาน ความจุ 250-300 มิลลิลิตร มีจุกปิดได้สนิท ปากกว้างออกเล็กน้อย ทำให้มีร่องเหนือจุกและปากขวด เพื่อให้มีน้ำหล่ออยู่เสมอขณะ incubate ที่ 20 องศาเซลเซียส เพื่อกันการดึงอากาศจากภายนอกเข้าไปในขวด ขวดนี้ต้องล้างให้สะอาดทุกครั้งก่อนใช้

2) เครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถใช้ได้กับตู้เย็นธรรมดา

3) ตู้เย็นขนาด 6 คิวบิคฟุต หรือใหญ่กว่า

4) กระบอกตวง ขนาด 1 ลิตร

น้ำยาเคมี

1) **น้ำกลั่นบริสุทธิ์** คุณภาพสูง ปราศจากคลอรีน, คลอรามีน, อัลคาไลนิตี้, กรด, และสารอินทรีย์ มีทองแดงปนได้ไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร

2) **สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์** ละลาย KH_2PO_4 8.5 กรัม K_2HPO_4 21.75 กรัม $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 33.4 กรัม และ NH_4Cl 1.7 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ควรจะมีค่า pH 7.2

3) **สารละลายแมกเนเซี่ยมซัลเฟต** ละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4) **สารละลายแคลเซี่ยมคลอไรด์** ละลาย $CaCl_2$ ที่อบแห้ง 27.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5) **สารละลายเฟอริคคลอไรด์** ละลาย $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6) **สารละลายโซเดียมซัลไฟท์** 0.025 N. ละลาย Na_2SO_3 ที่อบแห้ง 1.575 กรัมในน้ำกลั่น แล้วเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร สารละลายนี้ไม่คงที่สลายตัวได้ง่าย จึงควรเตรียมเฉพาะเวลาที่ต้องการใช้เท่านั้น

7) **สารละลายกรดและด่าง 1 N.** สำหรับใช้ปรับค่า pH ให้เป็นกลาง

8) **การเติมน้ำเชื้อ (Seeding)** การเติมน้ำเชื้อ ก็เพื่อต้องการให้มีจำนวนแบคทีเรียเพียงพอในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย น้ำเสียประเภทสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อินทรีย์ เช่นน้ำโสโครกจากบ้านเรือน ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอยู่เป็นจำนวนมากแล้ว ก็ไม่จำเป็นต้องเติมน้ำเชื้อลงไปอีก

ตัวอย่างน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียอยู่น้อยหรือไม่มีเลย เช่น น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอรีน, น้ำทิ้งที่อุณหภูมิสูง, เป็นกรดหรือด่างแรง จะต้องเติมเชื้อลงในน้ำที่ใช้เจือจาง น้ำเชื้อมาตราฐานเตรียมได้จากน้ำโสโครกจากบ้านเรือนที่ปล่อยให้ตกตะกอน และใส่ไว้ในตู้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง จึงดูดเอาน้ำส่วนบนมาใช้โดยทั่วไปแล้วใช้น้ำเชื้อมาตราฐาน 1-2 มิลลิลิตร ต่อน้ำที่ใช้เจือจาง 1 ลิตร

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมหลายชนิด ที่มีสารอินทรีย์ที่เชื้อแบคทีเรีย จากน้ำโสโครกจากบ้านเรือนไม่สามารถย่อยสลายได้ ในกรณีเช่นนี้ จะต้องเตรียมน้ำเชื้อจากดินที่ทำให้เชื้อเคยชินกับน้ำทิ้งชนิดนั้นเสียก่อน หรือเก็บจากแหล่งรับน้ำใต้จุดที่ทิ้งน้ำเสียนั้น (โดยปกตินิยมเก็บที่ระยะ 2-3 กิโลเมตร) การทำให้เชื้อเคยชินกับน้ำเสียที่ต้องการหานั้นทำได้ โดยการเป่าอากาศน้ำโสโครก หรือจากแหล่งน้ำทิ้ง แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณน้ำเสียที่ต้องการจะหา BOD ลงไปทุกวันจนกระทั่งได้เชื้อที่เคยชินกับน้ำเสียนั้นเจริญขึ้นจนเป็นที่พอใจ

วิธีการหา

1. การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง
   1) ตวงน้ำกลั่นให้มากกว่าปริมาตรที่ต้องการใช้ 1 ลิตร ใส่ลงในภาชนะที่สะอาด
   2) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์, แมกนีเซียมซัลเฟต และ เฟอริคคลอไรด์ ตามลำดับ ใช้สารละลายแต่ละชนิด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำเจือจาง 1 ลิตร
   3) เป่าอากาศที่สะอาด เพื่อเพิ่มปริมาณสารละลายออกซิเจนให้กับน้ำเจือจาง เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง
   4) เติม Seed 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำที่ใช้เจือจาง 1 ลิตร ในกรณีที่จำเป็นต้องใช้
2. การเตรียมตัวอย่างน้ำที่จะหา
   1) ตัวอย่างน้ำที่เป็นด่างหรือกรด จะต้องปรับให้เป็นกลางคือ pH ประมาณ 7 ด้วย H_2SO_4 1 N. หรือ NaOH 1 N. แล้วแต่กรณี
   2) ตัวอย่างน้ำที่มีสารประกอบคลอรีนส่วนเหลือ โดยปกติถ้าตั้งตัวอย่างน้ำทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง คลอรีนส่วนเหลือก็จะสลายตัวไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ถ้าตัวอย่างน้ำที่ปรับให้เป็นกลางแล้ว ยังมีคลอรีนส่วนเหลืออยู่มาก ต้องกำจัดโดยใช้โซเดียมซัลไฟท์ การหาปริมาณคร่าว ๆ ของโซเดียมซัลไฟท์ที่จะเติมทำได้โดยใช้ตัวอย่างน้ำ 100-1000 มิลลิลิตร เติมกรดอาซิติค (1+1) หรือกรดซัลฟูริค (1+50) 10 มิลลิลิตร แล้วไตเตรทด้วยโซเดียมซัลไฟท์ 0.025 N. ใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ก็จะทราบปริมาณของโซเดียมซัลไฟท์ที่จะต้องใช้ แล้วจึงนำตัวอย่างน้ำที่กำจัดคลอรีนส่วนเกินแล้วไปหาค่า BOD ต่อไป

3) ตัวอย่างน้ำที่มีโลหะหนักหรือสารเป็นพิษชนิดอื่นเจือปนอยู่ จะต้องศึกษาและกำจัดเสียก่อนเป็นพิเศษ

3. วิธีการเจือจาง

1) เลือกเปอร์เซนต์ตัวอย่างในการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD อยู่ในช่วงที่กำหนดแล้ว จึงเลือกเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางที่สูงกว่าและต่ำกว่า ที่อยู่ติดกันอีก 2 ชั้นตามตารางที่ 14.3 ดังนั้นจำเป็นต้องรู้ค่า BOD โดยประมาณก่อน

2) ค่อย ๆ รินน้ำเจือจาง 700-800 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศ

3) เติมตัวอย่างน้ำจำนวนที่ต้องการ แล้วเติมน้ำเจือจางจนปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4) ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน อย่าให้มีฟองอากาศ

5) ค่อย ๆ รินใส่ขวด BOD 3 ขวด ปิดจุก นำไปเก็บในตู้ 20 องศาเซลเซียส 2 ขวด ส่วนขวดที่เหลือนำไปหา D.O.ทันที เพื่อทราบค่า D.O. ที่จุดเริ่มต้น (D_1)

6) ทำเช่นเดียวกันตั้งแต่ ข้อ (2) ถึงข้อ (5) สำหรับเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางที่ต่ำกว่าและสูงกว่าตามลำดับ

4. การหาปริมาณ D.O. หาปริมาณ D.O. ที่จุดเริ่มต้น โดยวิธี Azide Modification of the Iodometric Method ดังกล่าวแล้วในข้อที่ 14.5

5. การเพาะเลี้ยง (Incubation)

เพาะเลี้ยงโดยเก็บ 2 ขวดของแต่ละเปอร์เซนต์ตัวอย่างเจือจางในตู้เย็นมืดอุณหภูมิ 20 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงนำออกมาหาปริมาณ D.O. (D_2) ตามหัวข้อ 4

6. การลดปริมาณ D.O. เนื่องจากน้ำเชื้อ

ถ้ามีการเติมน้ำเชื้อลงในน้ำกลั่นสำหรับเจือจาง ก็จะต้องหาปริมาณ D.O.ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลงไปเนื่องจากน้ำเชื้อในน้ำเจือจาง แล้วนำไปคิดคำนวณเทียบตามเปอร์เซนต์ของน้ำเชื้อที่ใช้ในการเจือจางตัวอย่างน้ำ โดยปกติแล้วปริมาณ D.O.ที่ลดลงเนื่องจากน้ำเชื้อไม่ควรจะเกิน 1 มิลลิกรัม/ลิตร

7. การควบคุมคุณภาพน้ำเจือจาง

รินน้ำกลั่นที่ใช้เจือจางแต่ไม่ได้ใส่น้ำเชื้อลงในขวด BOD 2 ใบ ปิดจุก แล้วเอาขวดหนึ่งเพาะที่ 20 องศาเซลเซียส ส่วนอีกขวดหนึ่งหาปริมาณ D.O. ทันที ผลต่างของปริมาณ D.O. ที่ได้ในตอนแรกและตอนหลัง (5 วัน) จะเป็นเครื่องชี้ให้เห็นคุณภาพของน้ำกลั่นที่ใช้เป็นน้ำเจือจาง ถ้าปรากฏว่าปริมาณ D.O. ลดลง ผลที่ได้นั้นไม่ควรใช้เป็น Blank Correction ปกติแล้ว ปริมาณ D.O.ไม่ควรลดเกินกว่า 0.2 มิลลิลิตร หรือที่ดีแล้วไม่ควรเกิน 0.1 มิลลิลิตร

8. การพิจารณาผลเพื่อใช้คำนวณค่า BOD

ผลที่น่าเชื่อถือและจะใช้คำนวณต่อไปได้นั้น จะต้องมีค่าปริมาณ D.O. เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลิกรัม/ลิตร และต้องมีการลดปริมาณ D.O. ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัมก/ลิตร จึงจะทำให้ค่า BOD ที่คำนวณออกมาได้นั้นถูกต้องที่สุด

9. การคำนวณ

1) ในกรณีไม่เติมเชื้อ

$$mg/l \ BOD = \frac{D_1 - D_2}{P}$$

2) ในกรณีที่เติมเชื้อ

$$mg/i \ BOD = \frac{(D_1-D_2)-(B_1-B_2)f}{P}$$

D_1 = D.O. of diluted samples 15 min. after preparation

D_2 = D.O. of diluted samples after incubation

P = Decimal fraction of sample used

B_1 = DO of dilution of seed control before incubation

B_2 = D.O. of dilution of seed control after incubation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

f = ratio of seed in sample to seed in control

$$= \frac{\% \text{ seed in } D_1}{\% \text{ seed in } B_1}$$

ตาราง 14.3 ช่วงของค่า BOD ที่วัดได้ตามค่าเปอร์เซนต์ ตัวอย่างของการเจือจาง

ช่วง BOD	% ตัวอย่าง
20,000 - 70,000	0.01
10,000 - 25,000	0.02
4,000 - 14,000	0.05
2,000 - 7,000	0.1
1,000 - 3,500	0.2
400 - 1,400	0.5
200 - 700	1.0
100 - 350	2.0
40 - 140	5.0
20 - 70	10.0
10 - 35	20.0
4 - 14	50.0
0 - 7	100.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเลข 1 เครื่อง Autoclave ของ HIRAYAMA MANUFACTURING COORPERATION MODEL HA-3D

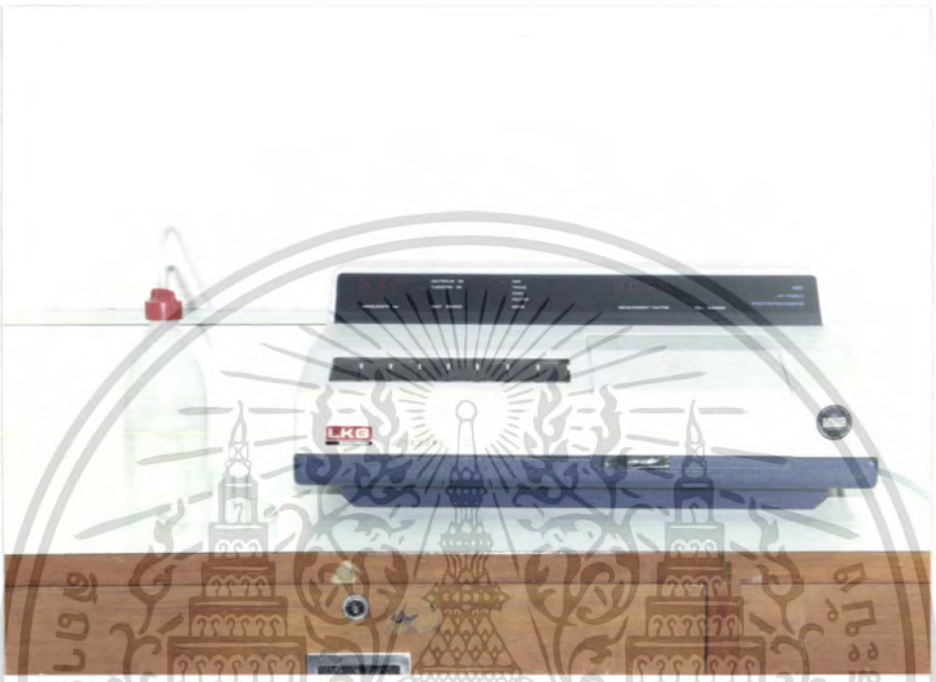
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเลข 2 เครื่อง Centrifuge ของ BHG HERMLE ZK 365

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเลข 3 เครื่อง KJELTEC SYSTEM 1002 Distilling Unit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



หมายเลข 4 เครื่อง Spectrophotomiter ของ LKB Biochrom Ultrospec II

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. ภัทรา ผลิธวัช.2520. กากน้ำตาล. วารสารน้ำตาล. 13(1) : 1-10 .

2. วิเชียร กิจปรีชาวนิช.2521. ปัญจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Bacillus megaterium ATCC1 3639 ในน้ำมะพร้าวแก่. กรุงเทพ ฯ : วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

3. American Type Culture Collection. 1972. The American Type Cuture Colection Catalogue of Strains. American Type Cuture Collection, Maryland.

4. Association of Official Agricultural Chemists . 1955. Official Methods of Analysis. 8 th ed. Association of Official Agricultural Chemists,Washington D.C.

5. Berg, T.M., J.A. de Vries, C.J.M. Van Gasteren,H. Meeuwissen, G.A.W. Stevens and F.J. Verbon. 1976. Comparative studies on the microbiological vitamin B_{12} assays at two laboratories. Appl. and Env. Microbial. 31: 459-464.

6. Bhagavan, N.V. 1974. Biochemistry: A Comprehensive Review. p.731-736. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.

7. Bernhauer, K., W. Friedrich, G. Gross and S. Spaude. 1955. Process of obtaining concentrates of vitamin of the B_{12} group from waste liquor and residual products of industrial fermentation processes. U.S. Patent 2, 943, 983.

8. Bray, R. and D. Shemin. 1958. The biosynthesis of the porphyrin-like moiety of vitamin B_{12}. Biochim. Biophys. Acta. 30: 647-648.

9. Buchnan,R.E., N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R.G.E. Murray,C.F. Niven, A.W. Ravin and R.Y. Stanier. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

10. Bukin, V.N. and G.V. Pronyakova. 1960. The biosynthesis of vitamin B_{12} and porphyrins by Propionibacterium. J. Biochem. 47: 781-789.

11. Burton, M.O. and A.B. Lochhead. 1951. Studies on the production of vitamin B_{12} - active substances by microorganisms, Can. J. Bot. 29: 352-356.

12. Casida, L.E., Jr. 1968. Industrial Microbiology. John Wiley & Sons, Inc., New York.

13. Conn, E.E. and P.K. Stumpf. 1976. Outlines of Biochemistry. 4 th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.

14. Daniels, H.J., 1970. Factors influencing vitamin B_{12} production by Pseudomonas denitrificans. Can. J. Microbiol. 16: 809-815.

15. Darken, M.A. 1953. Production of vitamin B_{12} by micro organisms and its occurence in plant tissue. The Bot. Rev. 19: 99-121.

16. Davis, B.D. and E. Mingioli. 1950. Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B_{12}. J. Bacteriol. 60: 17-28.

17. Friedman, H.C. and L.M. Cagon.1370. Microbial biosynthesis of B_{12} - like compounds. Ann. Rev. Microbial. 24 : 159-208.

18. Frobisher , M., R.D. Hinshill , K.T. Crabtree and C.R. Good hart. 1974. Fundamental of Microbiology. 9 th ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19. Hendlin, D. and M.L. Ruger . 1950. The effect of cobalt on the microbial synthesis of LLD - active substances. Science. 111 : 541-542 .

20. Hill , H.A.O. , J.M. Pratt and R.J.P. Williams. 1971. Identification and investigation of cobalamins and cobaminde coenzyme by nuclear manegic resonance and electron paramagnetic resonance spectroscopy. In Methods in Enzymology. 18 : 5-31, Part C.D.B. Mc Cormick and L.D. Wright, eds. Academic Press, New York.

21. Hodgkin, D.C., J. Pickworth, J.H. Robertson, K.N. Trueblood, R.J. Persen, J.G. White, R. Bonnett, J.R.Cannon, A.W. Johnson, I.Sutherland A.R. Todd and E.L. Smith.1955. Nature. 176: 325.

22. Hodgkin, D.C., J. Kampur, J.Lindsey, M.Mackey, J.Pickworth, J.H. Robertson, C.B. Shoemaker, J.G. White, R.J. Prosen and K.N. Trueblood. 1957. The structure of vitamin B_{12} . Proc. Roy. Soc. London . Ser A . 242 : 228-263 .

23. Hoover, S.R., L.B. Jasewicz, J.B. Pepinsky and N.Porges. 1952. Sewage industrial watses. vol. 24 : 28. Cited in Knivett , V . A . 1960 . The microbiological production of vitamin B_{12} and sulfite from sewage.Progress in Industrial Microbiology. 2:27-45.

24. Hoover, S.R., L.B. Jasewicz, J.B. Pepinsky and N. Porges. 1952. Sewage industrial wastes. vol. 24: 28. Cited in Knivett, V.A. 1960. The miccobiological production of vitamin B_{12} and sulfite from sewage. Progress in Industrial Microbiology. 2 : 27-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33. Pike, R.L. and M.L. Brown. 1975 . Nutrition : An integrated approch. 2 nd ed. John Willey & Sons, Inc., New York.

34. Pitfalls in the diagnosis of vitamin B_{12} deficiency by radio dilution assay.1979. Nutritional Review. 37: 313-315.

35. Rapp, p. 1968. Ph.D. thesis , University of Stuttgart, Stuttgart, Germany. Cited in Friedman, H.C. and L. M. Cagon. 1970 Microbial biosynthesis of B_{12} - like compounds. Ann. Rev. Microbiol. 24 : 159-208.

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

37. Rickes , E.L. ,N.G. Brink, F.R. Koniuszy and T.T. Wood.1948. Crystalline vitamin B_{12} . Science. 107 : 396-397.

38. Rickes, E.L., N.J. Rahway and R. R. Wood. 1952 . Vitamin B_{12} active composition and process of preparing same. U.S. Patent. 2, 703, 302.

39. Rosenthal , H.L. 1968. Vitamin B_{12} . IV. Estimation in foods and food supplements. Cited in Baker,H. and O. Frank. 1968. The vitamin. Vol. II. Clinical Vitaminology. John Willey & Sons , Inc., New York.

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

41. Shorb, M.S. 1948. Activity of vitamin B_{12} for the growth of Lactobacillus lactis . Science. 16 : 397-398.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25. Kamikubo, T. and R. Takata. 1953. Vitamins (Kyoto) 6,581. Cited in Knivette, V.A. 1960. The microbiological production of vitamin B_{12} and sulfide from sewage. Progress in Industrial Microbiology. 2 : 27-45.

26. Kolhouse, J.F., H. Kondo, N.C. Allen, E. Podell and R.H. Allen . 1978. Cobalamin Analogues are present in human plasma and can mask cobalamin deficiency because radioisotope assays are not specific for true cobalamin New Engl. J. Med. 299:785-792

27. Long, R.A. 1962. U.S. Patent 3, 018,225. Cited in Noyes, R. 1969. Vitamin B12 manufacture. Noyes Developement Corp., New York.

28. Mervyn, L. and E.L. Smith. 1964. The biochemistry of vitamin B_{12} fermentation. Progress in Industrial Microbiology. 5:151-201.

29. Miller, M.W. 1961. The Pfizer Handbook of microbial Metabolites. McGraw Hill Book Company, Inc., New York.

30. Nishio, N., Y. Tsuchiya, M. Hayashi and S. Nagai. 1977. A fed-bacth culture of methanol-utilizing bacteria with pH stat. J. Ferment Technol. 55:151-155.

31. Noyes, r. 1969. Vitamin B12 manufacture. Noyes Development Corp, New York.

32 Ordanik, M.1951. Bact. Proc. 51 st meeting: 72. Cited in Darken, M.A. 1953. Production of vitamin B_{12} by microorganisms and its occurence in plant tissue. The Bot . Rev. 19 : 99 - 121 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

42. Sjostrom, A.G.M., H.Y. Heujahr and H. Lundin . 1953. Acta Chem. Scand. 7, 1036. Cited in Knivette, V.A. 1960. The microbiological production of vitamin B_{12} and sulfite from seuage. Progress in industrial Microbiology. 2: 27-45.

43. Skeggs, H., H.A. Nepple, K.A. Valentile, J.W. Huff and L. Wright. 1950. Observation on the use of Lactobacillus leichmanii ATCC 4797 in the microbiological assay of vittamin B_{12}. J.Biol.Chem. 184: 211-221.

44. Stadtman, T.C. 1971. Vitamin B_{12} : Biochemical studies elucidate the role of this complex molecules in diverse metabolic process. Science. 171:859-866.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้