สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋องเพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (TISRT 446)

นาย ณัฐวุฒิ สุรณัฐกุล
นาย ทวีป เผือกเทศ
นาย นิยม มาลัยเลิศ

ว.พ.
ณ362ก
2536
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....
6/2538334

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2536

The Utilization of Waste Water from Tuna can Industry for Vitamin B_{12} Production by Propionibacterium freudenreichii (TISRT 446)

Mr. Nattawut Suranattakul
Mr. Thaweep Phuakthet
Mr. Niyom Malailerd

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

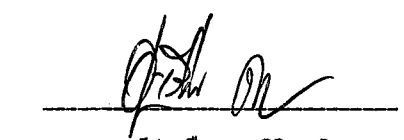
หัวข้อโครงงานพิเศษ การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋องเพื่อผลิตวิตามินบี12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (TISRT 446)

โดย นาย ณัฐวุฒิ สุรณัฐกุล
นาย ทวีป เผือกเทศ
นาย นิยม มาลัยเลิศ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. สุขใจ ชูจันทร์
อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์

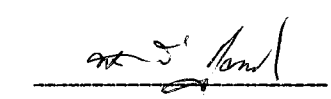
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต



หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(อาจารย์อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ



ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

_____ กรรมการ

(ผศ. สุขใจ ชูจันทร์)

กรรมการ

(อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋องเพื่อผลิตวิตามินบี12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (TISRT 446)

โดย นาย ณัฐวุฒิ สุรณัฐกุล
นาย ทวีป เผือกเทศ
นาย นิยม มาลัยเลิศ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. สุชใจ ชูจันทร์
อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2536

บทคัดย่อ

การผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ที่เจริญในอาหารที่เป็นน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง เปรียบเทียบกับการใช้ complete medium พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium คือ พีเอช เริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (initial O.D. เท่ากับ 0.5) เท่ากับ 0.395 กรัมต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ 660 นาโนเมตร ในสภาพ stationary flask เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Prop. freudenreichii ... ส่วนการเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องตามสภาวะที่เหมาะสม โดยเติมแหล่งสารอาหารต่างๆ พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ น้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSo_4.7H_2O$ ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร methionine และ riboflavin 2 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ให้การผลิตวิตามินบี 12 เป็น 4.25 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่โมงที่ 48) เมื่อเทียบกับการเจริญใน complete medium ซึ่งให้การปริมาณวิตามินบี 12 เพียง 0.64 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 72) ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 84.94 เปอร์เซนต์

ผลการเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในถังหมักขนาด 1.0 ลิตร มีการกวนที่ 100รอบต่อนาที โดยไม่ให้อากาศ พบว่าเมื่อใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง ให้การผลิตวิตามินบี 12 เป็น 4.59 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 48) ขณะที่ใช้อาหาร complete medium ให้การผลิตวิตามินเพียง 0.66 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง (ในชั่วโมงที่ 72) ซึ่งการใช้น้ำทิ้งปลาให้การผลิตวิตามินบี12 สูงกว่า 85.62 เปอร์เซนต์

จากการวิเคราะห์ค่า BOD ของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องและน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ ในปริมาณที่เหมาะสม พบว่ามีค่า BOD เท่ากับ 34,650 และ 61,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii แล้วค่า BOD ลดลงเป็น 9,750 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii สามารถลดค่า BOD น้ำทิ้งปลาและน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ ได้ 71.86 และ 84.02 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

Special Project Title	The Utilization of Waste Water fromTuna can industry for VitanimB_{12} production by Propionibacterium freudenreichii (TISRT 446)
Name	Mr. Nattawut Suranattakul
	Mr. Thaweep Phuakthet
	Mr. Niyom Malailerd
Special Project Advisor	Asst.Prof. Sukjai Choojan
	Mr. Somchai Krairak
Department	Applied Biology
Acedemic Year	1993

Abstract

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

Growth and vitamin B_{12} production experiment were performed using waste water with supplemented various chemicals.The result revealed that 2 milligrams per litre of $CoSo_4.7H_2O$ as cobalt source, methionine and riblflavin were 2 and 0.01 milligrams per 100 millilitres, respectively are the best for growth and vitamin B_{12} production of Prop. freudenreichii. After 48 hours of incubation at stationary flask, the fermentation liquors of waste water contained 4.25 micrograms per gram of dry weight cell. And after 72 hours of complete medium contained 0.64 micrograms per gram of dry weight cell. The production of waste water was more than 84.94 percent when compared with complete medium.

Optimization of vitamin B_{12} production was studied by batch fermenter with agitation at 100 rpm. After 48 hours the fermentation liquors contained 4.59 micrograms per gram of dry weight cell in supplemented waste water and after 72 hours complete medium contained 0.66 micrograms per gram of dry weight cell .The production of waste water was more than 85.62 percent when compared with complete medium

For non supplemented waste water, up to 71.86 percent reduction of 5-day BOD was achieved, from 34,650 milligrams per litre to 9,750 milligrams per litre. For supplemented waste water, up to 84.02 percent reduction of 5-day BOD was achieved, from 61,000 milligrams per litre to 9,750 milligrams per litre after bacterial separation.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความร่วมมือและช่วยเหลือของบุคคล ดังต่อไปนี้

1. ผศ. สุขใจ ชูจันทร์ และ อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้ความรู้ และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขเอกสารให้

2. คุณ ลาวัณย์ เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ผู้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

3. ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ผู้ซึ่งให้ความสะดวกเรื่องสถานที่ ที่ใช้ทำการทดลอง ตลอดจนเครื่องมือที่ใช้ทำการทดลองต่าง ๆ

4. บริษัท ซาฟโก้ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง

5. เจ้าหน้าที่ภาควิชาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกต่าง ๆ

และขอขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำการโครงงานพิเศษ รวมทั้งการจัดพิมพ์เอกสารจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

25 มีนาคม 2537

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	5
1. ลักษณะรูปร่างคุณสมบัติและประวัติการผลิตวิตามินบี12 ของ Propionibacterium spp.	5
2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium spp	13
อาหาร	13
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามิน บี 12	15
3. การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	16
4. การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์ (Microbiological assay)	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	26
บทที่ 4 ผลการวิจัย และวิจารณ์	36
1. ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.)และน้ำหนักเซลล์แห้ง(dry weight cell) ของเชื้อ Prop. freudenreichii	36
2. ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น(inoculum size)	36
3. ผลการศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด (maximum yeild) ของเชื้อProp. freudenreichiiในน้ำทิ้งจากกรับวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องและน้ำทิ้งเติม สารต่างๆ	36
4. ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคส	36
5. ผลการเปรียบเทียบปริมาณ yeast extract	37
6. ผลการเปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์	37

7. ผลการศึกษาการเจริญ , ปริมาณเซลสูงสุดและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ณ สภาวะ stationary flask ในน้ำทิ้งปลาต่างๆ 37
8. ผลการศึกษาการเจริญ , ปริมาณเซลสูงสุดและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อProp. freudenreichiiในcomplete medium และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ ณ สภาวะ stationary flask และถังหมักที่มีระบบการกวน 37
9. ผลการวิเคราะห์ Biochemical Oxygen Demand (BOD) 38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 63
ภาคผนวก 65
เอกสารอ้างอิง 135

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	9
2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12	9
2.3 แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionic acid bacteria	10
2.4 แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12ของ Propionic acid bacteria	10
2.5 แสดง precess and media used for industrial productionof vitamin B_{12}	23
4.1 แสดงค่าพีเอช, BOD, suspended solid เปอร์เซนต์คาร์โบไฮเดรต และเปอร์เซนต์โปรตีนของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง ของบริษัท ซาฟโก้ จำกัด	38
4.2 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่าง ณ สภาวะstationary flaskชั่วโมงที่ 48	50
4.3 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่าง ณ สภาวะstationary flaskชั่วโมงที่ 72	51
4.4 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่าง ณ สภาวะstationary flaskชั่วโมงที่ 96	52
4.5 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่าง ณ สภาวะstationaryflaskชั่วโมงที่ 120	
4.6 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และในถังหมักที่มีระบบการกวน ชั่วโมงที่ 24	57
4.7 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และในถังหมักที่มีระบบการกวน ชั่วโมงที่ 48	58

4.8 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และในถังหมักที่มีระบบการกวน ชั่วโมงที่ 72 59

4.9 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และในถังหมักที่มีระบบการกวน ชั่วโมงที่ 96 60

4.10 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationary flask และในถังหมักที่มีระบบการกวน ชั่วโมงที่ 120 61

จ.1 แสดงค่า พีเอช ของน้ำทิ้งปลา 84

จ.2 แสดงค่า Suspened solid ของน้ำทิ้งปลา 84

จ.3 แสดงค่าน้ำหนักของน้ำทิ้งปลาปริมาตร 1 มิลลิลิตร 84

จ.4 แสดงปริมาตรกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.1 N. ที่ใช้ไตเตรตหาปริมาณ Crude protein 85

จ.5 แสดงการวิเคราะห์ total carbohydrate ของสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ค่า O.D. 488 นาโนเมตร โดยวิธี Phenolic method 85

จ.6 แสดงการวิเคราะห์ total carbohydrate ของน้ำทิ้งปลาที่ค่า O.D.488 นาโนเมตร โดยวิธี Phenolic method 85

จ.7 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งปลา 86

จ.8 แสดงค่าdissolved oxygen ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและriboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรก่อนเติมเชื้อ Prop. freudenreichii 86

จ.9 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและriboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรเมื่อสิ้นสุดชั่วโมง 120 86

จ.10 แสดงค่า 5-day BOD ของน้ำทิ้งปลา 87

จ.11 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบความเหมาะสมของกล้าเชื้อที่ใช้ของเชื้อ Prop. freudenreichii 87
จ.12 แสดงผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete mediumสภาวะ stationary flask พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์ 88
จ.13 แสดงผลการศึกษาค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรและน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry weight cell) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium สภาวะ stationary flask พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง 88
จ.14 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ glucose และ yeast extract ต่อการเจริญของเชื้อProp. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาสภาวะ stationary flask พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 89
จ.15 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ glucose ปริมาณต่างๆ ต่อการเจริญ ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์สภาวะ stationary flask พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 89
จ.16 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ปริมาณต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติม glucose 1.0 เปอร์เซนต์สภาวะ stationary flask พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 90
จ.17 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของเกลือโคบอลท์ ปริมาณต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichiiในน้ำทิ้งปลาสภาวะ stationary flask พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 91
จ.18 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 48 92
จ.19 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆชั่วโมงที่ 48 92
จ.20 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 72 93
จ.21 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆชั่วโมงที่ 72 93
จ.22 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 96 94
จ.23 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆชั่วโมงที่ 96 94
จ.24 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 120 95

จ.25 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลา ที่เติมสารต่างๆชั่วโมงที่ 120 95
จ.26 แสดงค่า O.D ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 24 96
จ.27 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในcomplete medium ชั่วโมงที่ 24 96
จ.28 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 48 97
จ.29 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ชั่วโมงที่ 48 97
จ.30 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 72 98
จ.31 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ชั่วโมงที่ 72 98
จ.32 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 96 99
จ.33 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ชั่วโมงที่ 96 99
จ.34 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 120 100
จ.35 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ชั่วโมงที่ 120 100
จ.36 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 24 101
จ.37 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลา เมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 24 101
จ.38 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 48 102
จ.39 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลา เมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 48 102
จ.40 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 72 103
จ.41 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลา เมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 72 103
จ.42 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 96 104

จ.43 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลา
เมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ
100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 96 104
จ.44 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ working standard ชั่วโมงที่ 120 105
จ.45 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลา
เมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100
มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 120 105

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการ dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย propionic acid bacteria	6
2.2	แสดง ribofalvin เป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12	15
2.3	Structure of vitamin B12 and related compounds	17
2.4	แสดงสมมติฐานของ biosynthesis pathway	18
2.5	แสดงการสังเคราะห์ corrin ring	19
4.1	แสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii (กรัม/ลิตร) กับค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร	39
4.2	แสดงกราฟมาตรฐานกลูโคสที่ค่า O.D. 488 นาโนเมตร โดยวิธี Phenolic method	40
4.3	แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichhii ใน complete medium ณ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเวลเซียส เปรียบเทียบกล้าเชื้อ 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์	41
4.4	แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium ณ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์	42
4.5	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium , น้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ	43
4.6	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium , น้ำทิ้งปลา , น้ำทิ้งปลาเติม glucose ในปริมาณต่างๆ และ yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์	44
4.7	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium , น้ำทิ้งปลา , น้ำทิ้งปลาเติม yeast extract ในปริมาณต่างๆ และ glucose 0.5 เปอร์เซนต์	45
4.8	แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4.7H_2O$ ในปริมาณต่างๆกัน	46
4.9	แสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ	47
4.10	แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร) กับ เวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii	48

4.11 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) กับเวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii 49
4.12 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อProp. freudenreichii ในระหว่างการหมักกับระยะเวลาในการเจริญ 54
4.13 แสดงปริมาณวิตามินบบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)กับระยะเวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii 55
4.14 แสดงปริมาณวิตามินบบี 12 (ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง)กับระยะเวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii 56
4.15 แสดงค่า BOD ของน้ำทิ้งปลาสภาวะต่างๆ 62
จ.1 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 48 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ในน้ำทิ้งปลาและน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ 106
จ.2 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 72 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ในน้ำทิ้งปลาและน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ 107
จ.3 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 96 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ในน้ำทิ้งปลาและน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ 108
จ.4 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่120 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ในน้ำทิ้งปลาและน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ 109
จ.5 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 24 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก 110
จ.6 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 48 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก 111
จ.7 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 72 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก 112
จ.8 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 96 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก 113
จ.9 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่120 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก 114

จ.10 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่24 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และ ในถังหมัก 115
จ.11 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่48 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และ ในถังหมัก 116
จ.12 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่72 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และ ในถังหมัก 117
จ.13 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่96 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และ ในถังหมัก 118
จ.14 แสดง calibration curve ของ working standardชั่วโมงที่120 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบบี 12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และในถังหมัก 119
ฉ.1 แสดงการกรองน้ำทิ้งปลาจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง 120
ฉ.2 แสดงน้ำทิ้งปลาก่อนกรองและน้ำทิ้งปลาหลังกรอง 121
ฉ.3 แสดงอาหาร complete medium ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii 122
ฉ.4 แสดงกล้าเชื้อของ Prop. freudenreichii ใน complete medium 123
ฉ.5 แสดงกล้าเชื้อของ Prop. freudenreichii ใน น้ำทิ้งปลา 124
ฉ.6 แสดงน้ำทิ้งปลาใน Batch fermenter ก่อนเติมกล้าเชื้อ 125
ฉ.7 แสดงน้ำทิ้งปลาใน Batch fermenter หลังเติมกล้าเชื้อ 126
ฉ.8 แสดง stock culture ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii 127
ฉ.9 แสดงการเจริญของ Lactobacillus leichmannii ใน micro inoculum broth 127
ฉ.10 แสดง vitamin B12 standard solution 129
ฉ.11 แสดง single strength assay medium 130
ฉ.12 แสดง double strength assay medium 131
ฉ.13 แสดงการเตรียม standard assay tube 132
ฉ.14 แสดงการเตรียม sample assay tube 133
ฉ.15 แสดงการบ่มเชื้อ Lactobacillus leichmannii ใน standard assay tube และ sample assay tube ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 134

บทที่ 1

บทนำ

วิตามินบี 12 จัดเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งมนุษย์ หนึ่งในจำนวนนั้นคือวิตามิน 12 เป็นองค์ประกอบของตับและช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง แม้ว่ามนุษย์จะมีความต้องการในปริมาณน้อย แต่ถ้าขาดก็จะทำให้เกิดโรคโลหิตจาง และเกิดอาการทางประสาทได้สูตรโมเลกุลของวิตามินบี 12 คือ $C_{63}H_{88}O_{14}PCo$ และมีชื่อทางเคมีว่า a- 5,6 - dimetyhylbenzimidazolyl cobamide หรือเรียกสั้นๆ ว่า cyanocobalamin (3) มีลักษณะเป็นผลึกสีแดงเข้ม รูปเข้มหรือปริซึม

วิตามินบี 12 ที่ผลิตได้มีความสำคัญทางด้านการแพทย์ การเกสัชกรรม และทางด้านการเกษตรในทางการแพทย์ใช้ป้องกันโรคโลหิตจางเช่น megaloblastic anemia,pernicious anemia และ macrotic anemia (3,4) ด้านเกสัชกรรมใช้เป็นยารักษาโรค ยาบำรุง และส่วนประกอบของยาบางชนิด ด้านการเกษตรกรรมมีประโยชน์เพื่อเป็นอาหารเสริมโปรตีน (animal protein factor supplement) (4) ในสัตว์ปีกและหมูที่เลี้ยงด้วยโปรตีนจากพืชเป็นแหล่งอาหารโปรตีนแต่เพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นในทางจุลชีววิทยาก็ใช้ประโยชน์เป็น growth factor ในการเลี้ยงจุลินทรีย์บางชนิด เช่น Lactobacillus lactis ,Lactobacillus , Escherichia coli ตลอดจนสาหร่ายชั้นต่ำบางชนิด (3)

ปัจจุบันการสังเคราะห์วิตามินบี 12 โดยทางเคมีทำได้ยาก เพราะเป็นปฏิกิริยาที่ซับซ้อน ฉะนั้นการผลิตจึงอาศัยทางจุลชีววิทยา ซึ่งมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรีย สำหรับสายพันธุ์ที่สามารถผลิตได้ในปริมาณสูงได้แก่ Propionibacterium sp. และ Pseudomonas sp.(1) ดังนั้นจึงใช้เชื้อ Propionibacterium freudenreichii (TISRT 446)ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นปริซึมสีแดงเข้ม มีสูตรโมเลกุล $C_{63}H_{88}O_{14}PCo$ มีชื่อทางเคมีว่า a-5,6 dimethylbenzi-midazolyl cobamide หรือมีชื่อสั้น ๆ ว่า cyanocobalamin

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตวิตามินบี 12 ในรูป โคเอนไซม์บี 12 หรือ DBCC นอกจากนั้นยังพบในรูป Methyl cobalamin และในกรณีจุลินทรีย์เป็นพวกต้องการอากาศ ก็อาจพบ hydroxocobalamin วิตามินบี12 ทั้ง 3 รูปนี้ไม่คงตัว ส่วนวิตามินบี 12 ในรูปคงตัวและร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่จะอยู่ในรูป cyanocobalamin

Berhaver et al (3) เสนอว่า น้ำเหลือทิ้งจากการผลิตสารบางชนิดโดยจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ผลิตวิตามินบี 12 ได้ เช่น น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเบียร์ น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตยาปฏิชีวนะ น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก น้ำเหลือทิ้งจากจากอุตสาหกรรมผลิต butanol

และ acetone ดังนั้นการนำเอาน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องจึงเป็นการนำเอาของเสียมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยการนำมาเป็นอาหารสำหรับแบคทีเรียเพื่อผลิตวิตามินบี 12 นอกจากนั้นยังอาจช่วยลดค่า BOD ซึ่งเป็นปัญหาต่อการเสื่อมคุณภาพของแหล่งน้ำ

เหตุจูงใจในการทำโครงงานพิเศษ

1. วิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่สังเคราะห์โดยจุลินทรีย์เท่านั้น เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีทำได้ยาก และในปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์มีความต้องการมาก เพื่อใช้เป็นอาหารเสริม

2. เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย และนำวัสดุเหลือทิ้งมาทำให้เกิดประโยชน์

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง

2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 เชื้อ Propionibacterium freudenreichii

3 . เพื่อศึกษาการผลิตวิตามิน B_{12} ในถังหมักขนาด 1 ลิตร

วิธีการดำเนินการโดยย่อ

การดำเนินการโครงงานพิเศษ แบ่งออกเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง

ขั้นที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

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

ขั้นที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และจัดทำรายงาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีการผลิตวิตามินบี 12 อันเป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม
2. เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ การเภสัชกรรม การอาหาร และการเกษตรกรรม
3. เพื่อเป็นแนวทางในการทำการวิจัยที่เกี่ยวกับวิตามินบี 12 ต่อไป

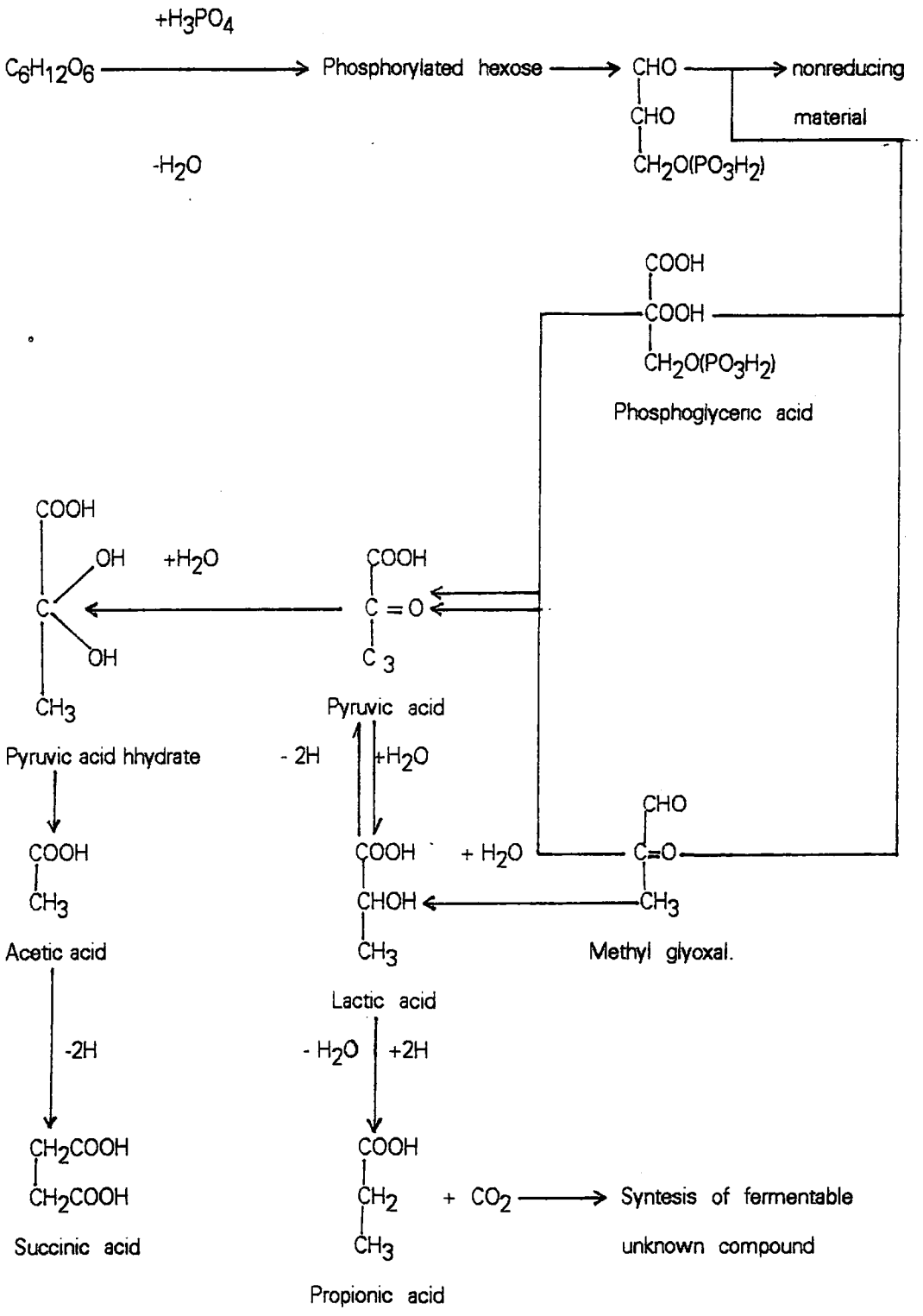
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. การศึกษาลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.

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

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



รูปที่ 2.1 แสดง Dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย Propionic acid bacteria

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

Acid hydrolysate of casein	10.0	กรัม
L-Tryptophan	0.2	กรัม
L-Cystine	0.4	กรัม
Asparagin	0.2	กรัม
Xathine	0.02	กรัม
Adenine ,guanine ,uracil	0.02	กรัม
Riboflavin ,thiamine	1.0	มิลลิกรัม
Niacin	2.0	มิลลิกรัม
Biotin	8.0	ไมโครกรัม
Pyridoxine ,pyridoxal	4.0	มิลลิกรัม
Pyridoxamine	0.08	มิลลิกรัม
d-Calcium pantothenate	1.0	มิลลิกรัม
Para-aminobenzoic acid	2.0	มิลลิกรัม
Tween 80 solution	2.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
KH_2PO_4 ,K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0.4	กรัม
NaCl , $FeSO_4$, $MnSO_4$	0.02	กรัม
N/5 phosphate	50.0	มิลลิลิตร
Buffer pH	6.8	

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตรปรับพีเอชให้เป็น 6.8 โดยใช้ NaOH ปรากฏว่าให้วิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และจาก Prop. shermanii 3 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณต่ำจากมาตรฐานที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการทดลองค้นคว้าต่อไป เพื่อให้ได้วิตามินบี 12 มากขึ้น โดยการปรับความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกแหล่งคาร์บอน, ไนโตรเจน และอื่น ๆ ดังนี้

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

2. ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้กรดแลคติก 10 กรัม แทน dextrose 20 กรัม บ่มที่

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

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

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

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

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

ตารางที่ 2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

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

ตารางที่ 2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

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

ตารางที่ 2.3 แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

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

ตารางที่ 2.4 แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เปอร์เซนต์วิตามิน B_{12}				(ไมโครกรัมต่อลิตร)
	Yeast extract	Beef extract	Sodium lactate	N-Z amide	
1	0.4	-	1.0	-	300
2	0.4	-	1.0	0.5	330
3	0.4	-	1.0	1.0	430
4	-	0.3	1.0	1.0	390
7	-	0.6	1.0	1.0	440
8	-	1.0	1.0	1.0	460
9	-	-	1.0	1.0	80
10	0.5	-	1.0	1.0	440
11	1.0	-	1.0	1.0	450
12	1.5	-	1.0	1.0	460

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่เติมสารนั้น

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

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

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

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

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

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

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

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

$CoSO_4.7H_2O$	12.0	มิลลิกรัม
pantothenic acid	4.0	มิลลิกรัม
biotin	0.3	มิลลิกรัม
yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1.0	ลิตร

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

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

Lim (35) ได้ทดลองเพื่อศึกษาว่า กรดอะมิโนตัวใดที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii (ATCC 6207) โดยใช้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เช่น alanine, leucine, isoleucine, tyrosine, methionine, glutamic acid และอื่น ๆ ปรากฏว่า glycine ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 จึงทดลองเลี้ยง Prop. freudenreichii ในอาหารที่ประกอบด้วย

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

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

Renz และ Wey henmeyer (53) ศึกษาการสังเคราะห์ dimethyl benzimidazole (5,6-DMBIA) จากวิตามินบี 2 (riboflavin) โดยใช้เชื้อ Prop. shermanii strian 33 ใช้แบคทีเรียอายุ 3 วัน ซึ่งมีน้ำหนักเปียก 0.35 กรัม ละลายใน phosphate buffer เข้มข้น 0.07 M พีเอช 7.0 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม 1-^{14}C - riboflavin ลงไปประมาณ 5 มิลลิกรัม นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 40 ชั่วโมง

ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองปรากฏว่า C-2 ของ 5,6-DMBIA มาจาก 1-^{14}C-riboflavin และได้วิตามินบี 12 บริสุทธิ์ 5.95 มิลลิกรัมต่อ 0.35 กรัมของเชื้อ

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium ssp.

2.1 อาหาร

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

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

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

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

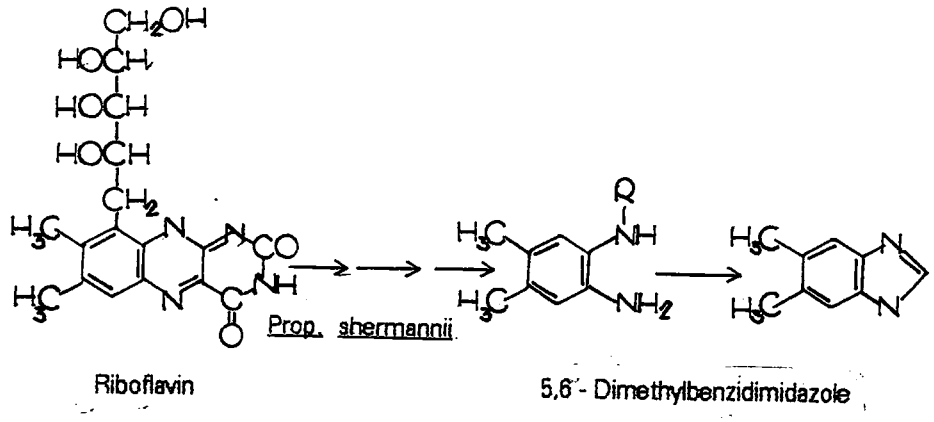
Osman (48) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ จากเกลือแอมโมเนีย พบว่า แอมโมเนียมซิเตรท แอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium shermanii

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

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

เหล็ก (Fe) มีความสำคัญต่อการเจริญ และผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii ส่วนแมกนีเซียมมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ทองแดง (Cu) และบิสมัท (Bi) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ธาตุอื่น ๆ นอกจากที่กล่าวมาแล้วไม่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ขณะที่ผงซักฟอกจะยังยั้งการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 สารที่มีคุณสมบัติในการยังยั้งขบวนการ เมตา-บอไลท์ ของจุลินทรีย์จะยับยั้งการเจริญ และการสร้างวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii (53)

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



รูปที่ 2.2 แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญ

2.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12

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

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

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

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

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

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

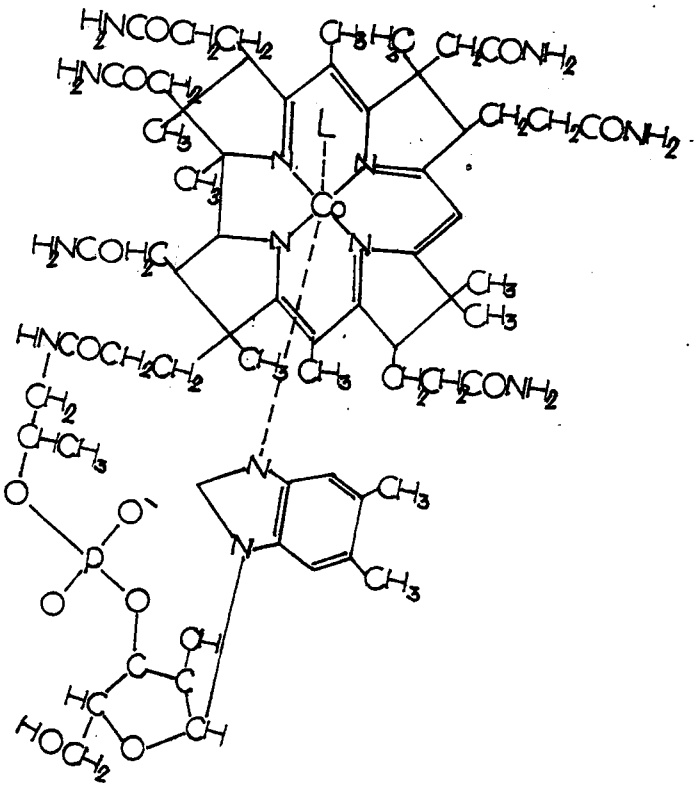
Baron (10) พบว่าเมื่อเติม thickening agent ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารนั้นโดยไม่ต้องมีการกวน และมีประโยชน์มากในแง่การเจริญ และ activity ของเซลในสภาพนี้ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นและได้ cobalamin เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ thickening agent ที่เติมลงไปทำให้แบคทีเรียมีความทนทาน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

3. การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

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

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

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



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

Triivial names and avvreviations are given in parentheses.

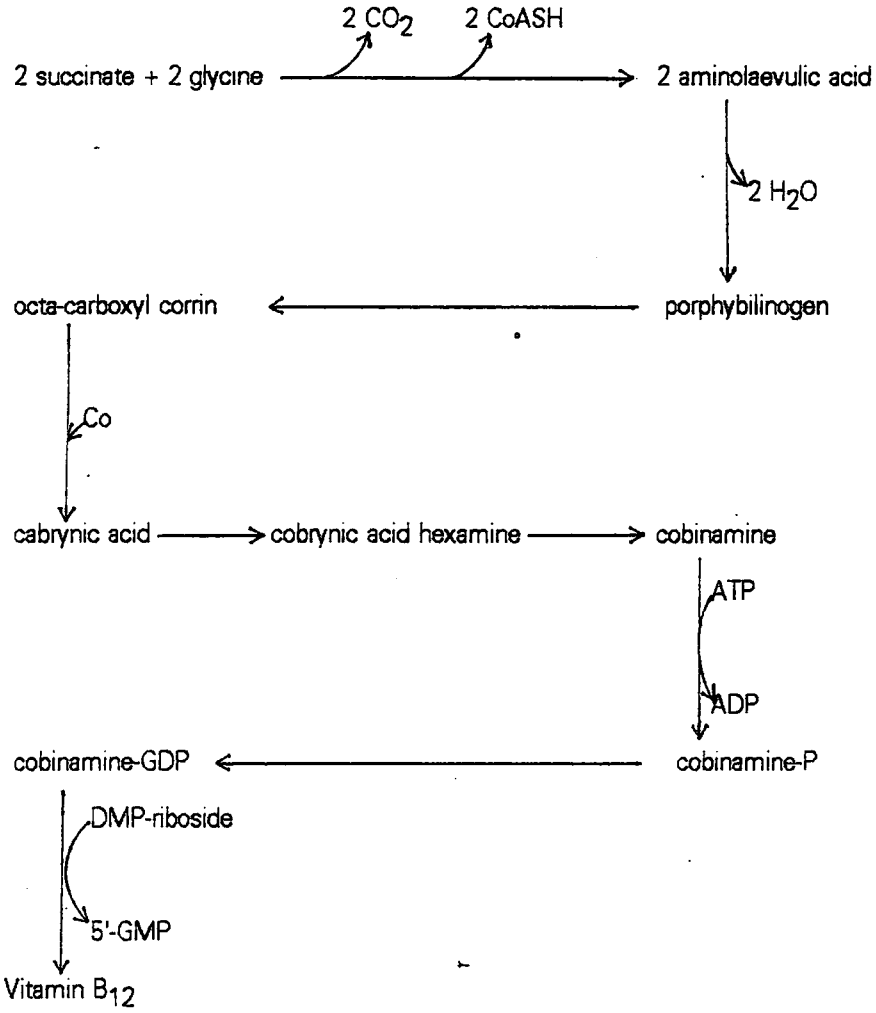
L = CN : 6 - (5,6-dimethylbenzimidazole) cobamide cyanide or cyanocobalamin (vitamin B_{12} : CNB_{12} ; cyano-B-12)

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

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

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

สมมติฐานวิถีการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางชีวภาพเสนอโดย Boretti et al (12) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงสมมติฐานของวิถีการสังเคราะห์ ของวิตามินบี 12

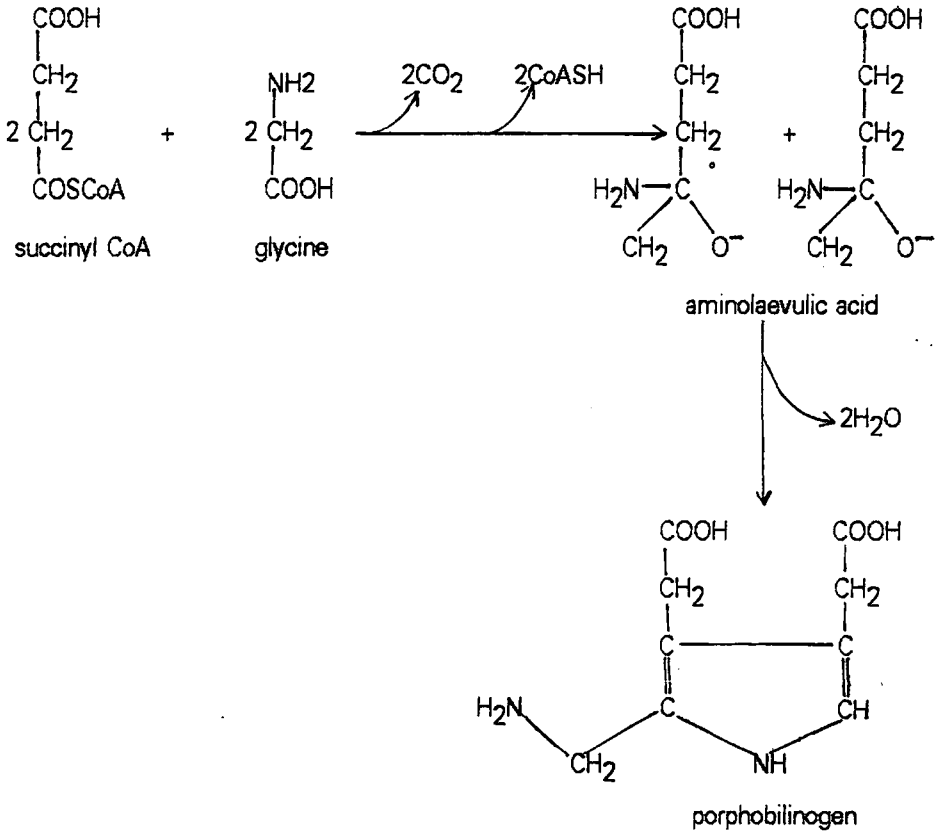
ADP = adenosine diphosphate ATP = adenosine triphosphate

GMP = guanosine monophosphate GTP = guanosine diphosphate

DMP-riboside = dimethylbenzimidazole-riboside

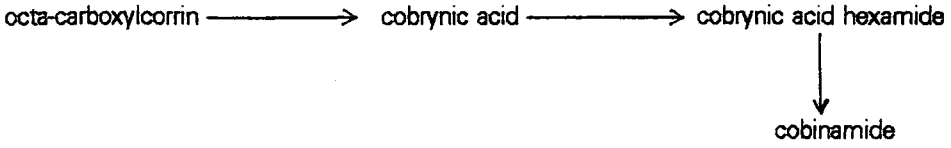
จากสมมติฐานวิถีสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางชีวภาพข้างบนนี้ สามารถแบ่งเป็น 4 ขั้น

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

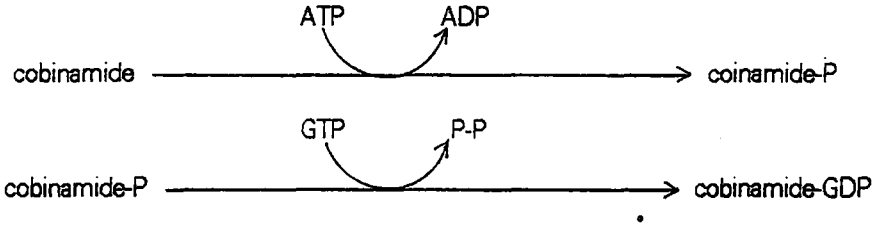


รูปที่ 2.5 แสดงการสังเคราะห์ corrin ring

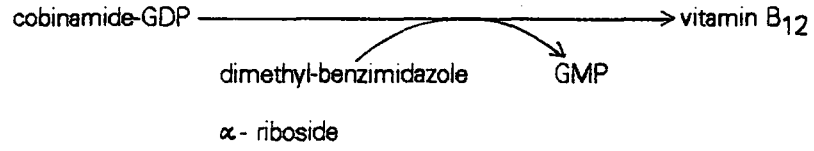
macroring อันดับแรกที่เกิดขึ้น คือ octacarboxylcorrin และจะเปลี่ยนต่อไปโดยการ methylation decarboxylation และ co-ordination ด้วยโคบอลท์ไปเป็น corynic acid และเปลี่ยนเป็น cobrynic acid hexamide และเปลี่ยนเป็น cobinamide ในที่สุด



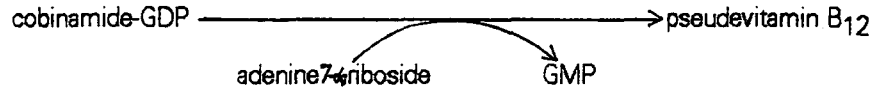
2. Incorporation of nucleotide residue Boretti et al. (18) กล่าวว่า cobinamide จะถูก activate ให้อยู่ในรูป cobinamide - GTP ซึ่งเป็น intermidiate ที่สำคัญใน biosynthesis ของวิตามินบี 12 ดังนี้



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



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



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

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

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

แบคทีเรีย ได้แก่

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

แอคทิโนมัยซีส ได้แก่

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

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

My. tubercurosum (18)

Sreptomyces albidoflavus(18)

St. vinaces(18)

St. aureofaciens (30)

St. farinosus (18)

St. griseus (30)

Norcardia rugosa (37)

St. antibioticus (18)

St. aureus (18)

St. colombiensis (18)

St. fradiae (18)

St. olivaceus (23,24,25)

ยีสต์ ได้แก่

Torula sp. (65)

รา ได้แก่

Penicillium lilacinum (60)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ได้แก่

Anabaena cylindrica (18)

Claothrix parietina (18)

Plectonema nostocorum (18)

สาหร่ายทะเล (marine algae) ได้แก่

Ceranium rubrum (18)

Champia parvula (18)

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

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

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

4. การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์ (Microbiological assay)

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

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

2. Escherichia coli (mutant)

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

3. Euglena gracilis

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

4. Orchromonas malhamensis

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

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

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

2. Lactobacillus liechmannii ใช้วิเคราะห์หาวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยเก็บ Stock cultureใน tomato juice agar แบบ Agar stab (ภาคผนวก ก)

วัสดุเหลือใช้

น้ำทิ้งจากการผลิตปลาทูน่ากระป๋องได้รับจาก บริษัท ซาฟโก้ จำกัด อ. สำโรง จ. สมุทรปราการ

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. Suction pump
2. Autoclave
3. Incubator
4. Hot air oven
5. Centrifuge
6. Spectrophotometer
7. Kjeltec System 1002 Distilling Unit
8. Autoburette
9. Water bath
10. Fermenter
11. Air pump
12. Assay tube ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร

13. Quewett
14. ขวด BOD.
15. Hot plate
16. pH meter
17. เครื่องชั่ง
18. Autopipette
19. Autosyringe
20. Hot plate
21. ชุดกลั่นน้ำกลั่น
22. Centrifuge
23. เครื่องแก้วต่างๆ

สารเคมี

1. Glucose
2. Yeast extract
3. $CoSO_4.7H_2O$
4. H_2SO_4
5. NaOH
6. Methionine
7. Riboflavin
8. Cyanocobalamin
9. Vitamin B12 assay medium
10. $Na_2SO_3.5H_2O$
11. Boric acid
12. Phenol
13. Na_2CO_3
14. H_2Bo_4
15. Methyl red
16. Bromcresol green
17. Phosphate buffer
18. Magnesium sulfate
19. $CaCl_2$
20. Furic choride

21. Manganese sulfate

22. Alkali - Iodide - Azide

23. $Na_2S_2O_3$

24. Potassium dicromate

25. สารละลายน้ำแป้ง

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหารที่ใช้ผลิตวิตามินบี 12

1.1 การเตรียม Complete medium ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดในภาคผนวก ก.

1.2 การเตรียมน้ำทิ้งปลาเพื่อการเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 แบ่งน้ำทิ้งใส่ขวดสีชาแช่แข็งไว้ เพื่อสะดวกต่อการนำไปใช้

1.2.2 เมื่อจะนำมาใช้ให้ละลายโดยแช่ในอ่างที่มีน้ำหล่ออยู่

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

1.2.4 เติมสารเคมีบางชนิดในปริมาณที่ต้องการศึกษาในแต่ละการทดลอง

1.2.5 ปรับพีเอชตามที่ต้องการด้วย NH_4OH 15 เปอร์เซนต์ หรือ HCl 15 เปอร์เซนต์

1.2.6 นำมานึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. การหาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด (Maximum yield)

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

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

2.1.2 บ่มฟลาสก์ในข้อ 2.1.1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

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

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

2.2 การเตรียมกล้าเชื้อโดยใช้น้ำทิ้งปลา

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

2.2.2 บ่มที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

2.3 การวัด O.D. ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

2.3.1 เตรียมอาหารที่จะศึกษาบรรจุลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร

2.3.2 เติมกล้าเชื้อ จากข้อ 2.1.4 ลงในฟลาสก์โดยทำ 2 ซ้ำ ทุก ๆ การทดลอง

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

2.3.4 นำแต่ละฟลาสก์มาวัดค่า O.D. โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันกับที่ทำการศึกษาเป็น blank

2.3.5 จดค่า O.D. สองซ้ำในระยะเวลาที่กำหนดหาค่าเฉลี่ย

2.4 ศึกษาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยเปรียบเทียบระหว่างกล้าเชื้อ 2 เปอร์เซนต์ และกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์

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

2.4.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

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

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

2.6 การหาการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด โดยอ่านผลจากกราฟแสดงการเจริญเติบโต ปริมาณเซลล์สูงสุด อ่านค่าได้จาก O.D. ที่มีค่าสูงสุด

3. การเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry weight cell)

3.1 เลี้ยงเชื้อในอาหาร Complete medium จนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์สูงสุดประมาณ 4 วัน

3.2 เมื่อครบวันที่ 4 แบ่งใส่หลอด Centrifuge ปั่นด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

3.3 รินน้ำออก เติมน้ำกลั่นทำเป็น สารละลาย แล้วนำไปปั่นใหม่ทำเช่นนี้ 3 ครั้งเพื่อล้างเซลล์

3.4 เติมน้ำกลั่นจนได้ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.700

3.5 แบ่งใส่ในกระทงอะลูมิเนียมที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ

3.6 นำเข้าตู้อบทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบอีก ทำซ้ำ 3 ครั้งจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง

3.7 ทำการเจือจาง สารละลาย ที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 1:2 ,1:3 ,1:4 , 1:6 ,1:8 วัดค่า O.D. แบ่งใส่กระทงอะลูมิเนียมที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว โดยปิเปตมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ

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

4. ศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี12 ของเชื้อในน้ำทิ้งปลาจากผลิตปลาทูน่ากระป๋อง

4.1 เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่มีในอาหาร Complete medium ต่อน้ำทิ้งปลา

4.1.1 เติมน้ำทิ้งปลาที่ไม่เติมสารใดๆ ลงในฟลาสก์ ที่ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

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

4.1.3 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงในน้ำทิ้งปลา ฟลาสก์ที่ 2

4.1.4 เติมน้ำตาลกลูโคส และ yeast extract ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ และ 0.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับลงในน้ำทิ้งปลาฟลาสก์ที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญ และ ปริมาณเซลล์สูงสุด ของน้ำทิ้งปลาทั้ง 4 สภาวะ และ complete medium เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.2 เปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน complete medium ,ในน้ำทิ้งปลาที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ และ น้ำทิ้งปลาที่เติมน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่างๆกันดังนี้ 0.0 , 1.0, 1.5 , 2.0 , 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ พร้อมด้วย yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญ และ ปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.3 เปรียบเทียบปริมาณของ yeast extract

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อใน complete medium ,ในน้ำทิ้งปลาที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ และน้ำทิ้งปลาที่เติม yeast extract ในปริมาณต่างๆ กันดังนี้ 0.0 , 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 , 0.5 และ 1.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับพร้อมด้วยน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซนต์ ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.4 เปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งปลาที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ และ น้ำทิ้งปลาที่เติมโคบอลท์ในปริมาณต่างๆ กันดังนี้ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับพีเอช ให้ได้ 7.0 ศึกษาการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

5. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี12

5.1 หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ณ สภาวะ stationary flask และถังหมัก

ที่กวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48 ,72 , 96 ,120 ชั่วโมง ตามลำดับ

5.2 หาปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาที่ไม่เติมสารอาหารใดๆ กับ น้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4.7H_2O$ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร , methionine 2.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร , riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ณ สภาวะ stationay ฟลาสก์ และถังหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48 ,72 , 96 , 120 ชั่วโมง ตามลำดับ

ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี12 ในอาหารต่างใช้วิธี turbidimetric method of microbiological assay โดยเชื้อ Lactobacillus leichmannii เป็น test organism ใช้ assay medium ของ Merks ซึ่งไม่มีวิตามินบี 12 แต่มีเฉพาะสารที่สำคัญต่อการเจริญของ L. leichmannii

5.3 การเตรียมตัวอย่าง

5.3.1 ปิเปตตัวอย่างลงใน test tube 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย buffer cyanide 1 มิลลิลิตร

5.3.2 เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer

5.3.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งอยู่ Cobalamin จะถูกปล่อยออกจากเซลล์ และเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนใส

5.3.4 เจือจางส่วนใสที่ได้ เพื่อให้วิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้ โดยเจือจางในอัตราส่วน 1 , 1:10 , 1:100 , 1:1000

5.3.5 นำตัวอย่างไปหา ปริมาณวิตามินบี 12

5.4 การเตรียมสารละลาย Vitamin B_{12} standard

5.4.1 การเตรียม stock solution Vitamin B_{12} ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดในภาคผนวก ข

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

Solution A : ดูด stock solution จากข้อ 5.4.1 0.5 มิลลิลิตร เจือจางเป็น 100 เท่า โดยใช้น้ำกลั่น

Solution B : เจือจาง Solution A 0.1 มิลลิลิตร และ KCN 0.05 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร จะได้ Working standard ที่มีวิตามินบี 12 เข้มข้น 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.5 การเตรียม standard assay tube

5.5.1 นำSolution Bใส่ใน assay tube ขนาด 13 x 10 มิลลิเมตร ทำความเข้มข้นวิตามิน12 ในแต่ละหลอดเป็น 0.0 , 0.1 , 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 และ 1.0 นาโนกรัมต่อหลอด(ng) โดยแต่ละความเข้มข้นทำสองซ้ำ

5.5.2 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร

5.5.3 ใส่ double strength medium ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรได้ปริมาตรรวม 3 มิลลิลิตร

5.5.4 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cycol mixer ใส่ใน rack ปิดจุกสำลี หุ้มปิดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

5.5.5 นำทั้ง standard assay tube และsample assay tube นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น ในการ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องทำ calibration curve ทุกครั้ง เพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก calibbration curve

5.6 การเตรียม sample assay tube

5.6.1 นำ Supernatant ของ ตัวอย่าง ที่เจือจางแล้วในข้อ 5.3.4 เตรียมในลักษณะเดียวกันกับ standard assay tube (ข้อ 5.5.3.2 - 5.5.3.3)

5.6.2 ทุกหลอดผสมโดย cyclo mixer ใส่ใน rack ปิดปากหลอด assay tube ด้วยสำลีหุ้มด้วยและกระดาษอลูมิเนียม

5.6.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น

5.7 การเตรียมสารละลายของเชื้อ Lactobacillus liechmannii

5.7.1 ถ่ายเชื้อ L. liechmannii จาก Stock culture ใน agar stab ทุกวันใน 1 สัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพ active

5.7.2 เขี่ยเชื้อ L. liechmannii จาก Agar stab ที่มีอายุไม่เกิน 48 ชั่วโมงในข้อ 5.7.1 ลงใน micro-inoculum broth (ศึกษาการเตรียมจากภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

5.7.3 วัดค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร ให้ได้ความขุ่น 0.5

5.7.4 ดูด สารละลาย ของเชื้อที่ได้ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเซลล์โดยใช้หลอด centrifuge ที่ฆ่าเชื้อแล้วเอาส่วนตะกอนไว้ใช้ โดยดูดเอาส่วนใสออก

5.7.5 นำเซลล์ที่ได้มาล้างเพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 โดยใช้ single strength assay medium 10 มิลลิลิตร (ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หรือใช้ 0.85 เปอร์เซนต์ของ saline solution ผสมโดยใช้ cyclo mixer

5.7.6 นำเซลล์ไปปั่น ทำเช่นนี้ 3-4 ครั้ง แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไป

5.7.7 นำเซลล์ L. leichmannii ใส่ใน single strength assay medium 10 มิลลิลิตรจากนั้นเจือจางให้เป็น 1:10 ด้วย double strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วจะใช้เป็น สารละลายของกล้าเชื้อ

5.7.8 นำสารละลายของเชื้อที่ได้หยดลงใน standard assay tube และ sample assay tube หลอดละ 1 หยด โดยใช้ mirco pipette ยกเว้นหลอดที่ใช้เป็น blank

5.7.9 เขย่าทั้ง rack นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 36-40 ชั่วโมง

5.7.10 นำมาวัดค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร

5.7.11 เขียนกราฟและคำนาณหาปริมาณวิตามินบี 12 ในตัวอย่างออกมาเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์สารต่าง ๆ ในน้ำทิ้งปลา

6.1 วิเคราะห์หา Crude protien โดยวิธี Kjedahl method

6.1.1 ปิเปตดูดน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด digest tube

6.1.2 เติม Potassium sulfate 5 กรัม และ Copper sulfate 0.1 กรัม

6.1.3 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 10 มิลลิลิตร และใส่เศษกระเบื้องเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง

6.1.4 ทำการย่อยโปรตีนโดยใช้ Kjeltec ตั้งอุณหภูมิที่ 420 องศาเซลเซียส ทำการย่อยเป็นเวลา 30 นาที จนสารละลายเป็นสีเขียวใส

6.1.5 ทิ้งให้เย็น (ไม่ควรทิ้งให้เย็นนานจนเกินไป เพราะอาจทำให้เกลือตกผลึก และ ไม่ควรร้อนจนเกินไป อาจทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรง) เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

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

6.1.7 กลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิลิตร

6.1.8 ทำการไตเตรทสารละลายที่กลั่นด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.1 N. บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้

6.1.9 ทำการทดลองแบบเดิมอีกครั้งโดยไม่มีสารละลายตัวอย่าง ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำสารละลายที่ได้ไตเตรทกับ 0.1 N.H_2SO_4 บันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ไป

6.2 วิเคราะหาคาร์โบไฮเดรต โดยใช้วิธี Phenolic methode

6.2.1 เจือจางน้ำทิ้งในอัตราส่วน 1 , 1:10 , 1:100 , 1:1000 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.2.2 เติม Phenol 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.2.3 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปิเปตไปตรงๆ ไม่ให้โดนข้างหลอด

6.2.4 นำไปแช่เย็นในน้ำแข็ง แล้ววัดค่า O.D. ที่ 488 นาโนเมตร

6.2.5 การหา standard cuve ของ glucose

6.2.5.1 ชั่ง glucose 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

6.2.5.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 6.2.5.1 มา ปริมาตร 0.0, 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 , 1.0 มิลลิลิตร

6.2.5.3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอด

6.2.5.4 เติม Phenol 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.2.5.5 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปิเปตลงไปตรงๆ ไม่ให้โดนข้างหลอด

6.2.5.6 นำไปแช่เย็นในน้ำแข็ง แล้ววัดค่า O.D. ที่ 488 นาโนเมตร

6.3 การวิเคราะห์หาค่า BOD ตามวิธีของ American Pulbic Health Association (6)

การวิเคราะห์หาค่า BOD ในน้ำทิ้งปลา

ครั้งที่ 1 วิเคราะห์ค่า BOD ในน้ำทิ้งปลาก่อนการทดลอง

ครั้งที่ 2 วิเคราะห์ค่า BOD ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติมโคบอลท์ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร , methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ครั้งที่ 3 วิเคราะห์ค่า BOD ในน้ำทิ้งปลา หลังการเจริญเติบโตของเชื้อ ในถังหมัก ณ ชั่วโมงที่ 120

6.3.1 การวัดพีเอช

วัดพีเอชของน้ำที่ต้องการวิเคราะห์

6.3.1.1 ถ้าพีเอชมากกว่า 7 ทำให้เป็นกลางด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1 N

6.3.1.2 ถ้าพีเอชน้อยกว่า 7 ทำให้เป็นกลางด้วยด่าง NaOH เข้มข้น 1 N

6.3.2 การเตรียมน้ำเกลือเพื่อวิเคราะห์ค่า BOD

6.3.2.1 นำน้ำกลั่นปริมาณที่ต้องการเติม Phosphate buffer , magnesiun sulfate , calcium chloride และ ferric chloride อย่างละ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร

6.3.2.2 พ่นอากาศในน้ำที่เตรียมในข้อ 6.3.2.1 โดยใช้ air pump เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง

6.3.3 การเตรียม diluted ตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างเพื่อหาค่า BOD ควรทำหลายๆ dilution โดยใช้หลักทั่ว ๆไปในการทำดังนี้

0.1-1.0 เปอร์เซนต์ สำหรับ strong waste

1-5 เปอร์เซนต์ สำหรับ raw and settle sewage

5-25 เปอร์เซนต์ สำหรับ oxidize effluent

25-100 เปอร์เซนต์ สำหรับ polluted river water

6.3.3.1 ปิเปตตัวอย่างถ่ายใน dilution water ซึ่งบรรจุในกระบอกตวงขนาด 1 ลิตร

6.3.3.2 ค่อย ๆ คน dilution water และ ตัวอย่าง O.D. 3 ขวด

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

6.3.4 การหา dissolved oxygen

6.3.4.1 เติม $MnSO_4$ 2 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มอยู่ในน้ำ

6.3.4.2 เติม A-I-A 2 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มอยู่ในน้ำ

6.3.4.3 ปิดจุกเขย่าขวดแบบคว่ำและหงายสลับกัน จนเกิดปฏิกริยาทั่วทั้งขวด

6.3.4.4 รอจนได้ตะกอนสีน้ำตาลแดงประมาณครึ่งขวด เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อยๆ ไหลลงไปข้างขวด

6.3.4.5 ปิดจุกเขย่าขวด ตั้งทิ้งไว้จนเห็นน้ำใสสีน้ำตาลแดง

6.3.4.6 ใช้ปิเปตดูดน้ำใสสีน้ำตาลแดงปริมาตร 203 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร

6.3.4.7 นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate เข้มข้น 0.025 N จนเปลี่ยนเป็นสีแดงเรื่อ ๆ

6.3.4.8 เติมน้ำแป้งลงไป 3-4 หยด เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ไตเตรทต่อจนเป็นสีขาวใส

6.3.4.9 จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน Sodium thiosulfate ที่ใช้ไปทั้งหมด นำไปคำนวณหาค่า D.O.

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

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

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

2. ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (inoculum size)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในอาหาร complete medium โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น คือ 2 และ 5 เปอร์เซนต์ พบว่าปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซนต์ มีการเจริญของเชื้อที่ดีกว่าที่ดีกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.3

3. ผลการศึกษาการเจริญ และ ปริมาณเซลล์สูงสุด(maximum yield) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง และน้ำทิ้งที่เติมสารต่าง ๆ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium , น้ำทิ้งปลา, น้ำทิ้งปลาที่เติมกลูโคส , น้ำทิ้งปลาเติม yeast extract และน้ำทิ้งปลาที่เติมน้ำตาลกลูโคส ในปริมาณที่เท่ากับใน complete medium พบว่าน้ำทิ้งปลามีการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด มากกว่าน้ำทิ้งปลาที่เติมทั้งน้ำตาลกลูโคส และ yeast extract และการเจริญใน complete medium จะมีการเจริญที่ต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนในน้ำทิ้งปลามีปริมาณเพียงพอกับความต้องการของเชื้อ Prop. freudenreichii

4. ผลการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน น้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์แล้วเติมน้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่าง คือ 0.0 ,1.0 ,1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซนต์ พบว่าน้ำทิ้งปลามีการเจริญดีที่สุดและ น้ำทิ้งปลาที่เติมกลูโคส 0.0 เปอร์เซนต์มีการเจริญที่ใกล้เคียงกับน้ำทิ้งปลา ดังแสดงในรูปที่ 4.6

5. ผลการเปรียบเทียบปริมาณ yeast extract

ผลการศึกษาปริมาณ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์และเติม yeast extract ในปริมาณต่างๆ กันคือ 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซนต์พบว่ามีการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii น้อยกว่าในน้ำทิ้งปลา ดังแสดงในรูปที่ 4.7

6. ผลการเปรียบเทียบปริมาณโคบอลท์

ผลการเปรียบเทียบปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาที่มีการเติม $CoSO_4.7H_2O$ ในปริมาณต่างคือ 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 20 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii มีค่าสูงสุดใกล้เคียงน้ำทิ้งปลา ดังนั้นจึงเลือกใช้ $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8 เพราะ $CoSO_4.7H_2O$ มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12

7. ผลการศึกษาการเจริญ ปริมาณเซลล์สูงสุด และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ณ สภาวะ stationary flask ใน

7.1 น้ำทิ้งปลา

7.2 น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

7.3 น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

7.4 น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

7.5 น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และriboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

จากการศึกษาพบว่า การเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii มีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับการผลิตวิตามินบี 12 พบว่าน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 4.77 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในรูปที่ 4.11

8. ผลการศึกษาการเจริญ ปริมาณเซลล์สูงสุด และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่าง ๆ ณ สภาวะ stationary flask และถังหมักที่มีระบบการกวน

ผลศึกษาการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้อาหาร complete medium และ น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4.7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin

0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารช่วยเพิ่มผลผลิต พบว่า ใน complete medium ในสภาพ stationary flask ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.64 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 72 และในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่าง ๆได้ ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 4.59 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48

เมื่อทดลองศึกษาใน ถังหมักที่มีการกวน พบว่าใน complete medium ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 0.66 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 72 และได้ปริมาณวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆเท่ากับ 4.25 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในรูปที่ 4.14

เมื่อเวลาผ่านไปการผลิตวิตามินบี 12 จะลดเนื่องจากในระหว่างการหมักเชื้อจะผลิตกรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติกในอัตราส่วน 2 1 (3) จึงทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งจะไปยับยั้งการสร้างวิตามินบี 12 ทำให้การผลิตวิตามินบี 12 ลดลง หรือการที่เซลล์ autolysis ทำให้วิตามินบี 12 แปรรูปเป็นสารอื่น ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

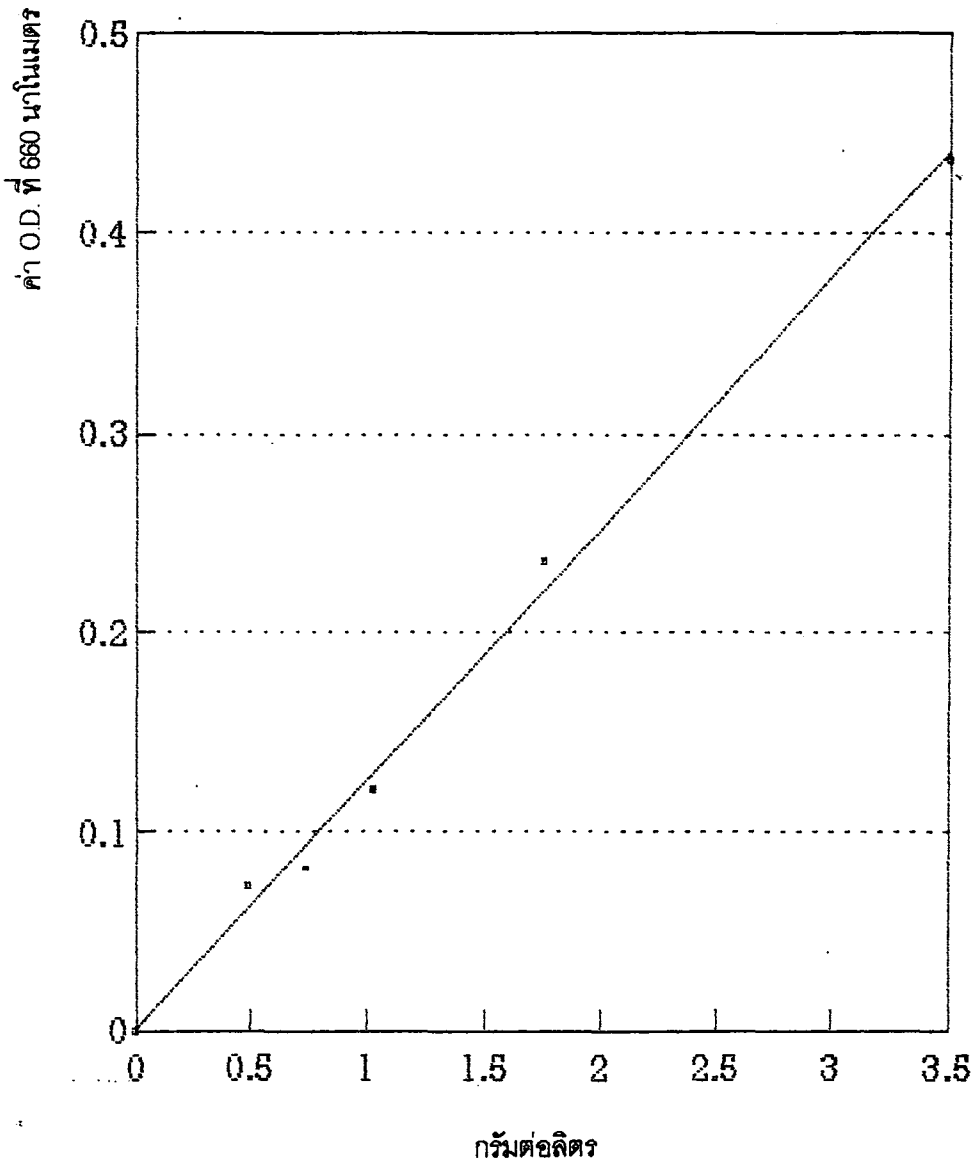
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาในถังหมักที่มีการกวนพบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 4.59 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าในสภาวะ stationary flask ที่มีปริมาณ 4.25 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เป็น 7.4 เปอร์เซนต์

9. ผลการวิเคราะห์ Biochemical Oxygen Demand (BOD)

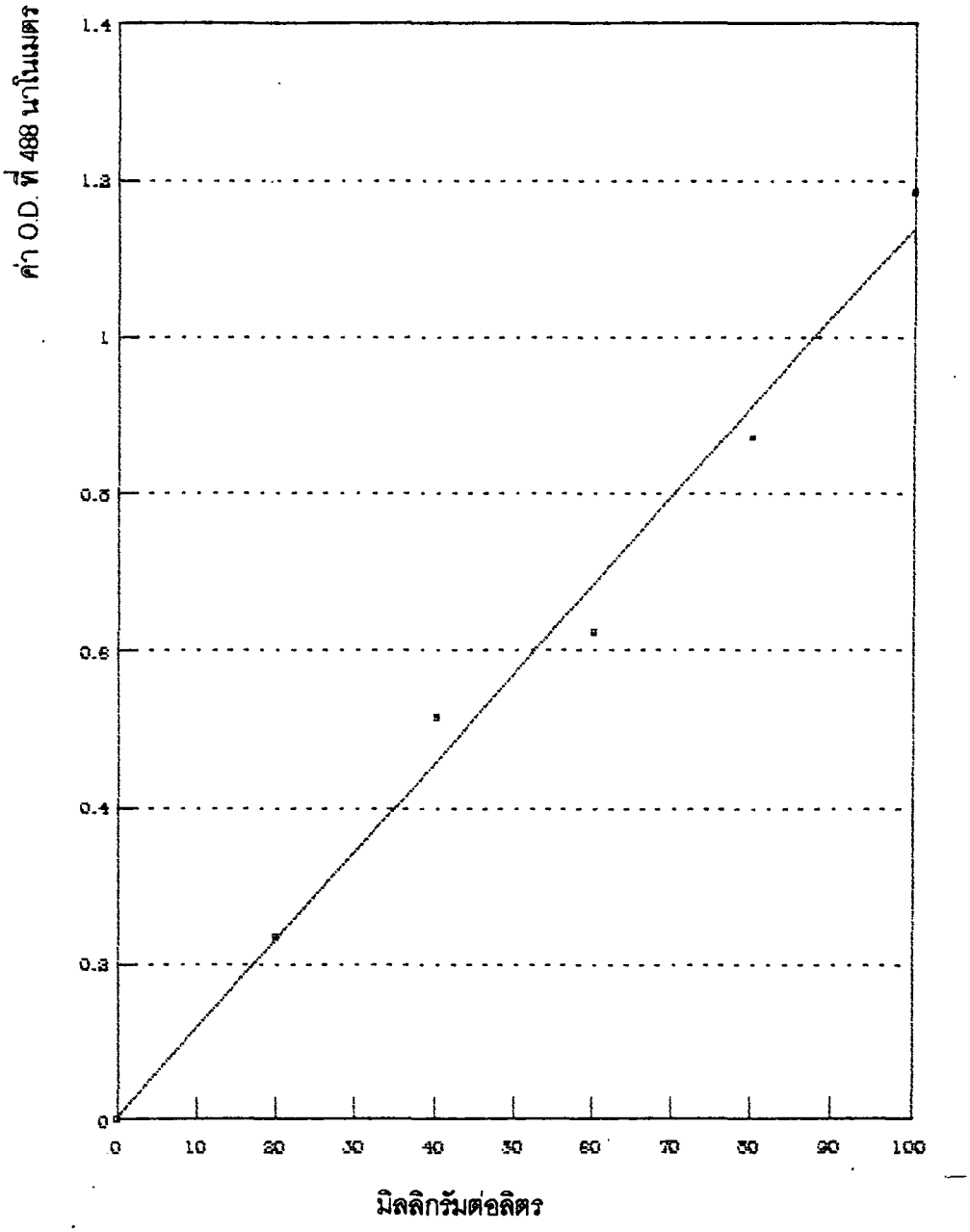
จากการวิเคราะห์ BOD ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii จากการหมักที่ 120 ชั่วโมง พบว่าค่า BOD ของน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ ก่อนและหลังการเติมเชื้อ Prop. freudenreichii มีค่าเท่ากับ 62,000 และ 9,750 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยที่ค่า BOD ของน้ำปลามีค่าเท่ากับ 34, 650 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการเจริญของเชื้อสามารถลดค่า BOD ของน้ำทิ้งปลาและน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญได้ 71.86 และ 84.02 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า พีเอช ,BOD,suspension solid ,เปอร์เซนต์คาร์โบไฮเดรต และเปอร์เซนต์โปรตีน ของน้ำทิ้งปลาจาก บริษัท ซาฟโก้ จำกัด

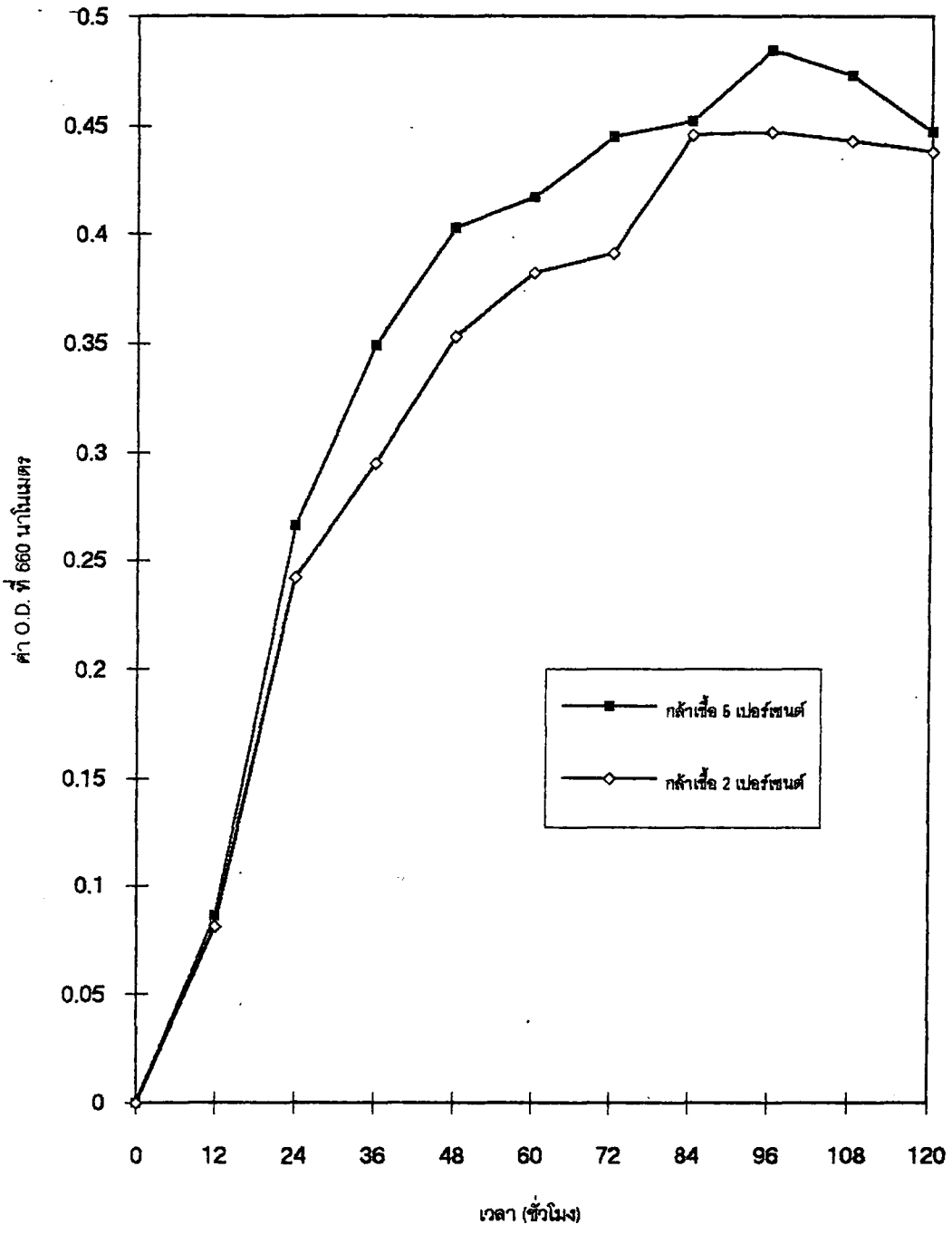
ค่าพีเอช	6.145
BOD	34,650 มิลลิกรัมต่อลิตร
suspened solid	2,888 มิลลิกรัมต่อลิตร
เปอร์เซนต์คาร์โบไฮเดรต	0.263 เปอร์เซนต์
เปอร์เซนต์โปรตีน	5.000 เปอร์เซนต์



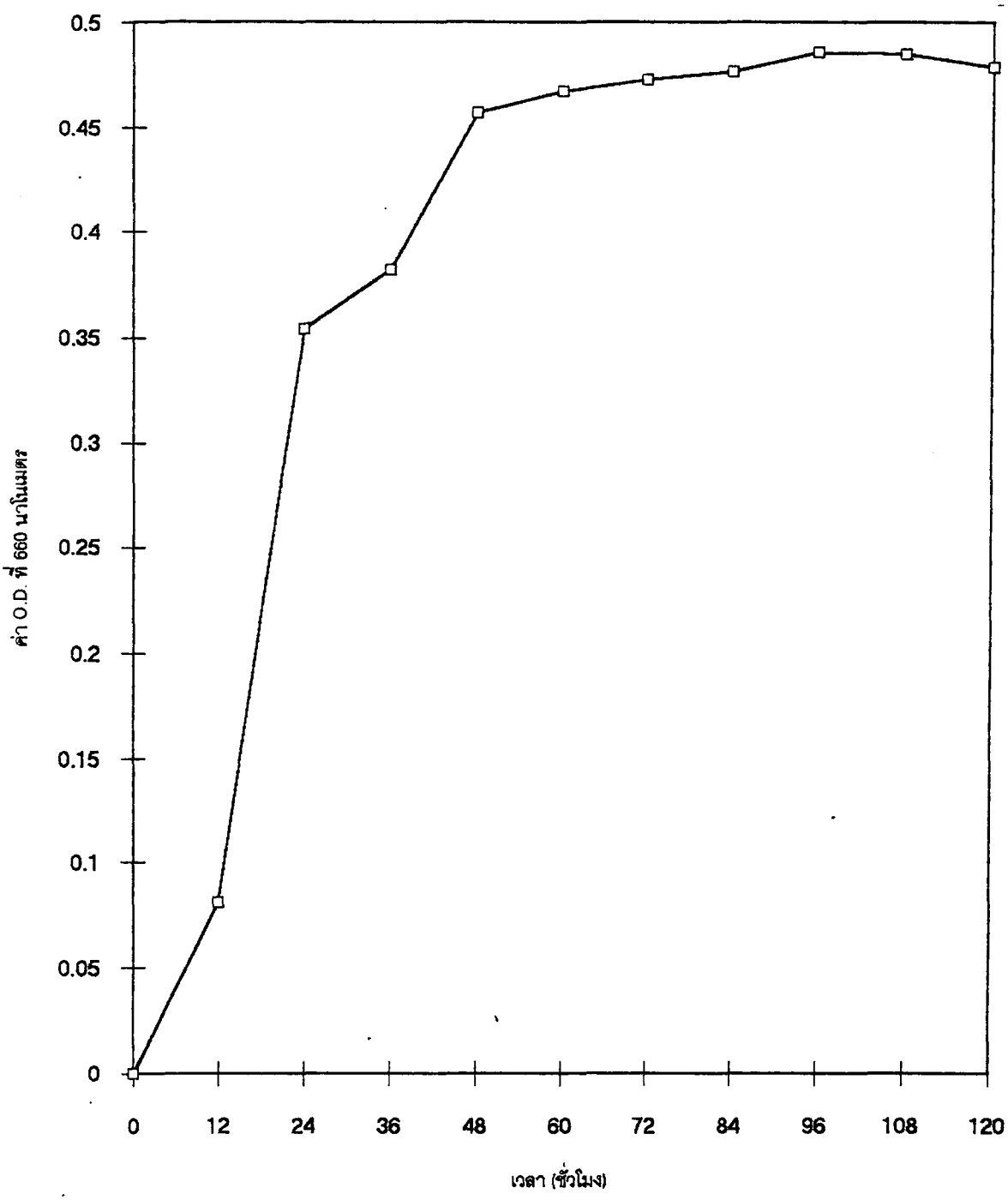
รูปที่ 4.1 แสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii (กรัมต่อลิตร) กับค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร



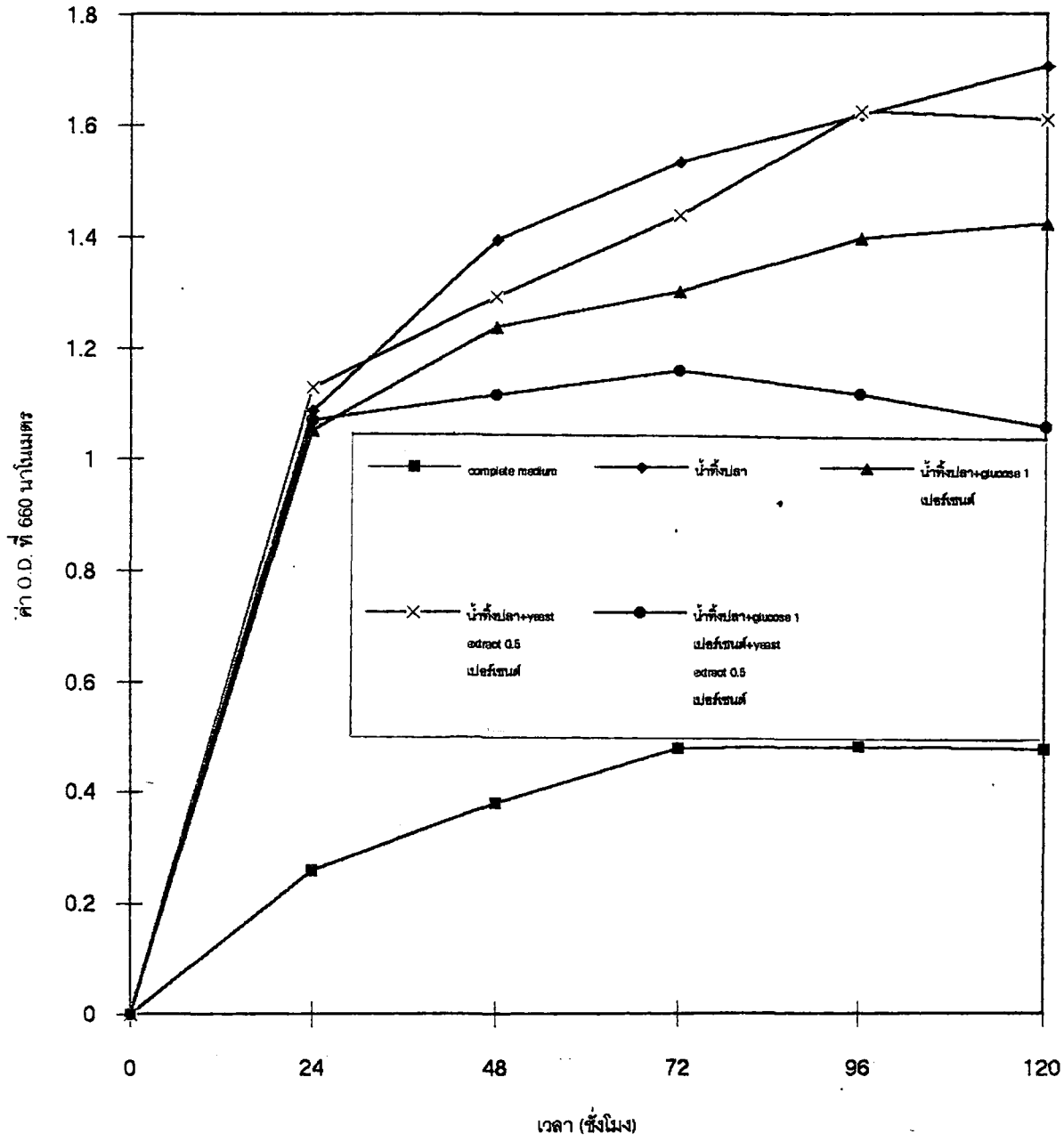
รูปที่ 4.2 แสดงมาตรฐานกลูโคสที่ค่า O.D. 488 นาโนเมตรโดยวิธี Phenolic method



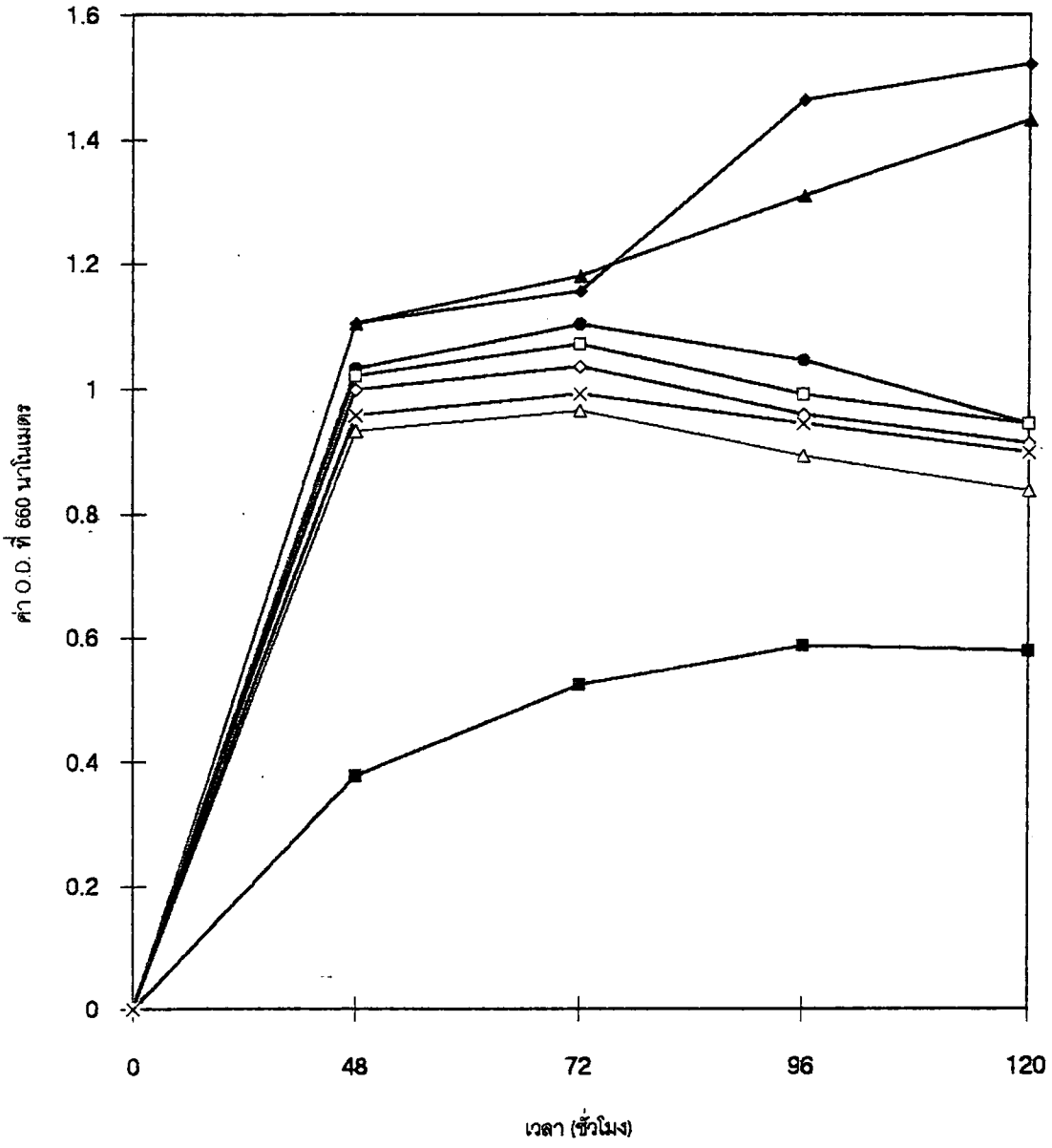
รูปที่ 4.3 แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในcomplete medium ณ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกล้าเชื้อ 2 และ 5 เปอร์เซนต์



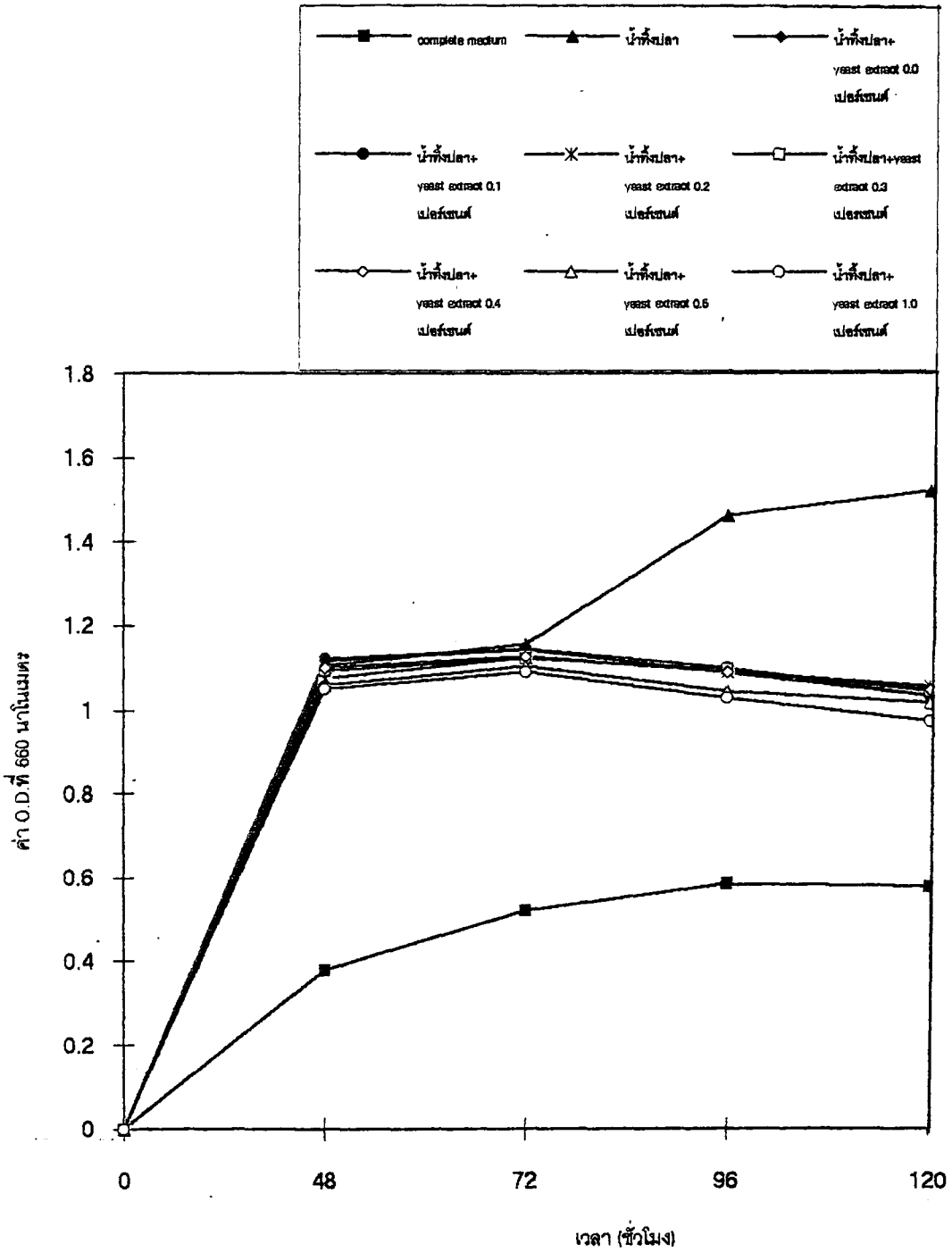
รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium ณ สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์



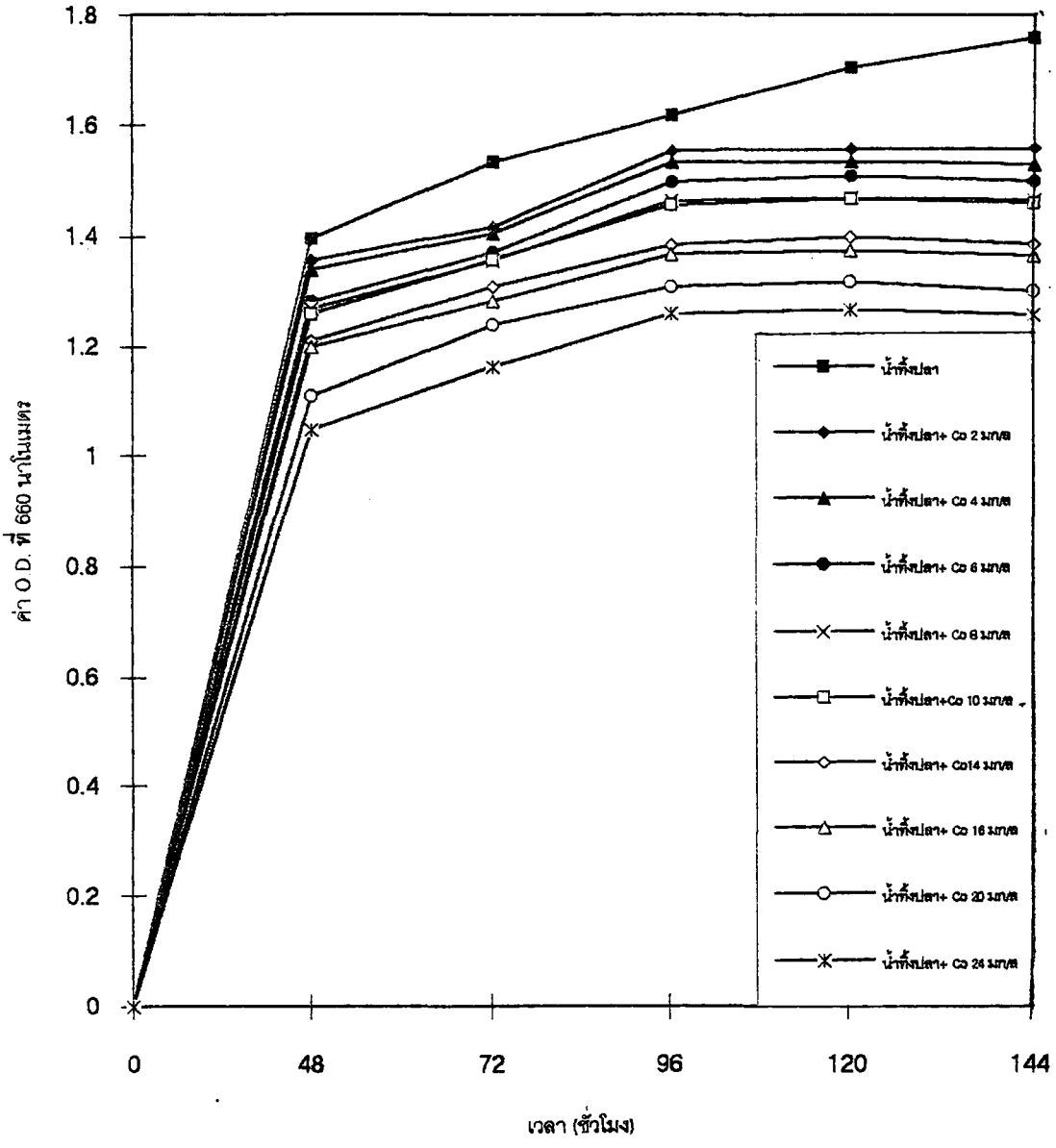
รูปที่ 4.5 แสดงเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในcomplete medium , น้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ



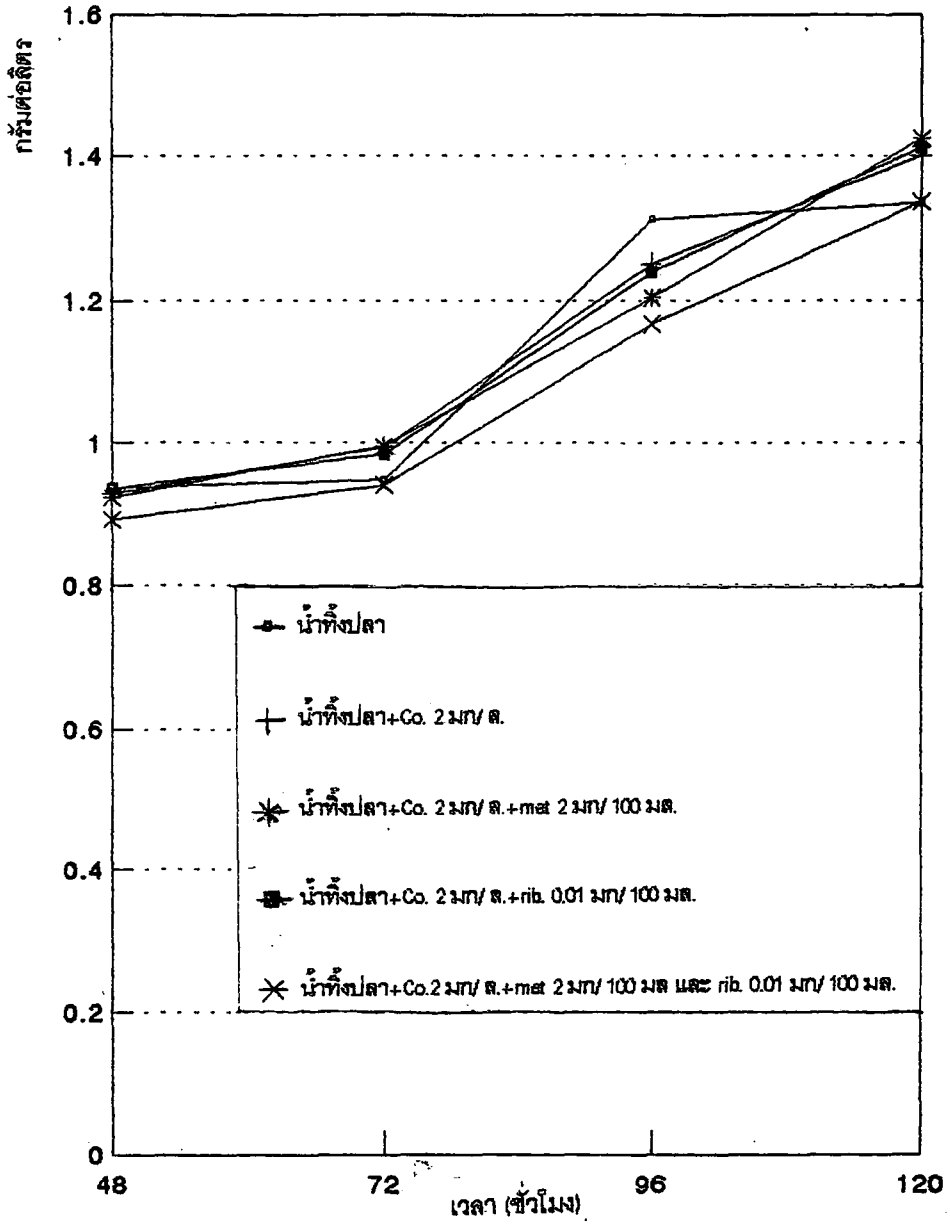
รูปที่ 4.6 แสดงเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในcomplete medium น้ำทิ้งปลา,น้ำทิ้งปลาเติม glucose ในปริมาณต่างๆ และ yeast extract 0.5



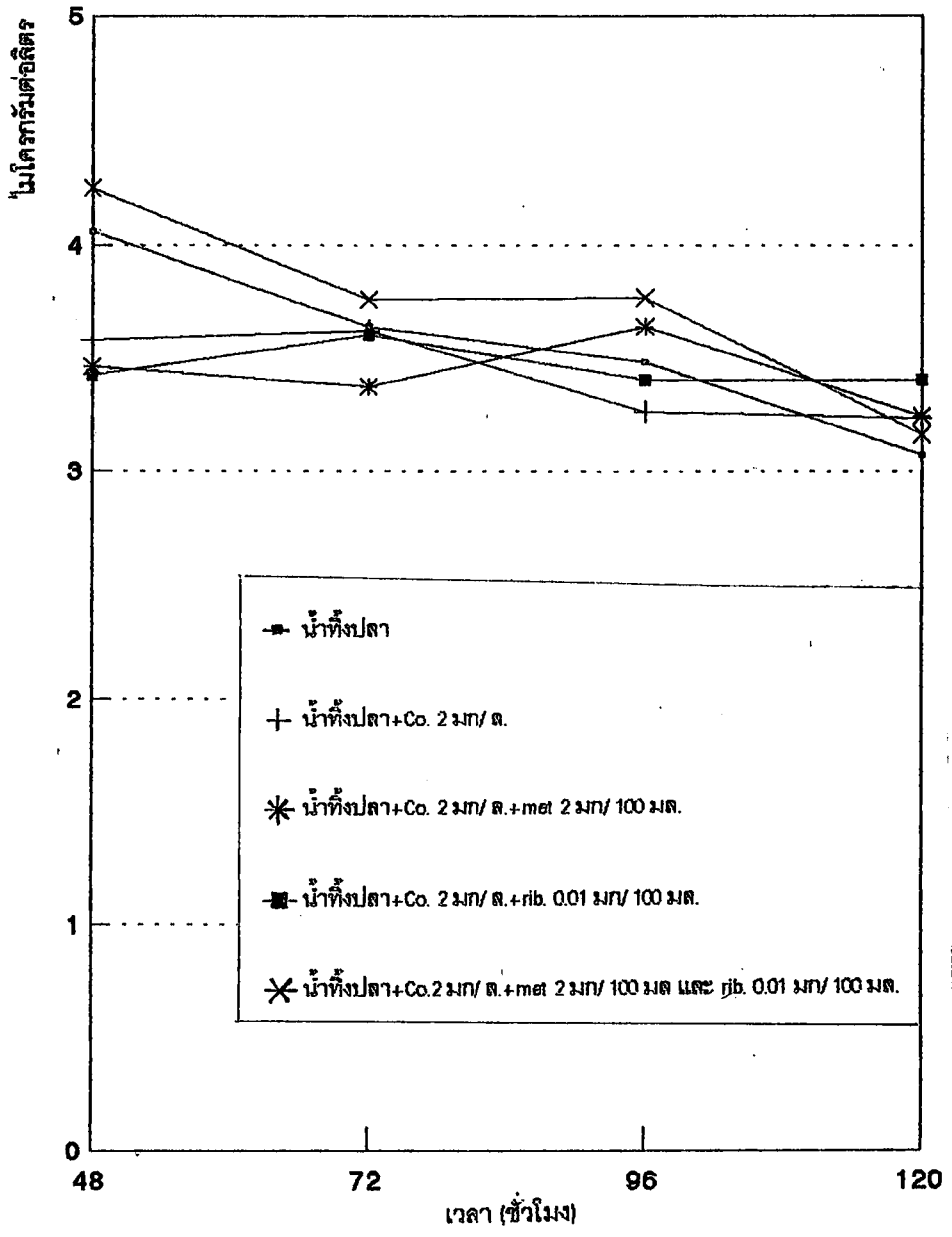
รูปที่ 4.7 แสดงเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในcomplete medium น้ำทิ้งปลา,น้ำทิ้งปลาเติม yeast extract ในปริมาณต่างๆ และ glucose 0.5เปอร์เซนต์



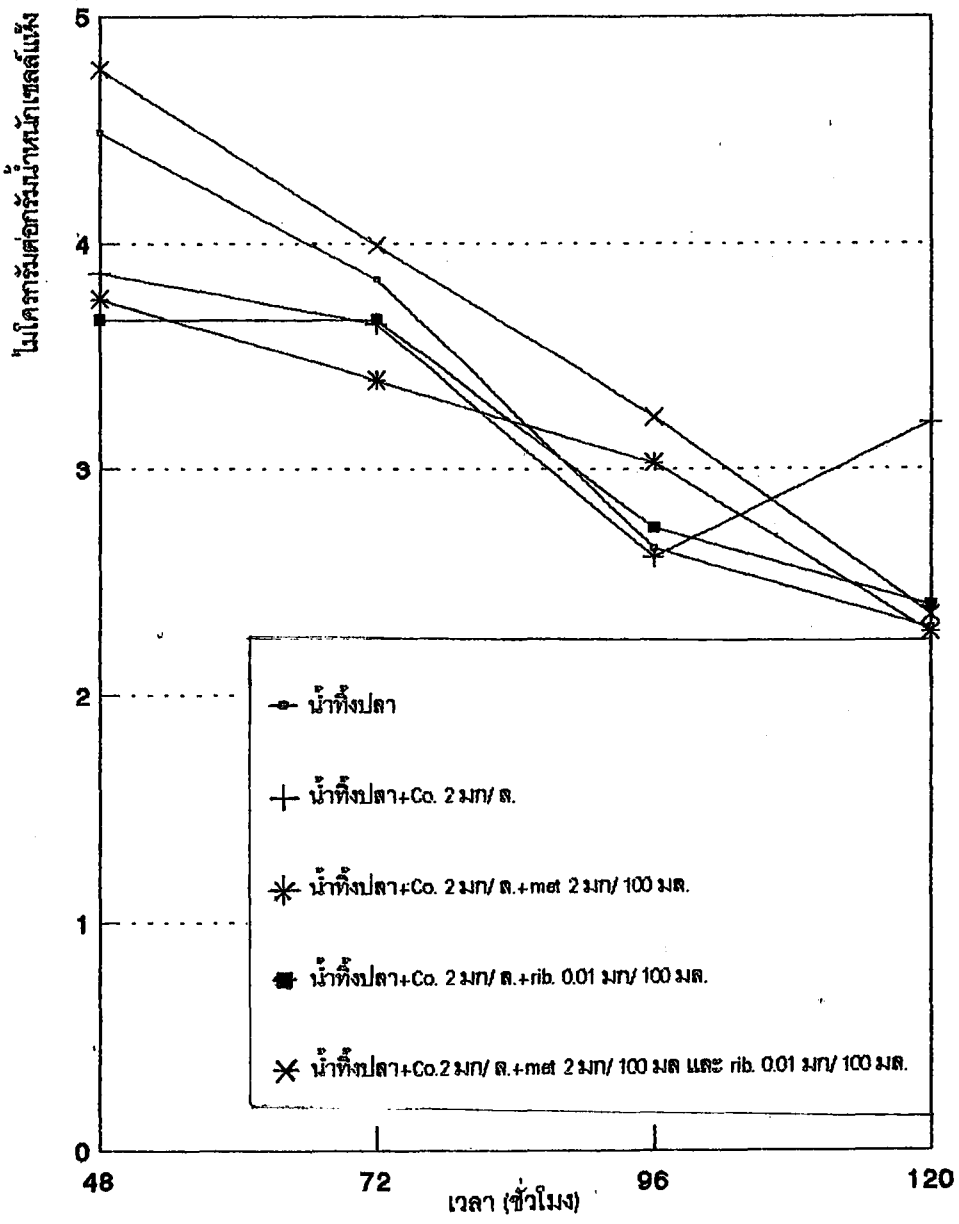
รูปที่ 4.8 แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ ในปริมาณต่างๆกัน



รูปที่ 4.9 แสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร) กับเวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) กับเวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ สภาวะ stationary flask ชั่วโมงที่ 48

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/g)
น้ำทิ้งปลา	1.136	0.903	4.060	4.490
น้ำทิ้งปลา+Co.	1.166	0.927	3.577	3.860
น้ำทิ้งปลา+Co.+Met.	1.160	0.922	3.460	3.750
น้ำทิ้งปลา+Co.+Rib.	1.176	0.935	3.420	3.660
น้ำทิ้งปลา+Co.+Met.+Rib	1.121	0.891	4.250	4.770

หมายเหตุ Co. เท่ากับ $CoSO_47H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Met. เท่ากับ Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

Rib. เท่ากับ Riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ สภาวะ stationary flask ชั่วโมงที่ 72

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/g)
น้ำทิ้งปลา	1.191	0.947	3.640	3.840
น้ำทิ้งปลา+ Co.	1.250	0.994	3.620	3.640
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Met.	1.251	0.995	3.370	3.390
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Rib.	1.237	0.984	3.600	3.660
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Met.+Rib	1.182	0.940	3.760	3.990

หมายเหตุ Co. เท่ากับ $CoSO_47H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Met. เท่ากับ Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

Rib. เท่ากับ Riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ สภาวะ stationary flask ชั่วโมงที่ 96

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/g)
น้ำทิ้งปลา	1.650	1.312	3.480	2.650
น้ำทิ้งปลา+ Co.	1.573	1.251	3.260	2.610
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Met.	1.512	1.203	3.640	3.030
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Rib.	1.558	1.239	3.400	2.740
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Met.+Rib	1.467	1.167	3.770	3.230

หมายเหตุ Co เท่ากับ CoSO47H2O 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Met. เท่ากับ Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

Rib. เท่ากับ Riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

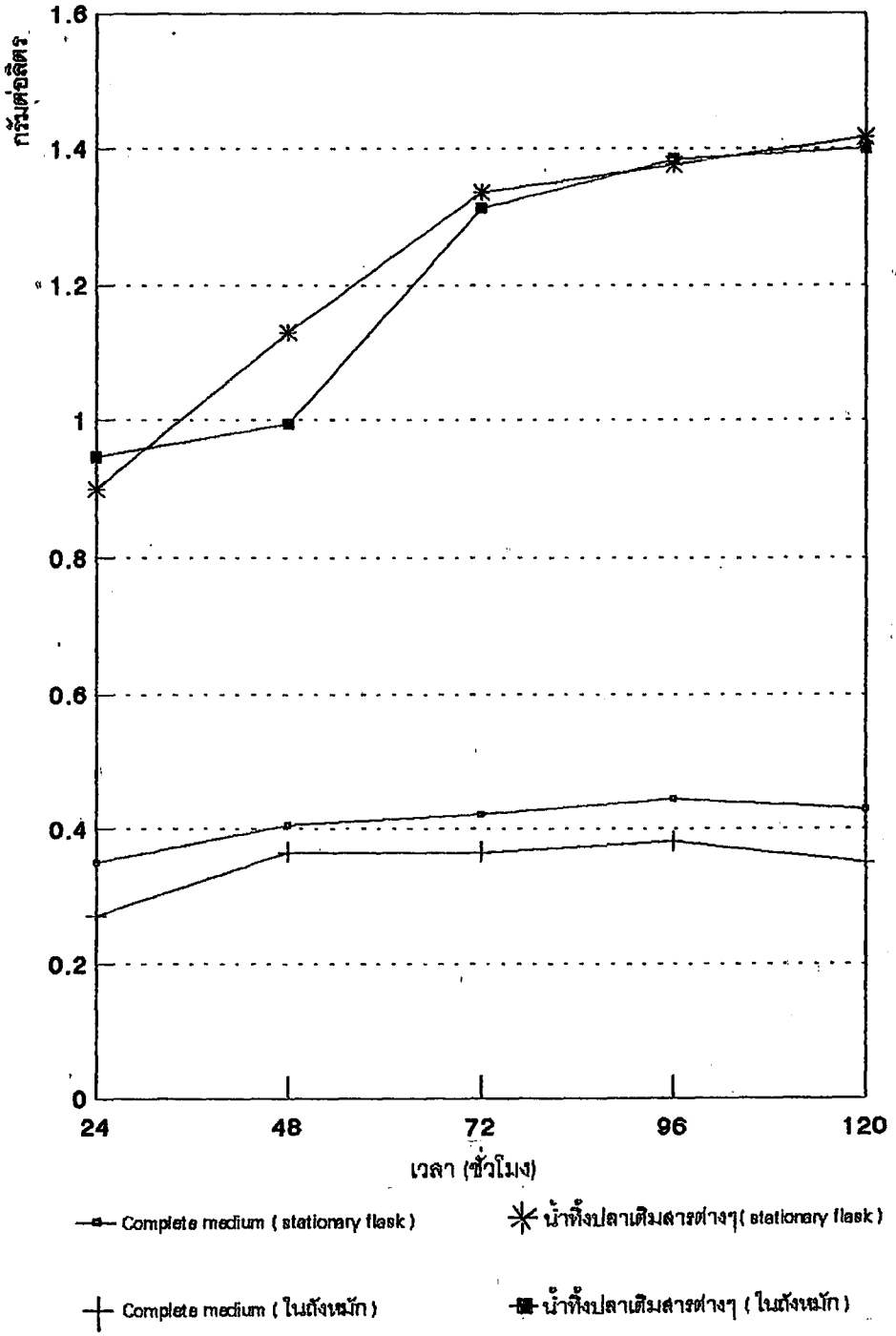
ตารางที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ สภาวะ stationary flask ชั่วโมงที่ 24

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/g)
น้ำทิ้งปลา	1.678	1.335	3.070	2.300
น้ำทิ้งปลา+ Co.	1.760	1.400	3.230	2.210
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Met.	1.790	1.424	3.240	2.280
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Rib.	1.774	1.411	3.400	2.400
น้ำทิ้งปลา+ Co.+Met.+Rib	1.680	1.336	3.160	2.360

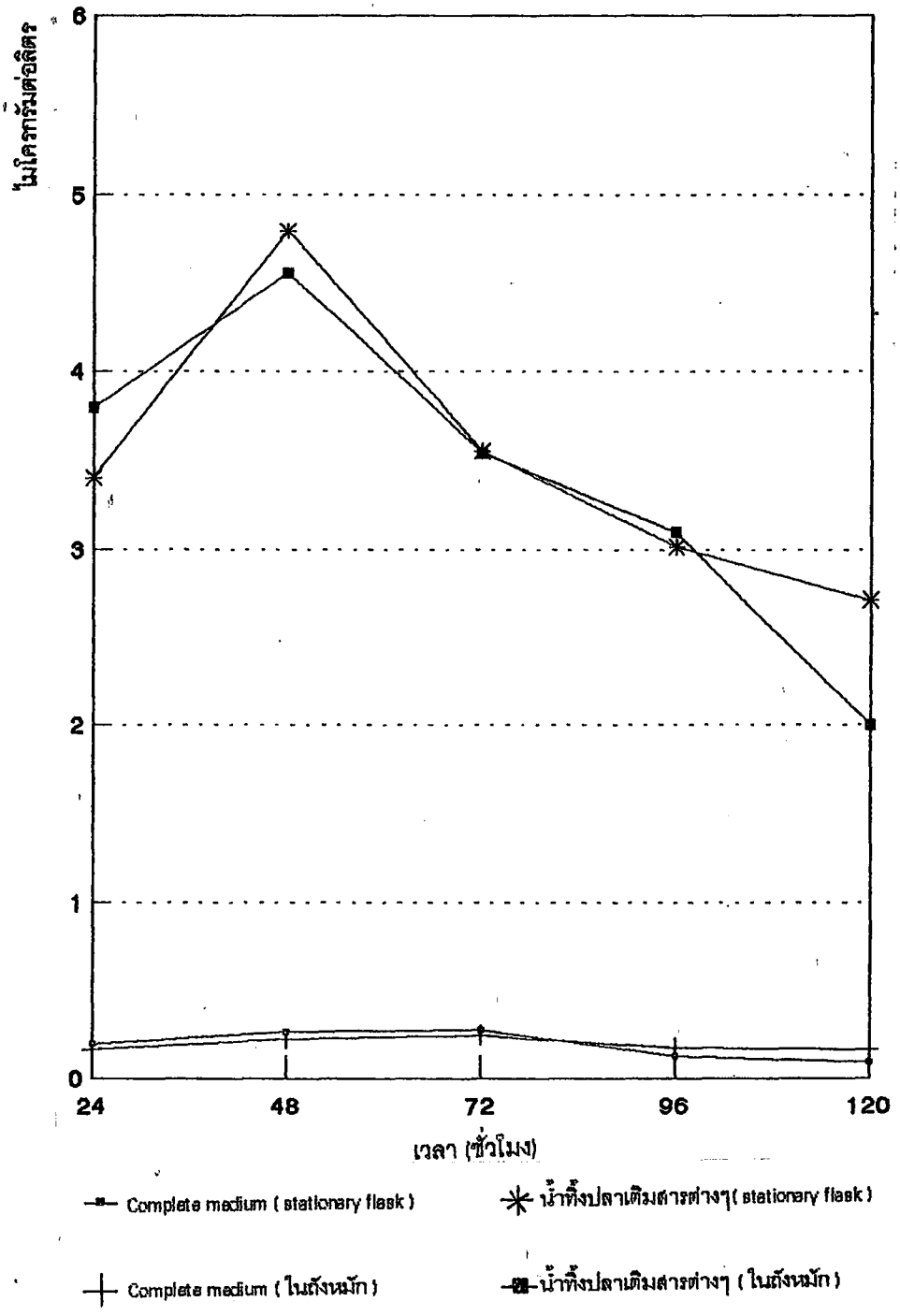
หมายเหตุ Co. เท่ากับ $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

Met. เท่ากับ Methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

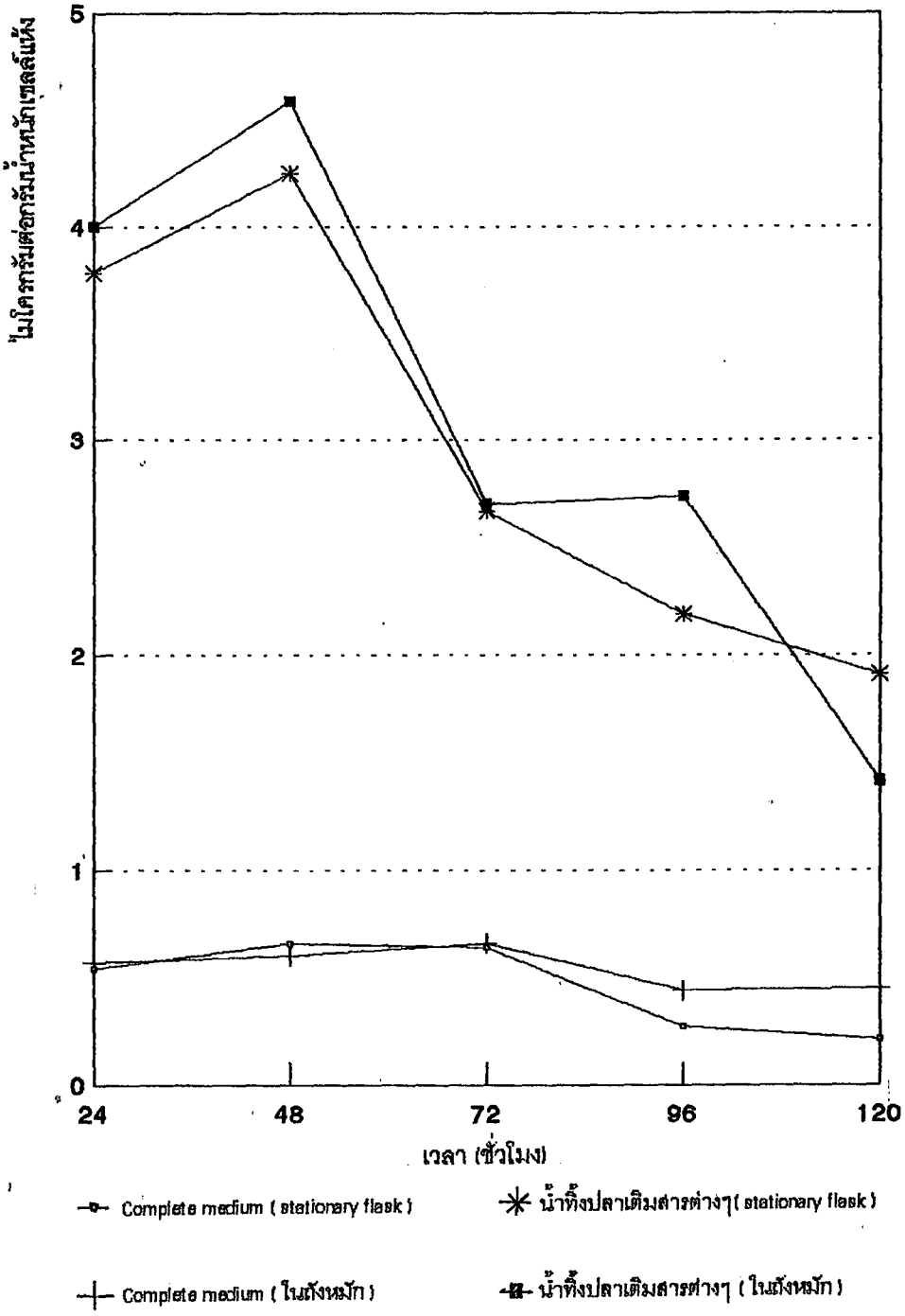
Rib. เท่ากับ Riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร



รูปที่ 4.12 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ Prop. freudenreichii ในระหว่างการหมัก กับระยะเวลาในการเจริญ



รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร) กับเวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) กับเวลาในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 24

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g / l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug / l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug / g)
C.M. (stat. flask)	0.440	0.350	0.190	0.540
C.M. (batch fer.)	0.340	0.270	0.160	0.570
น้ำทิ้งปลา (stat. flask)	1.130	0.899	3.400	3.780
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.190	0.946	3.790	4.000

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat. flask เท่ากับ stationary flask

batch fer. เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 48

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug/g)
C.M. (stat. flask)	0.510	0.405	0.263	0.660
C.M. (batch fer.)	0.460	0.366	0.220	0.600
น้ำทิ้งปลา (stat. flask)	1.420	0.113	4.800	4.250
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.250	0.994	4.560	4.590

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat. flask เท่ากับ stationary flask

batch fer. เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 72

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g / l)	ปริมาณวิตามิน บี 12 (ug / l)	ปริมาณวิตามิน บี 12 (ug / g)
C.M. (stat. flask)	0.530	0.421	0.270	0.640
C.M. (batch fer.)	0.460	0.366	0.240	0.660
น้ำทิ้งปลา (stat. flask)	1.680	1.336	3.550	2.670
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.650	1.312	3.540	2.700

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat. flask เท่ากับ stationary flask

batch fer. เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 96

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g / l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug / l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug / g)
C.M. (stat. flask)	0.560	0.444	0.120	0.270
C.M. (batch fer.)	0.480	0.381	0.170	0.440
น้ำทิ้งปลา (stat. flask)	1.730	1.376	3.020	2.194
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.740	1.384	3.100	2.240

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat. flask เท่ากับ stationary flask

batch fer. เท่ากับ batch fermenter

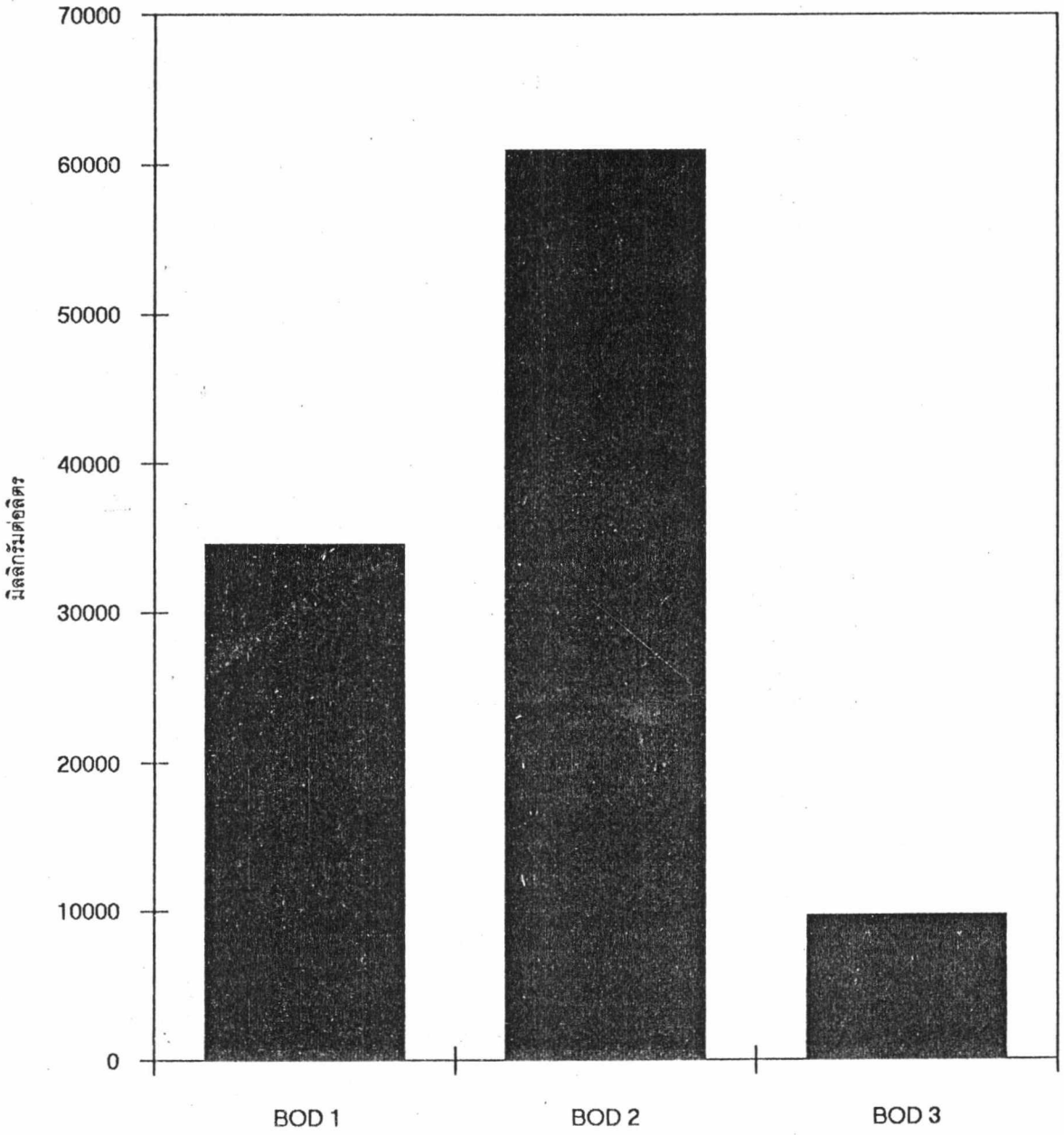
ตารางที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และในน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0..01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 120

อาหาร	ค่าO.D.ที่ 660 นาโนเมตร	น้ำหนักแห้ง (g / l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug / l)	ปริมาณวิตามินบี 12 (ug / g)
C.M. (stat. flask)	0.540	0.429	0.090	0.210
C.M. (batch fer.)	0.440	0.350	0.160	0.450
น้ำทิ้งปลา (stat. flask)	1.780	1.416	2.720	1.910
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.760	1.400	2.000	1.420

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat. flask เท่ากับ stationary flask

batch fer. เท่ากับ batch fermenter



รูปที่ 4.15 แสดงค่า BOD ของน้ำทิ้งปลา สภาวะต่างๆ

BOD1 คือ ค่า BOD ของน้ำทิ้งปลา

BOD2 คือ ค่า BOD ของน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

BOD3 คือ ค่า BOD ของน้ำทิ้งปลาที่เติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร หลังการหมักที่ชั่วโมง 120

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องเปรียบเทียบกับ complete medium สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ดีที่สุดคือ พีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (initial O.D. เท่ากับ 0.5) เท่ากับ 0.395 กรัมต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในอาหาร complete medium ณ สภาวะ stationary flask ได้วิตามินบี 12 ปริมาณเท่ากับ 0.64 ไมโครกรัมต่อกรัมลิตร และเมื่อเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในอาหาร complete medium ในถังหมักที่มีการกวนจะได้วิตามินบี 12 ปริมาณ 0.66 ไมโครกรัมต่อกรัมลิตร (ชั่วโมงที่ 48) ซึ่งพบว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ ณ สภาวะ stationary flask ใน complete medium มีการผลิตวิตามินบี 12 ได้น้อยกว่าใน complete medium ในถังหมักที่มีการกวน เพราะการกวนอาหารจะทำให้จุลินทรีย์และอาหารสัมผัสกันอย่างทั่วถึง อีกทั้งในสภาพ stationary flask นั้นอาจทำให้การสะสมของกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก (3) รอบเซลมีปริมาณมากขึ้น ทำให้อาหารในฟลาสก์มีสภาพเป็นกรด ทำให้การผลิตวิตามินบี 12 ลดลง

จากการศึกษาพบว่าในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องมีปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจนที่มากเพียงพอต่อการเจริญ และปริมาณโคบอลท์ที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 คือ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารเพื่อช่วยในการผลิตวิตามินบี 12 คือ methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะได้วิตามินบี 12 เท่ากับ 4.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ณ สภาวะ stationary flask ซึ่งน้อยในถังหมักที่มีการกวนซึ่งได้ปริมาณวิตามินบี 12 เท่ากับ 4.59 ไมโครกรัมต่อลิตร (ชั่วโมงที่ 72)

จากการเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii จาก complete medium ณ สภาวะ stationary flask พบว่าการผลิตต่ำกว่าในถังหมักที่มีการกวน 3.0 เปอร์เซนต์ (ชั่วโมงที่ 48) และการผลิตวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาที่เติมสารต่างๆ ในถังหมักที่มีการกวน

มีการผลิตสูงกว่าในสภาวะ stationary flask 7.4 เปอร์เซนต์

จากการวิเคราะห์ค่า BOD ของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง และน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง เมื่อเติมสารอาหารต่างๆพบว่าค่า BOD ก่อนการเลี้ยงเชื้อได้ 34,650 และ 61,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับส่วนค่า BOD ในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องเมื่อเติมสารต่างๆหลังการเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ชั่วโมงที่ 120 มีค่า BOD เท่ากับ 9,750 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าสามารถลดค่า BODได้ 71.86 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง และลดค่า BOD ลงได้ 84.02 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋องที่เติมสารอาหารต่างๆ แต่ค่า BOD ของน้ำที่เหลือจากการหมักยังมีค่าสูง ดังนั้นจึงควรใช้การผลิตวิตามินบี 12 ร่วมกับกรรมวิธีการบำบัดน้ำเสียอื่นๆ เพื่อช่วยลดค่า BOD ให้มีค่าที่ต่ำกว่านี้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (stock culture media)

1.1อาหารเลี้ยงเชื้อ Propionebacterium freudenreichii ที่ใช้คือ MRS medium มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Tri-ammonium citrate	2.0	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$MnSO_4$	0.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้ออัดความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ : ถ้าจะทำเป็นอาหารแข็ง ให้เติมวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซนต์

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

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

แต่เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรนี้มี skimmed milk เมื่อนำมานึ่งฆ่าเชื้อด้วย ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดปฏิกิริยา caramelization ดังนั้นจึงใช้อาหารสูตร tomato juice agar ที่มีส่วนประกอบดังนี้แทน

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

ปรับ pH ให้ได้ 7.2

หมายเหตุ : filtrate tomato juice เตรียมได้ดังนี้

ชั่งมะเขือเทศ 200.0 กรัม บดให้ละเอียด ต้มน้ำปริมาตร 1.0 ลิตร ประมาณ 15 นาที กรองเอากากมะเขือเทศออก เหลือแต่ส่วนใส เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

2. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตวิตามินบี 12 คือ complete medium มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysis of casein	1.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	1.5	กรัม
$NaHPO_4$	1.6	กรัม
K_3PO_4	1.6	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4$	10.0	มิลลิกรัม
$CoSO_4$	12.0	มิลลิกรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Pancreatic acid	4.0	มิลลิกรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.6 ด้วยกรด HCl 15 เปอร์เซนต์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้ออัดความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Carbohydrate โดยวิธี Phanolic method

1.1 สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น

1.2 สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซนต์

ละลายฟีนอล 5 กรัมในน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ Crude protein โดยวิธี Semi-micro Kjjeldahl method

2.1 สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 0.1 N.

ปิเปตกรด 2.78 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask

2.2 สารละลาย Na_2CO_3

ชั่ง Na_2CO_3 6.7 กรัม ใส่ในขวดนำไปอบที่อุณหภูมิ 260 - 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desicator ชั่ง Na_2CO_3 ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 0.2 กรัม ใส่ใน Erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร หยด methyl orange 2-3 หยด นำไปไตเตรตกับสารละลาย H_2SO_4 เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย H_2SO_4 (ในข้อ 2.1)

2.3 สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์

ชั่ง NaOH 40 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2.4 สารละลายกรด H_2BO_4 เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์

ชั่ง H_2BO_4 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

2.5 Screened methyl red indicaotr

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

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ BOD ตามวิธีของ American Public Health Association

3.1 สารละลายกรด H_2SO_4 เข้มข้น 1 N.

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

3.2 สารละลาย NaOH เข้มข้น 1 N

ชั่ง NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.3 สารละลาย Phosphate buffer

ชั่ง KH_2PO_4 8.5 กรัม , K_2PO_4 21.75 กรัม , Na_2KPO_4 33.4 กรัม , NH_4Cl 1.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.4 สารละลาย Magnesium sulfate

ชั่ง $MgSO_4.7H_2O$ 11.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

3.6 สารละลาย Ferric chloride

ชั่ง $FeCl_3.6H_2O$ 0.125 กรัมละลายน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.7 สารละลาย Manganese sulfate

ชั่ง $MnSO_4 . 4H_2O$ 480 กรัม หรือ $MnSO_4 . 2H_2O$ 400 กรัม หรือ $MnSO_4 . H_2O$ 364 กรัม ละลายในน้ำกลั่น กรองแล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

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

3.8.1 ชั่ง KOH 700 กรัม หรือ NaOH 500 กรัม และ KI 150 กรัม หรือ NaI 175 กรัม เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.8.2 ชั่ง NaN_3 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.1 ทิ้งไว้ค้างคืนจึงนำมาใช้

3.9 สารละลาย sodium thiosulfate เข้มข้น 0.025 N.

ชั่ง $Na_2S_2O_3$ 6.205 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ ซึ่งทำให้เย็นปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายใส่ขวดสีชาที่สะอาด ถ้าต้องการจะเก็บไว้ได้นานๆ โดยกำลังของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง ให้เติม NaOH ลงไป 0.4 กรัม การทำให้ sodium thiosulfate ได้มาตรฐานทำตามขั้นตอนดังนี้

3.9.1 ละลาย KI 2 กรัมด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.9.2 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นจำนวน 10 มิลลิลิตร

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

3.9.4 เก็บไว้ในที่มืด 5 นาที

3.9.5 ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรทั้งหมดเป็น 400 มิลลิลิตร

3.9.6 นำมาไตเตรตกับ thiosulfate solution จนสารละลายมีสีเหลืองเรื่อๆ

3.9.7 เติมน้ำแป้ง (ในข้อ 3.11) 3-4 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงิน ไตเตรตต่อจนสีเริ่มใสจนถึงจุดยุติ จดปริมาตรของ sodium thiosulfate solution ที่ใช้ นำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

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

3.10 สารละลาย potassium dicromate เข้มข้น 0.025 N.

ชั่ง $K_2Cr_2O_7$ อบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำเข้า desicator รอให้เย็นชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1.226 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้ volumetric flask

3.11 สารละลายน้ำแป้ง

ชั่งแป้งมัน 5-6 กรัม ละลายยน้ำเล็กน้อย เทลงในน้ำกลั่นที่เดือด นาน 2-3 นาที แล้วรินเอาแต่น้ำใสไว้ใช้ ถ้าต้องการเก็บไว้นานๆ เติม salicylic acid 1.25 กรัมต่อน้ำหนักแป้ง 1 ลิตร

4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้ Turbidimetric method of microbiological assay

4.1 สารละลาย acetate buffer เข้มข้น 0.1 M pH 4.6

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

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

นำสารละลาย A 25.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 24.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

4.2 สารละลาย Buffer cyanide

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

4.3 สารละลาย KCN เข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์

ชั่ง KCN 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร

4.4 สารละลายวิตามินบี 12 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

ละลายผลึกวิตามินบี 12 (Cyanocobalamin) ของ Merck & Co,Inc 1 มิลลิกรัมในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ4.2100มิลลิลิตรดูดใส่ ampule 1 มิลลิลิตร หลอมปลาย ampule ให้เชื่อมกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บเป็น stock solution ไว้ในตู้เย็น

4.5 Micro-inoculum broth สำหรับเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus leichmannii มีส่วนประกอบดังนี้

Bacto-yeast extract	20.0	กรัม
Proteose peptone (Difco)	5.0	กรัม
Bacto-dextrose	10.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.0	กรัม
Sobitan mononucleate complex (span 80)	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.6 สารละลาย single strength assay medium

ชั่ง vitamin B_{12} assay medium (Merck) 4.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดๆ ละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายนี้ใช้สำหรับล้างเซลและทำ dilution ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii

4.7 สารละลาย double strength assay medium

ชั่ง vitamin B_{12} assay medium (Merck) 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายนี้ใช้สำหรับใส่ใน sample และ vitamin B_{12} working standard

สารละลาย vitamin B_{12} assay medium ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการวิเคราะห์

4.8 อาหารที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 (vitamin B_{12} assay medium)

Casein hydrolysate	100	มิลลิลิตร
DL-Tryptophane	100	มิลลิลิตร
L-Cystine	100	มิลลิลิตร
Adenine sulfate solution	10	มิลลิลิตร
Guanine solution	10	มิลลิลิตร
Uracil solution	10	มิลลิลิตร
Xantine solution	10	มิลลิลิตร
Salt solution B	10	มิลลิลิตร
Glucose	12	กรัม
DL- Alanine	1	กรัม
Guanosine	200	มิลลิกรัม
Guanylic acid	50	มิลลิกรัม
Vitamin mixture	10	มิลลิลิตร
Folic acid	10	มิลลิลิตร
Pyridoxal	10	มิลลิลิตร
Tween 80	2	มิลลิลิตร
Thiomalic acid	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1	ลิตร

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. การหาปริมาณ Crude Protein โดยวิธี Semi-micro Kjeldahl Method

ปิเปตน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอด digest tube

↓

เติม K_2PO_4 5 กรัม และ $CuSO_4$ 0.1 กรัม

↓

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

ใส่เศษกระเบื้องเพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง

↓

ย่อยโปรตีนเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

จนได้สารละลายสีเขียว

↓

ทิ้งให้เย็น

↓

เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

↓

เติม NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ 50 มิลลิลิตร

↓

ทำการกลั่นโดยเก็บแก๊สแอมโมเนียในกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งหยด screened methyl red indicator

2-3 หยด เป็นเวลา 5 นาที

↓

ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 N.

หมายเหตุ : ทำการทดลองแบบเดิมอีกครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง (biank)

2. การหาปริมาณ Total Carbohydrate โดยใช้วิธี Phenolic method

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

↓

เติม phenol 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

↓

เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น หลอดละ 5 มิลลิลิตร

↓

แช่ในน้ำแข็งขณะเติมสาร

↓

นำไปวัดค่า O.D. ที่ 488 นาโนเมตร

↓

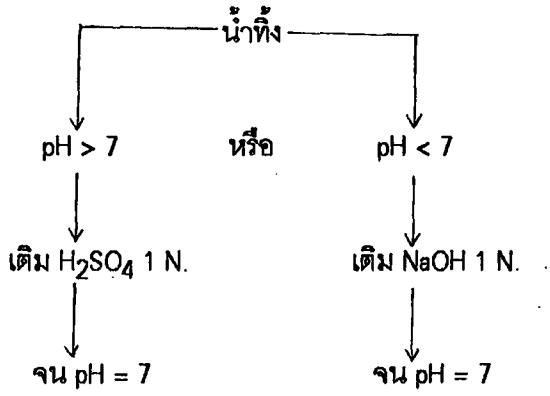
นำค่าที่วัดได้ไปอ่านค่า Total Carbohydrate
กับ กราฟมาตรฐานกลูโคส

<u>การเขียนกราฟมาตรฐานกลูโคส</u>

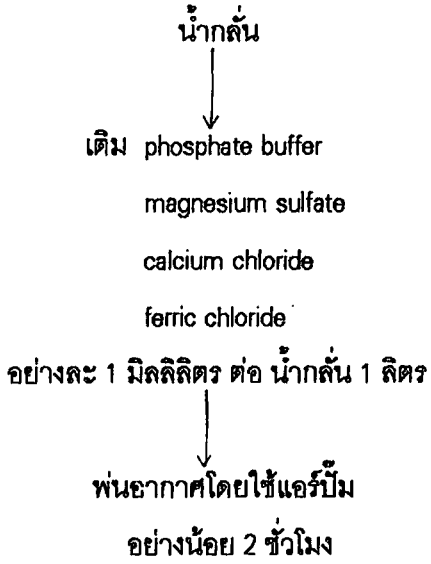
นำสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่เตรียมได้ตามวิธีในภาคผนวก ข มาวัดปริมาณ carbohydrate โดยวิธี phenolic method นำผลไปเขียนกราฟโดยให้ค่า O.D. อยู่แกนตั้ง และค่าความเข้มข้นอยู่ในแกนนอน

3. การวิเคราะห์หา Biochemical Oxygen Demand (BOD) ตามวิธี American Public Health Association

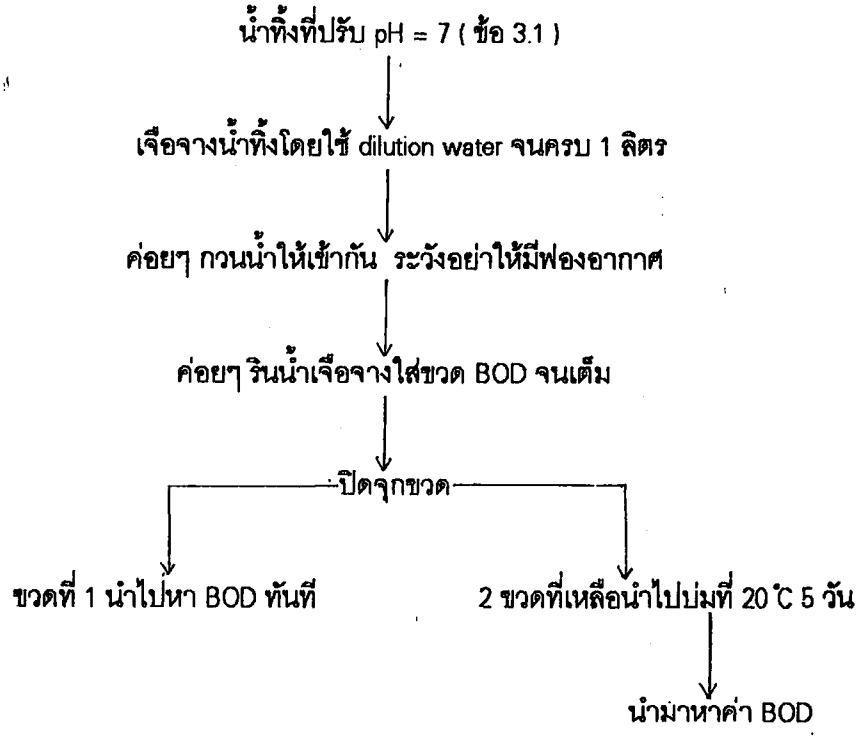
3.1 การปรับ pH ของน้ำทิ้ง



3.2 การเตรียม dilutoin water

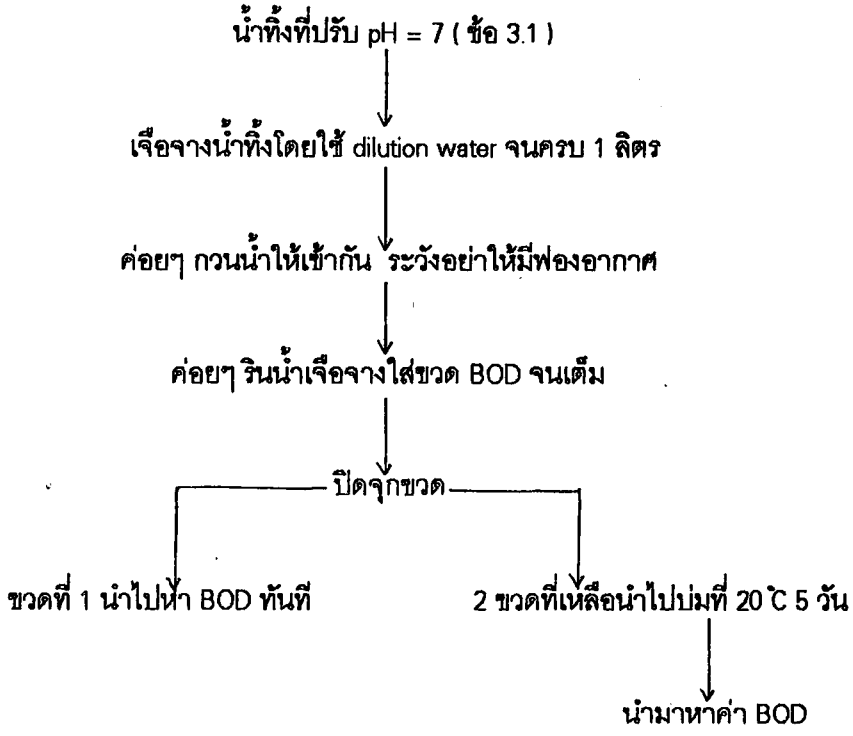


3.3 การเตรียม diluted sample



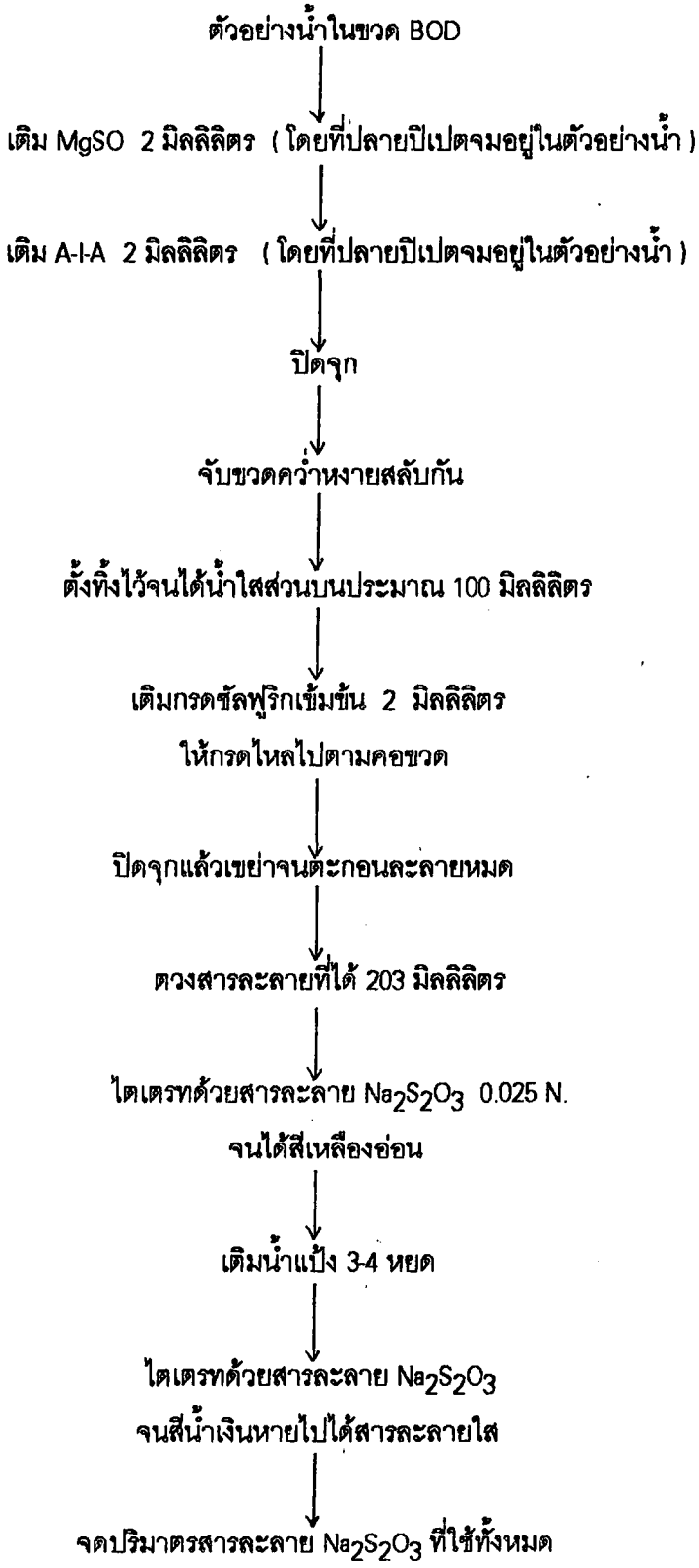
หมายเหตุ : การเตรียม dilution sample ควรเตรียม 3 dilution โดยเลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างโดยการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD อยู่ในช่วงที่กำหนด และ เลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าและต่ำกว่าที่อยู่ติดอีก 2 ขั้นของตาราง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรู้ค่า BOD โดยประมาณก่อน ซึ่งอาจประมาณได้จากค่า COD

3.3 การเตรียม diluted sample



หมายเหตุ : การเตรียม dilution sample ควรเตรียม 3 dilution โดยเลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างโดยการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD อยู่ในช่วงที่กำหนด และ เลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่าง เปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าและต่ำกว่าที่อยู่ติดอีก 2 ขั้นของตาราง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรู้ค่า BOD โดยประมาณก่อน ซึ่งอาจประมาณได้จากค่า COD

3.4 การหา dissolved oxygen



4. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน fermentation liquor ใช้วิธี turbidimetric method of microbiological assay โดยเชื้อ Lactobacillus leichmanii เป็น test organism ใช้ assay medium ของ Merck ซึ่งไม่มีวิตามินบี 12 มีเฉพาะสารที่สำคัญต่อการเจริญของ Lactobacillus leichmannii

4.1 การเตรียม sample assay tube

ปิเปต sample ลงใน test tube 10 มิลลิลิตร

↓

เติม buffer cyanide solution 1 มิลลิลิตร

↓

เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer

↓

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

↓

centrifuge ด้วยความเร็ว 4000 rpm, 15 นาที

เก็บ supernatant ไว้

↓

เจือจาง supernatant ที่ได้ในอัตราส่วน

1 , 1:10 , 1:100 , 1:1000 โดยใช้น้ำกลั่น 2 ครั้ง

↓

ปิเปต supernatant ที่เจือจางแล้วในแต่ละ dilution

ปริมาตร 0.2 , 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ลงใน assay tube

ขนาด 13x100 มิลลิลิตร

↓

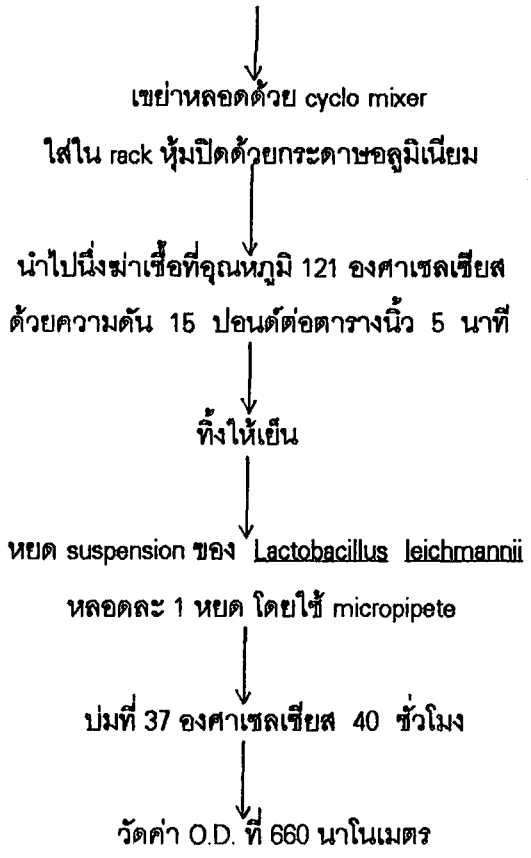
เติมน้ำกลั่นจนครบ 1.5 มิลลิลิตร

↓

เติม double strength assay medium

ทุกหลอด หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร

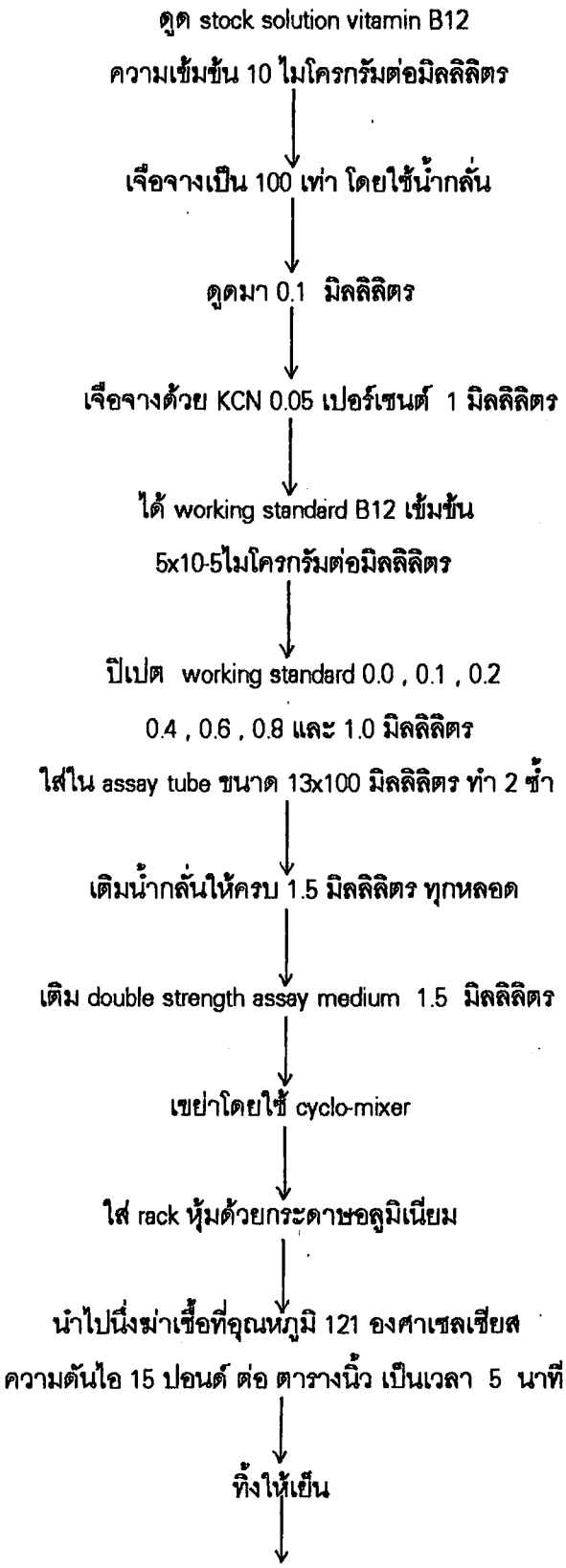
↓

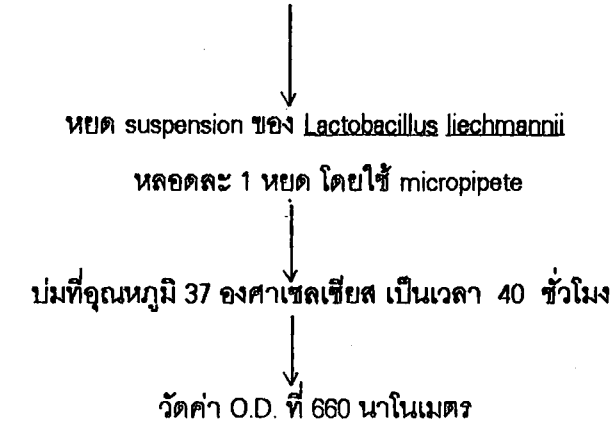


หมายเหตุ: - blank ให้เตรียมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ แต่ไม่ต้องทำการถ่ายเชื้อลงไปทำตามเหมือนขั้นตอนการเตรียม sample assay tube

- เนื่องจากวิตามินบี 12 ที่สร้างขึ้นอยู่ในเซล จึงต้องมีการ break cell โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้ออยู่ cobalamin จะถูกปล่อยออกจากเซล และ เปลี่ยนเป็น syanocobalamin อยู่ในส่วนของ supernatant

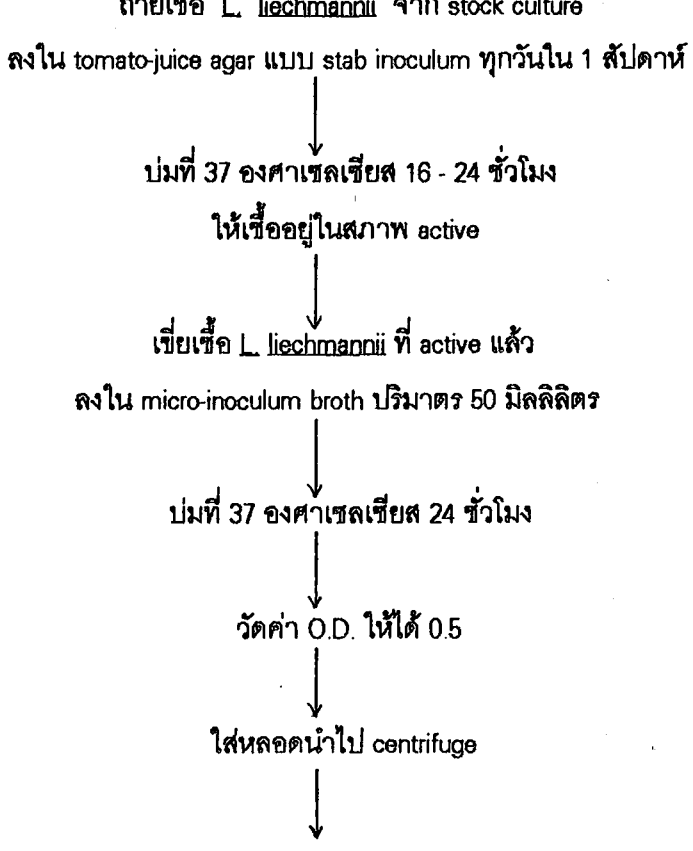
4.2 การเตรียม working vitamin B12

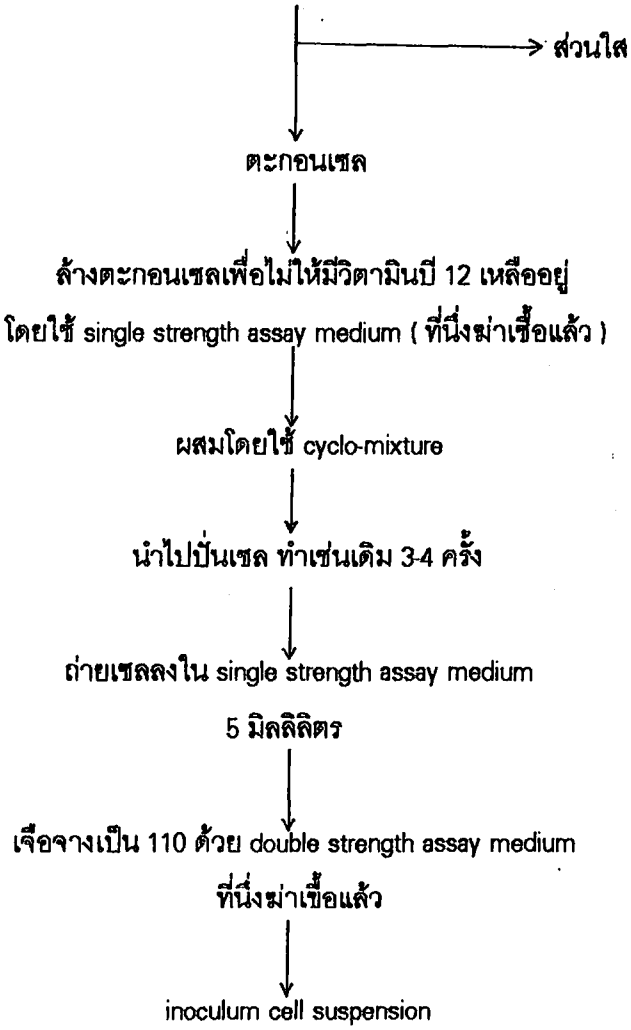




หมายเหตุ: การใช้ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องทำการ calibration curve ทุกครั้ง เพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อ อุณหภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก calibration curve

4.3 การเตรียม suspension ของ Lactobacillus liechmannii




ส่วนใส
ตะกอนเซล
ล้างตะกอนเซลเพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 เหลืออยู่
โดยใช้ single strength assay medium (ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว)
ผสมโดยใช้ cyclo-mixture
นำไปปั่นเซล ทำเช่นเดิม 3-4 ครั้ง
ถ่ายเซลลงใน single strength assay medium
5 มิลลิลิตร
เจือจางเป็น 110 ด้วย double strength assay medium
ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
inoculum cell suspension

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์ผล

1. การคำนวณหาปริมาณ total Carbohydrate ในน้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์ปลาทูน่ากระป๋อง

X = ความเข้มข้นกลูโคสจาก standard curve (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

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

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

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

2. การคำนวณหาปริมาณ crude protein ในน้ำทิ้งจากการผลิตภัณฑ์ปลาทูน่ากระป๋อง

2.1 การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ H_2SO_4 0.1 N.

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

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

2.2 การหาปริมาณโปรตีน

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

% protein = % N x 6.25

a = ปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ในการไทเตรทสารตัวอย่าง

b = ปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ในการไทเตรท blank

c = ความเข้มข้น H_2SO_4 (N)

3. การคำนวณหาค่า BOD ในน้ำทิ้ง

3.1 กรณีไม่เติมเชื้อ

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

เมื่อ D_1 = Do ของสารตัวอย่างที่ทำการเจือจาง ของวันที่ 0

$D_2 = D_o$ ของสารตัวอย่างที่ทำการเจือจางและบ่มที่ 20 องศาเซลเซียส

P = % mixture

$B_1 = D_o$ ของเชื้อคุม (seed control) ก่อนเพาะเลี้ยง

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

f = อัตราส่วนของน้ำเชื้อในตัวอย่างกับใน seed control

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

การพิจารณาผลเพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า BOD

ผลที่น่าเชื่อถือ และ จะใช้ในการคำนวณต่อไปนั้นจะต้องมีค่าปริมาณ DO เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลลิลิตรต่อลิตร และจะต้องมีการลดปริมาณ DO ลงไปอยางน้อย 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้ค่า BOD ที่คำนวณออกมาได้นั้นถูกต้องที่สุด

ในกรณีที่มีค่าปริมาร DO อยู่ในเกณฑ์ดังกล่าวมากกว่า 1 ค่า ให้เลือกค่า DO ที่อยู่ในช่วง % mixture ที่สูงที่สุด

4. การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12

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

$$\text{ปริมาณวิตามินบี 12} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินบี 12 } (10^{-5}\text{ไมโครกรัม/มิลลิลิตร}) \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 แสดงค่า พีเอช ของน้ำทิ้งปลา

ครั้งที่ 1	6.142
ครั้งที่ 2	6.137
ครั้งที่ 3	6.157
ค่าเฉลี่ย	6.145

ตารางที่ จ.2 แสดงค่า Suspened Solid ของน้ำทิ้งปลา

ครั้งที่	น้ำหนักกระดาษ ก่อนกรอง(กรัม)	น้ำหนักกระดาษ หลังกรอง (กรัม)	น้ำหนักที่ได้ (กรัม)
1	0.0882	0.1608	0.0726
2	0.0882	0.1658	0.0776
3	0.0886	0.1550	0.0664
เฉลี่ย			0.0722

ตารางที่ จ.3 แสดงค่าน้ำหนักของน้ำทิ้งปลาปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ครั้งที่ 1	1.0567
ครั้งที่ 2	1.0877
ครั้งที่ 3	1.0535
ครั้งที่ 4	1.0663
ครั้งที่ 5	1.0291
ค่าเฉลี่ย	1.0587

ตารางที่ จ.4 แสดงปริมาตรกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.1 N ที่ใช้ในการไตเตรตหาปริมาณ Crude protein

ตัวอย่าง	ครั้งที่ 1(มล.)	ครั้งที่ 2(มล.)	เฉลี่ย (มล.)
BLANK	0.00	0.00	0.00
น้ำทิ้งปลา	6.00	6.10	6.05

ตารางที่ จ.5 แสดงการวิเคราะห์ total carbohydrate ของสารละลายมาตราฐานกลูโคส ที่ค่า O.D. 488 นาโนเมตร โดยวิธี Phenolic method

ความเข้มข้น glucose (มก./ล)	ค่า O. D. ที่ 488 นาโนเมตร		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000
20	0.235	0.234	0.235
40	0.510	0.511	0.510
60	0.623	0.618	0.620
80	0.877	0.874	0.876
100	1.175	1.195	1.185

ตารางที่ จ.6 แสดงการวิเคราะห์ total carbohydrate ของน้ำทิ้งปลา ที่ค่า O.D. 488 นาโนเมตร โดยวิธี Phenolic method

Dilution	ค่า O. D. ที่ 488 นาโนเมตร		
	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.000	0.000	0.000
10^{-1}	2.465	2.455	2.460
10^{-2}	0.249	0.250	0.250
10^{-3}	0.029	0.029	0.029

ตารางที่ จ.7 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งปลา

เปอร์เซนต์ของตัวอย่างน้ำ	D.O. ณ วันที่ 0 (มิลลิกรัม/ ลิตร)	D.O. ณ วันที่ 5 (มิลลิกรัม / ลิตร)			ผลต่างของ D.O. (มิลลิกรัม/ลิตร)
		ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
0.01	7.75	4.35	4.15	4.20	3.55
0.02	7.75	2.15	1.70	1.83	5.92

ตารางที่ จ.8 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งปลา เมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ก่อนเติมเชื้อ Prop. freudenreichii

เปอร์เซนต์ของตัวอย่างน้ำ	D.O. ณ วันที่ 0 (มิลลิกรัม/ ลิตร)	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	ผลต่างของ D.O. (มิลลิกรัม/ลิตร)
0.01	8.00	1.80	2.00	1.9	6.1

ตารางที่ จ.9 แสดงค่า dissolved oxygen ในน้ำทิ้งปลา เมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดชั่วโมง 120

เปอร์เซนต์ของตัวอย่างน้ำ	D.O. ณ วันที่ 0 (มก./ ล.)	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ชุดที่ 3	ผลต่างของ D.O. (มก./ลิตร)
0.01	8.80	7.1	6.95	7.025	0.975

ตารางที่ จ.10 แสดงค่า 5-day BOD น้ำทิ้งปลา

อาหาร	ค่า BOD
น้ำทิ้งปลา	34,650
น้ำทิ้งปลาเติมสาร	61,000
น้ำทิ้งปลาหลังการหมัก	9,750

หมายเหตุ น้ำทิ้งเติมสาร คือ น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัม/ลิตร

methionine 2 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร

riboflavin 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

น้ำทิ้งปลาหลังการหมัก คือ น้ำทิ้งปลาเติมสารหลังการหมักที่เวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ จ.11 แสดงผลการศึกษาเปรียบเทียบความเหมาะสมของกล้าเชื้อที่ใช้ ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii

ชั่วโมงที่	กล้าเชื้อ 2 %			กล้าเชื้อ 5%		
	ชุดที่ 1	ชุดที่2	ค่าเฉลี่ย	ชุดที่1	ชุดที่2	ค่าเฉลี่ย
12	0.080	0.083	0.081	0.087	0.085	0.086
24	0.233	0.251	0.242	0.262	0.270	0.266
36	0.289	0.301	0.295	0.343	0.355	0.349
48	0.350	0.356	0.353	0.392	0.414	0.403
60	0.376	0.388	0.382	0.411	0.423	0.417
72	0.387	0.395	0.391	0.430	0.440	0.435
84	0.446	0.446	0.446	0.456	0.448	0.452
96	0.448	0.446	0.447	0.480	0.492	0.486
108	0.447	0.440	0.443	0.478	0.468	0.473
120	0.440	0.436	0.438	0.444	0.450	0.447

หมายเหตุ กล้าเชื้อ ค่า O. D. ที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.455

ตารางที่ จ.12 แสดงผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน complete medium สภาวะ stationary flask พีเอช เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ของ กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซนต์

ชั่วโมงที่	ชุดที่ 1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย
12	0.078	0.083	0.081
24	0.366	0.342	0.354
36	0.378	0.385	0.382
48	0.476	0.445	0.457
60	0.481	0.454	0.467
72	0.492	0.453	0.473
84	0.498	0.457	0.477
96	0.504	0.468	0.486
108	0.506	0.465	0.485
120	0.493	0.465	0.479

หมายเหตุ กล้าเชื้อ ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของ complete medium เท่ากับ 0.457

ตารางที่ จ.13 แสดงผลการศึกษาค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรและน้ำหนักแห้งของเชื้อ (dry weight cell) เมื่อเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน.complete medium สภาวะ stationary flask พีเอช เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 96 ชั่วโมง

dilition	ชุดที่1	ชุดที่ 2	ค่าเฉลี่ย	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)
1:1	0.450	0.450	0.450	3.5
1:2	0.237	0.237	0.237	1.15
1:4	0.122	0.212	0.121	1.02
1:6	0.082	0.082	0.082	0.74
1:8	0.060	0.059	0.060	0.49

หมายเหตุ กล้าเชื้อ ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรใน Complate medium เท่ากับ 0.455

ตารางที่ จ.14 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ glucose และ yeast extract ต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask พีเอช เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชั่วโมงที่	complete medium	น้ำทิ้งปลา	น้ำทิ้งปลา + glucose	น้ำทิ้งปลา + yeast extract	น้ำทิ้งปลา + glucose + yeast extract
24	0.257	1.086	1.053	1.129	1.070
48	0.378	1.396	1.239	1.294	1.116
72	0.499	1.533	1.308	1.439	1.159
96	0.538	1.618	1.397	1.625	1.116
120	0.530	1.705	1.422	1.609	1.055

หมายเหตุ กล้าเชื้อ ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรใน complete medium เท่ากับ 0.455
ใน น้ำทิ้งปลา เท่ากับ 0.460

ตารางที่ จ.15 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ glucose ปริมาณต่า งๆ ต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ สภาวะ stationary flask พีเอช เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชั่วโมงที่	complete medium	น้ำทิ้งปลา	น้ำทิ้งปลา +Glu 0%	น้ำทิ้งปลา +Glu 1%	น้ำทิ้งปลา+ Glu1. 5%	น้ำทิ้งปลา +Glu 2%	น้ำทิ้งปลา +Glu 2.5%	น้ำทิ้งปลา +Glu 3%
48	0.377	1.105	1.104	1.032	1.020	0.999	0.933	0.958
72	0.523	1.156	1.181	1.103	1.072	1.035	0.966	0.992
96	0.586	1.463	1.310	1.045	0.991	0.960	0.893	0.944
120	0.578	1.522	1.432	0.954	0945	0.913	0.838	0.898

หมายเหตุ กล้าเชื้อ ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตร ใน complete medium เท่ากับ 0.457
ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร ใน น้ำปลา เท่ากับ 0.460
glu เท่ากับ glucose

ตารางที่ จ.16 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ปริมาณต่างๆ ต่อการเจริญของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งปลาที่เติม glucose 1.0 เปอร์เซนต์ สภาวะ stationary flask พีเอช เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชั่วโมงที่	complete medium	น้ำทิ้งปลา	น้ำทิ้งปลา +yeast 0%	น้ำทิ้งปลา +yeast 0.1%	น้ำทิ้งปลา +yeast 0.2%	น้ำทิ้งปลา +yeast 0.3%	น้ำทิ้งปลา +yeast 0.4%	น้ำทิ้งปลา +yeast 0.5 %	น้ำทิ้งปลา +yeast 1 %
48	0.377	1.105	1.116	1.120	1.074	1.093	1.100	1.059	1.049
72	0.480	1.156	1.143	1.146	1.125	1.122	1.127	1.103	1.091
96	0.521	1.463	1.088	1.100	1.091	1.097	1.090	1.045	1.029
120	0.508	1.522	1.034	1.033	1.056	1.044	1.050	1.018	0.974

หมายเหตุ กล้าเชื้อ ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตรใน complete medium เท่ากับ 0.457

ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตรใน น้ำปลา ได้ 0.460

yeast เท่ากับ yeast extract

ตารางที่ จ.17 แสดงการศึกษาสภาวะอิทธิพลของเกลือโคบอลท์ ปริมาณต่างๆ ต่อการเจริญของ เชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask พีเอช เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชั่วโมงที่	น้ำทิ้งปลา	น้ำทิ้งปลา+ Cobalt 2mg/l	น้ำทิ้งปลา + Cobalt 4mg/l	น้ำทิ้งปลา+ Cobalt 6 mg/l	น้ำทิ้งปลา + Cobalt 8 mg /l	น้ำทิ้งปลา + Cobalt 10mg/l	น้ำทิ้งปลา+ Cobalt 14mg/l	น้ำทิ้งปลา+ Cobalt 16mg/l	น้ำทิ้งปลา+ Cobalt 20mg/l	น้ำทิ้งปลา+ Cobalt 24mg/l
48	1.396	1.337	1.340	1.282	1.269	1.259	1.210	1.199	1.109	1.047
72	1.533	1.417	1.406	1.371	1.357	1.358	1.309	1.284	1.240	1.163
96	1.618	1.554	1.532	1.498	1.464	1.456	1.384	1.367	1.309	1.261
120	1.705	1.558	1.535	1.509	1.470	1.467	1.400	1.375	1.319	1.268

หมายเหตุ กล้าเชื้อ ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร ในน้ำทิ้งปลา เท่ากับ 0.459

ตารางที่ จ.18 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 48

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.37
0.5	0.50
1.0	0.73
2.0	1.12
3.0	1.40
4.0	1.70
5.0	1.85

ตารางที่ จ.19 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี12ใน (A) น้ำทิ้งปลา, (B) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , (C) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร,(D)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ,(E)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 48

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
A	1.75 2.15 2.60	1.80 2.00 1.70	1.05 1.25 1.85	0.65 0.70 0.80
B	1.90 2.20 2.40	1.60 1.80 1.70	0.90 1.20 1.50	0.60 0.75 0.95
C	2.10 2.10 2.25	1.30 1.45 1.75	0.90 1.25 1.30	0.65 0.65 0.80
D	1.80 2.20 2.50	1.65 1.55 1.75	0.90 1.10 1.30	0.70 0.65 0.90
E	2.10 2.50 2.80	1.85 2.05 2.00	1.05 1.55 1.70	0.70 0.85 1.25

ตารางที่ จ.20 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 72

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.47
0.5	0.65
1.0	0.92
2.0	1.22
3.0	1.55
4.0	1.62
5.0	1.80

ตารางที่ จ.21 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี12ใน (A) น้ำทิ้งปลา, (B) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , (C) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร,(D)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ,(E)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 72

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
A	1.90 2.15 2.15	1.60 1.70 1.50	1.00 1.10 1.40	0.55 0.80 0.90
B	1.80 1.90 2.35	1.55 1.45 1.50	0.90 1.30 1.55	0.75 1.05 0.95
C	1.65 2.05 1.95	1.60 1.55 1.80	0.80 1.20 1.50	0.70 0.70 0.95
D	1.85 1.80 2.50	1.50 1.60 1.70	1.00 1.30 1.50	0.80 0.95 1.00
E	2.00 2.20 2.30	1.60 1.75 1.8	1.00 1.15 1.5	0.70 1.00 0.95

ตารางที่ จ.22 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 96

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.16
0.5	0.43
1.0	0.70
2.0	1.20
3.0	1.52
4.0	1.70
5.0	1.75

ตารางที่ จ.23 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี12ใน (A) น้ำทิ้งปลา, (B) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , (C) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร,(D)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ,(E)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 96

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
A	1.60 1.80 2.20	1.60 1.65 1.60	0.85 1.20 1.55	0.90 0.60 0.70
B	1.70 1.80 2.10	1.45 1.50 1.60	0.85 1.05 1.35	0.60 0.75 0.70
C	1.65 1.55 2.25	1.40 1.30 1.60	1.00 1.30 1.20	0.70 0.65 0.95
D	1.75 1.65 2.60	1.50 1.40 1.75	0.80 1.30 1.45	0.55 0.75 1.00
E	1.70 1.90 2.00	1.70 1.50 1.60	0.90 1.05 1.55	0.65 0.65 0.95

ตารางที่ จ.24 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 120

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.20
0.5	0.32
1.0	0.65
2.0	0.82
3.0	1.15
4.0	1.65
5.0	1.80

ตารางที่ จ.25 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี12ใน (A) น้ำทิ้งปลา, (B) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร , (C) น้ำทิ้งปลาเติม$CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร,(D)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ,(E)น้ำทิ้งปลาเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตรและ riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 120

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
A	1.45 1.80 1.80	1.15 1.25 1.35	0.85 1.05 1.05	0.57 0.80 0.60
B	1.55 1.55 2.20	1.10 1.40 1.65	1.05 0.75 1.15	0.55 0.65 0.85
C	1.75 1.75 1.40	1.60 1.35 1.80	0.85 1.00 1.30	0.40 0.50 0.85
D	1.75 2.00 2.05	1.50 1.65 1.60	0.85 1.20 1.35	0.50 0.70 0.75
E	1.50 2.15 2.10	1.35 1.55 1.60	0.80 1.10 1.25	0.55 0.65 0.70

ตารางที่ จ.26 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 24

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.30
0.5	0.45
1.0	0.76
2.0	1.12
3.0	1.50
4.0	1.65
5.0	1.80

ตารางที่ จ.27 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ชั่วโมงที่ 24

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
C.M. (stat.flask)	0.60 0.65 0.75	0.50 0.50 0.55	0.40 0.45 0.35	0.40 0.40 0.30
C.M. (batch fer.)	0.65 0.72 0.80	0.55 0.65 0.70	0.45 0.45 0.50	0.40 0.42 0.45

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.28 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 48

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.15
0.5	0.42
1.0	0.71
2.0	1.12
3.0	1.50
4.0	1.70
5.0	1.85

ตารางที่ จ.29 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ชั่วโมงที่ 48

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
C.M. (stat.flask)	0.70 0.80 0.85	0.55 0.50 0.50	0.50 0.37 0.35	0.50 0.45 0.43
C.M. (batch fer.)	0.75 0.75 0.93	0.45 0.40 0.43	0.40 0.40 0.27	0.45 0.45 0.25

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.30 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 72

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.17
0.5	0.25
1.0	0.50
2.0	0.80
3.0	1.20
4.0	1.55
5.0	1.80

ตารางที่ จ.31 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ชั่วโมงที่ 72

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
C.M. (stat.flask)	0.67 1.00 1.00	0.55 0.50 0.55	0.43 0.43 0.45	0.47 0.55 0.45
C.M. (batch fer.)	0.70 0.90 1.20	0.47 0.43 0.60	0.45 0.45 0.42	0.47 0.60 0.45

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.32 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 96

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.23
0.5	0.42
1.0	0.75
2.0	1.15
3.0	1.35
4.0	1.56
5.0	1.65

ตารางที่ จ.33 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ชั่วโมงที่ 96

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
C.M. (stat.flask)	0.42 0.60 0.85	0.20 0.23 0.30	0.27 0.20 0.15	0.15 0.17 0.10
C.M. (batch fer.)	0.50 0.60 0.90	0.33 0.35 0.27	0.17 0.30 0.20	0.37 0.20 0.17

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.34 แสดงค่า O.D. 660 นาโนเมตร ของ Working standard ชั่วโมงที่ 120

ความเข้มข้น Working standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.15
0.5	0.32
1.0	0.54
2.0	1.10
3.0	1.30
4.0	1.65
5.0	1.70

ตารางที่ จ.35 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ชั่วโมงที่ 120

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
C.M. (stat.flask)	0.65 0.45 0.58	0.15 0.16 0.18	0.09 0.14 0.13	0.08 0.10 0.11
C.M. (batch fer.)	0.50 0.60 0.90	0.32 0.35 0.27	0.17 0.30 0.20	0.37 0.20 0.18

หมายเหตุ C.M. เท่ากับ complete medium

stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.36 แสดงค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตรของ Working standard ชั่วโมงที่ 24

ความเข้มข้นWorking standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.27
0.5	0.40
1.0	0.75
2.0	1.20
3.0	1.50
4.0	1.65
5.0	1.77

ตารางที่ จ.37 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร และ riboflavin 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 24

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
น้ำทิ้งปลา (stat.flask)	1.80 2.40 2.50	1060 1.47 1.82	0.93 1.02 1.30	0.50 0.55 0.77
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.85 2.02 2.67	1.55 1.60 1.75	0.97 1.35 1.50	0.35 0.52 0.85

หมายเหตุ stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.38 แสดงค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตรของ Working standard ชั่วโมงที่ 48

ความเข้มข้นWorking standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.25
0.5	0.50
1.0	0.77
2.0	1.15
3.0	1.30
4.0	1.60
5.0	1.75

ตารางที่ จ.39 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร และ riboflavin 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 48

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
น้ำทิ้งปลา (stat.flask)	2.15 2.42 2.95	1.55 1.70 1.95	0.77 1.50 1.80	0.30 0.65 0.87
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.80 2.30 2.85	1.60 2.00 2.15	0.90 1.40 1.50	0.30 0.55 0.82

หมายเหตุ stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.40 แสดงค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตรของ Working standard ชั่วโมงที่ 72

ความเข้มข้นWorking standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.20
0.5	0.35
1.0	0.44
2.0	1.05
3.0	1.30
4.0	1.55
5.0	1.80

ตารางที่ จ.41 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร และ riboflavin 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 72

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
น้ำทิ้งปลา (stat.flask)	1.75 2.25 2.50	1.45 1.60 1.60	1.00 1.05 1.35	1.05 0.70 0.85
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.75 2.05 2.70	1.50 1.95 1.95	1.00 0.95 1.40	0.85 0.75 0.75

หมายเหตุ stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.42 แสดงค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตรของ Working standard ชั่วโมงที่ 96

ความเข้มข้นWorking standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.30
0.5	0.55
1.0	0.83
2.0	1.40
3.0	1.60
4.0	1.70
5.0	1.75

ตารางที่ จ.43 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร และ riboflavin 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 96

dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
น้ำทิ้งปลา (stat.flask)	1.67 1.65 1.65	1.25 1.37 1.42	0.87 0.85 1.15	0.40 0.45 0.72
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.65 1.80 2.40	1.55 1.65 1.55	0.70 1.15 1.35	0.40 0.57 0.75

หมายเหตุ , stat.flask เท่ากับ stationary flask

batch fer เท่ากับ batch fermenter

ตารางที่ จ.44 แสดงค่า O.D.ที่ 660 นาโนเมตรของ Working standard ชั่วโมงที่ 120

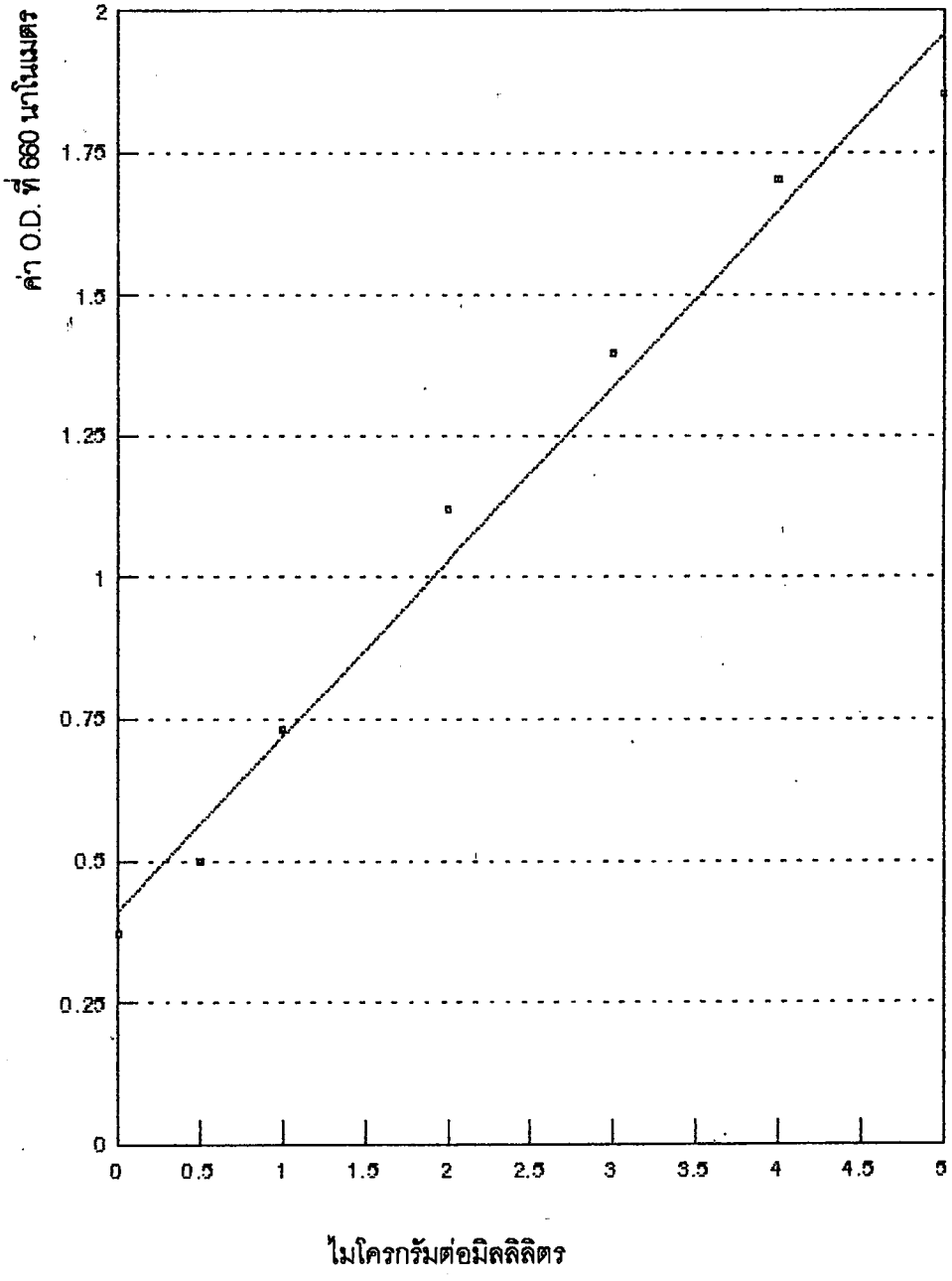
ความเข้มข้นWorking standard (ไมโครกรัม/ลิตร)	ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร
0.0	0.35
0.5	0.55
1.0	0.90
2.0	0.10
3.0	0.50
4.0	0.70
5.0	1.83

ตารางที่ จ.45 แสดงค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งปลาเมื่อเติม $CoSO_4 7H_2O$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ,methionine 2 มิลลิกรัมต่อ100 มิลลิลิตร และ riboflavin 100 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 120

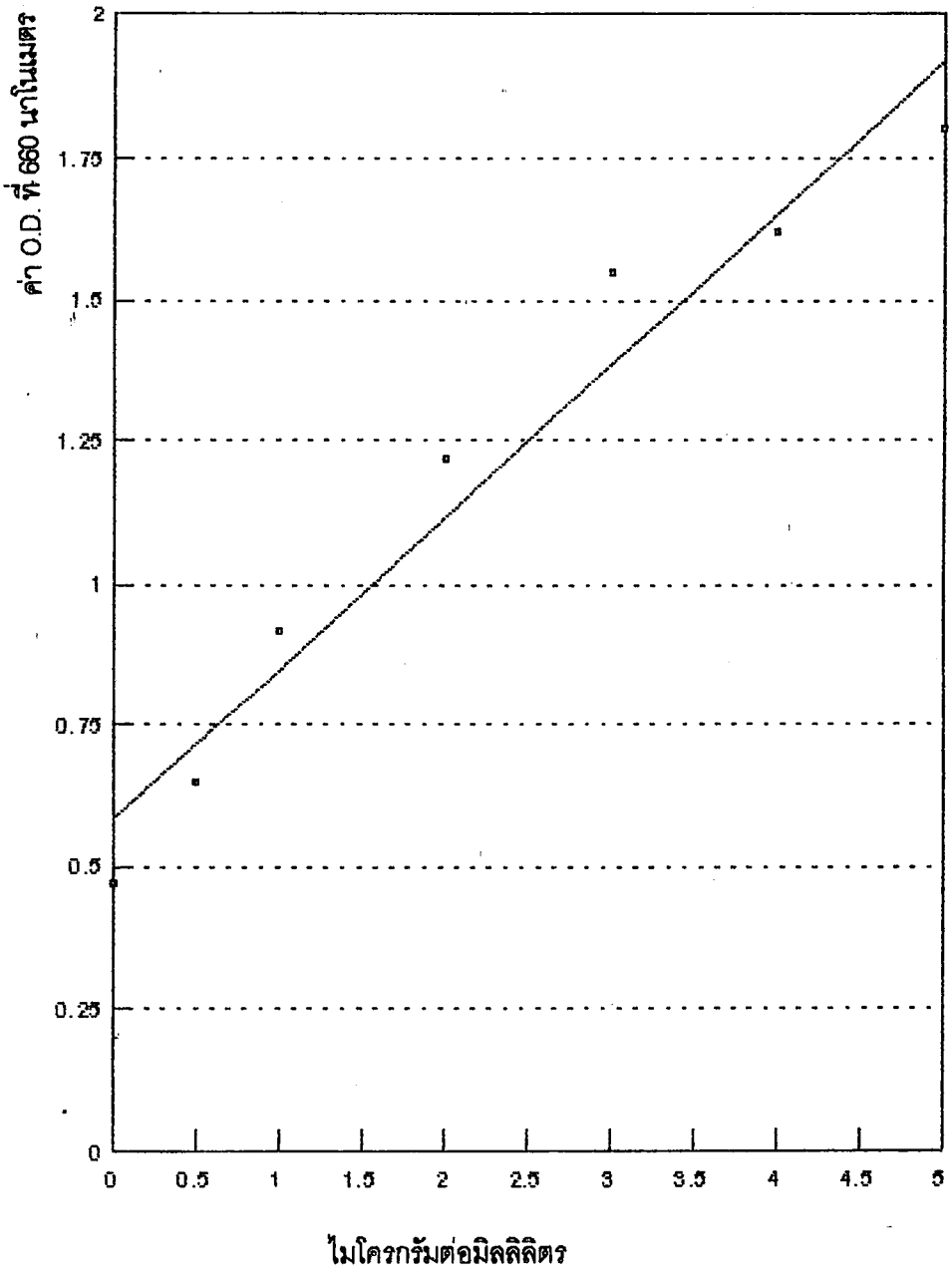
dilution	dilution 10^0	dilution 10^{-1}	dilution 10^{-2}	dilution 10^{-3}
อาหาร	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0	0.2 0.5 1.0
น้ำทิ้งปลา (stat.flask)	1.75 1.60 1.55	1.35 1.20 1.40	0.80 0.75 0.85	0.45 0.40 0.60
น้ำทิ้งปลา (batch fer.)	1.65 1.77 1.85	1.57 1.50 1.50	1.00 1.20 1.25	0.40 0.52 0.65

หมายเหตุ stat.flask เท่ากับ stationary flask

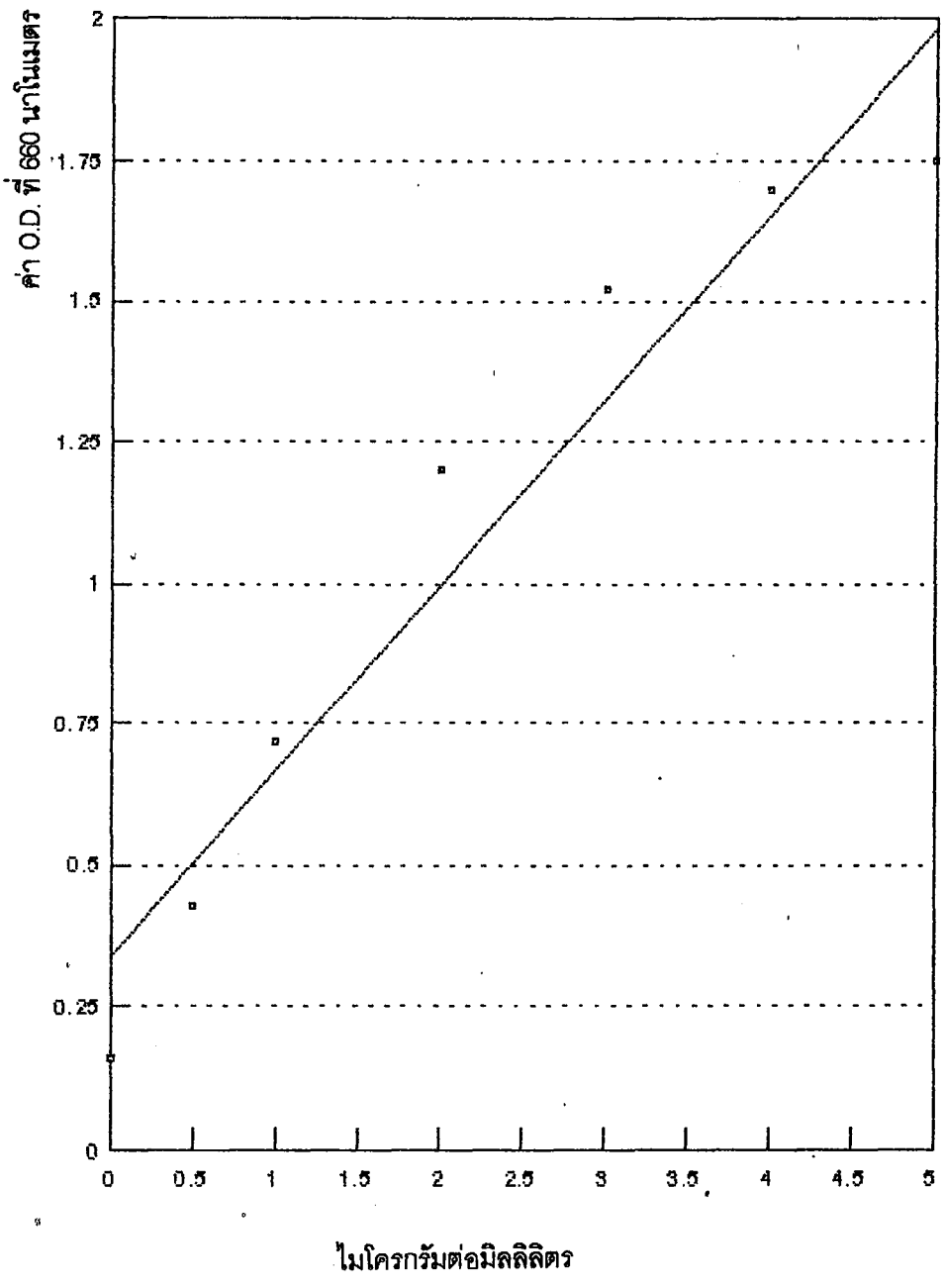
batch fer เท่ากับ batch fermenter



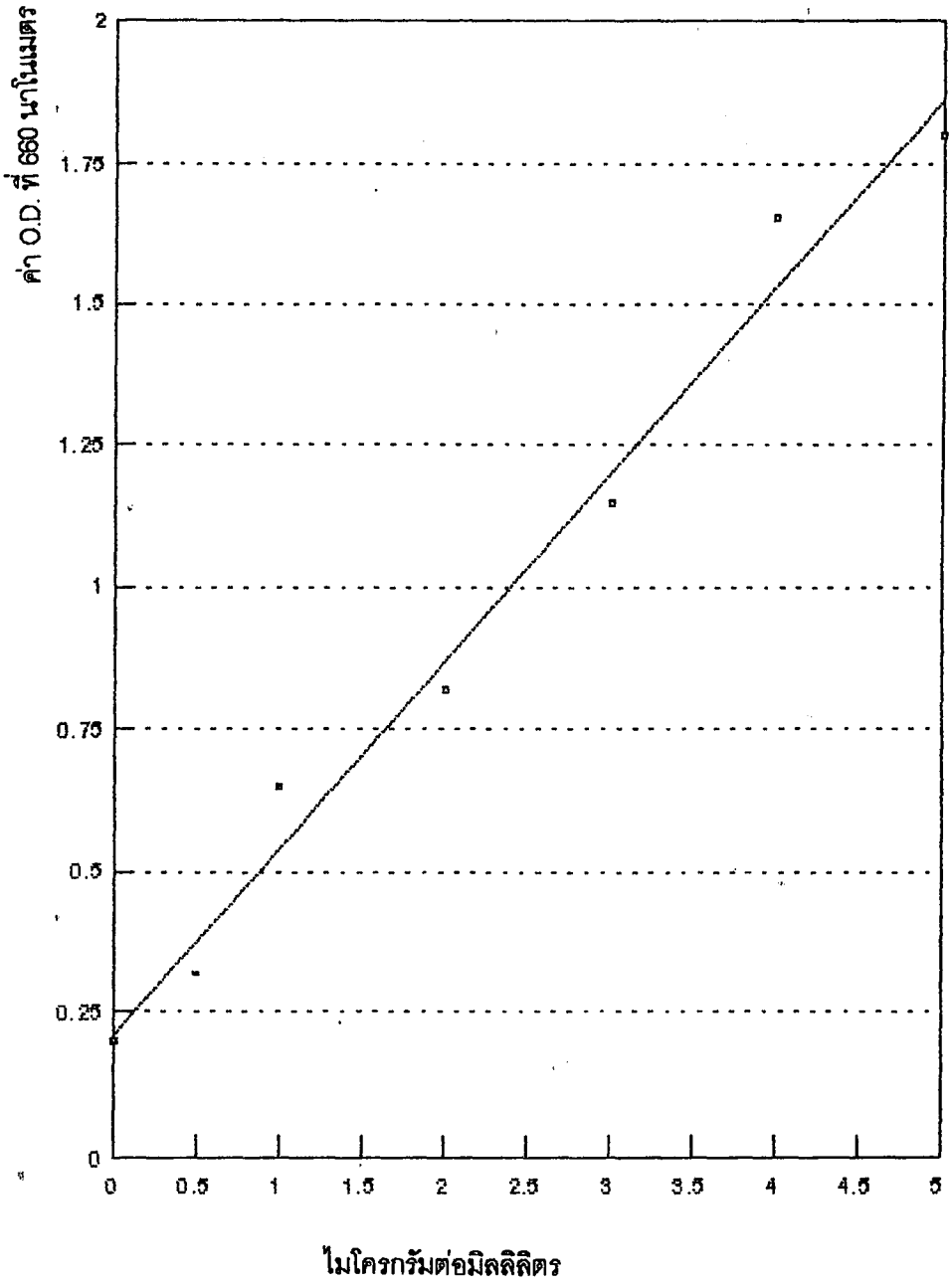
รูปที่ จ.1 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 48 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ



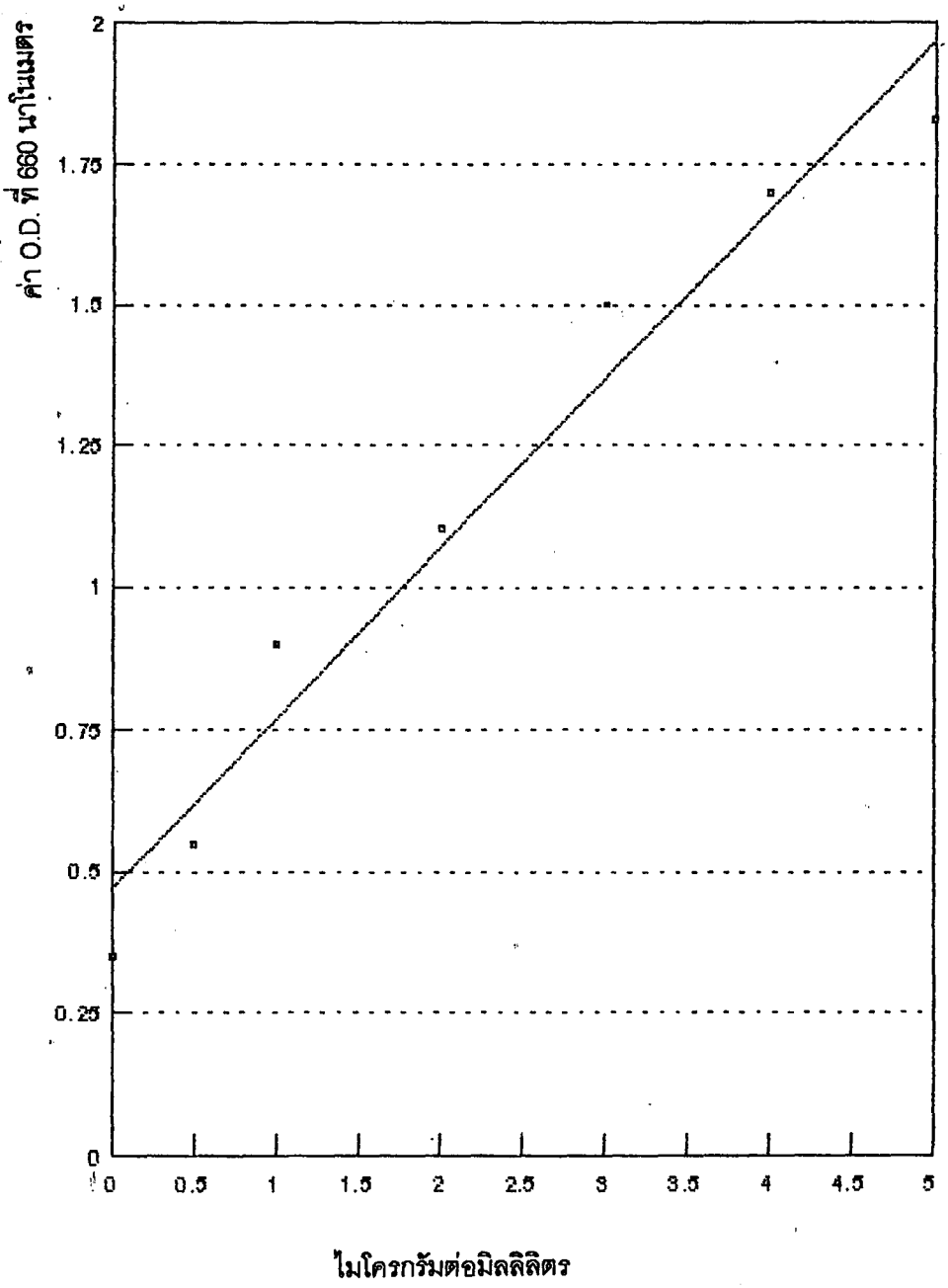
รูปที่ จ.2 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 72 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ



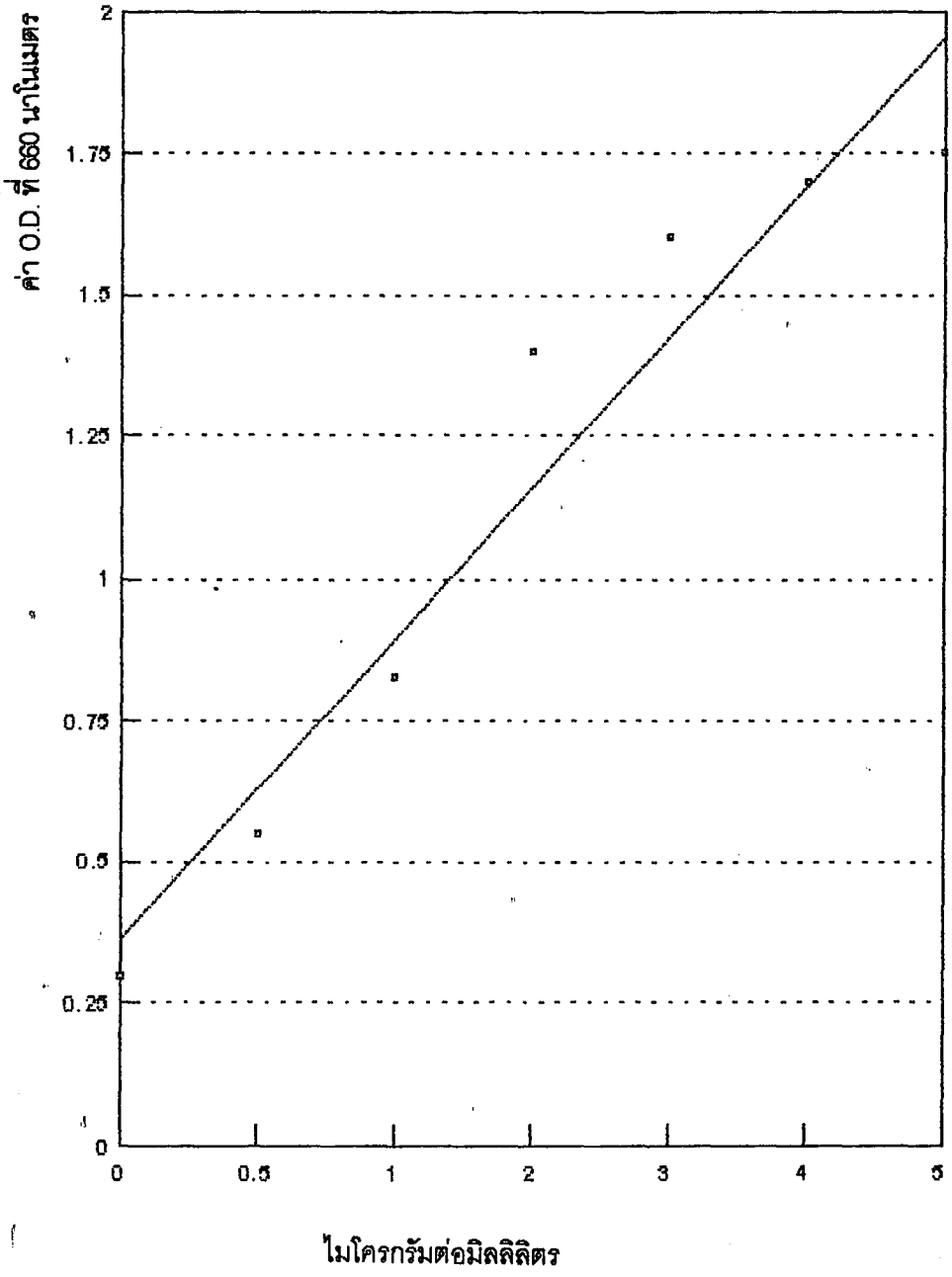
รูปที่ จ.3 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 96 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ



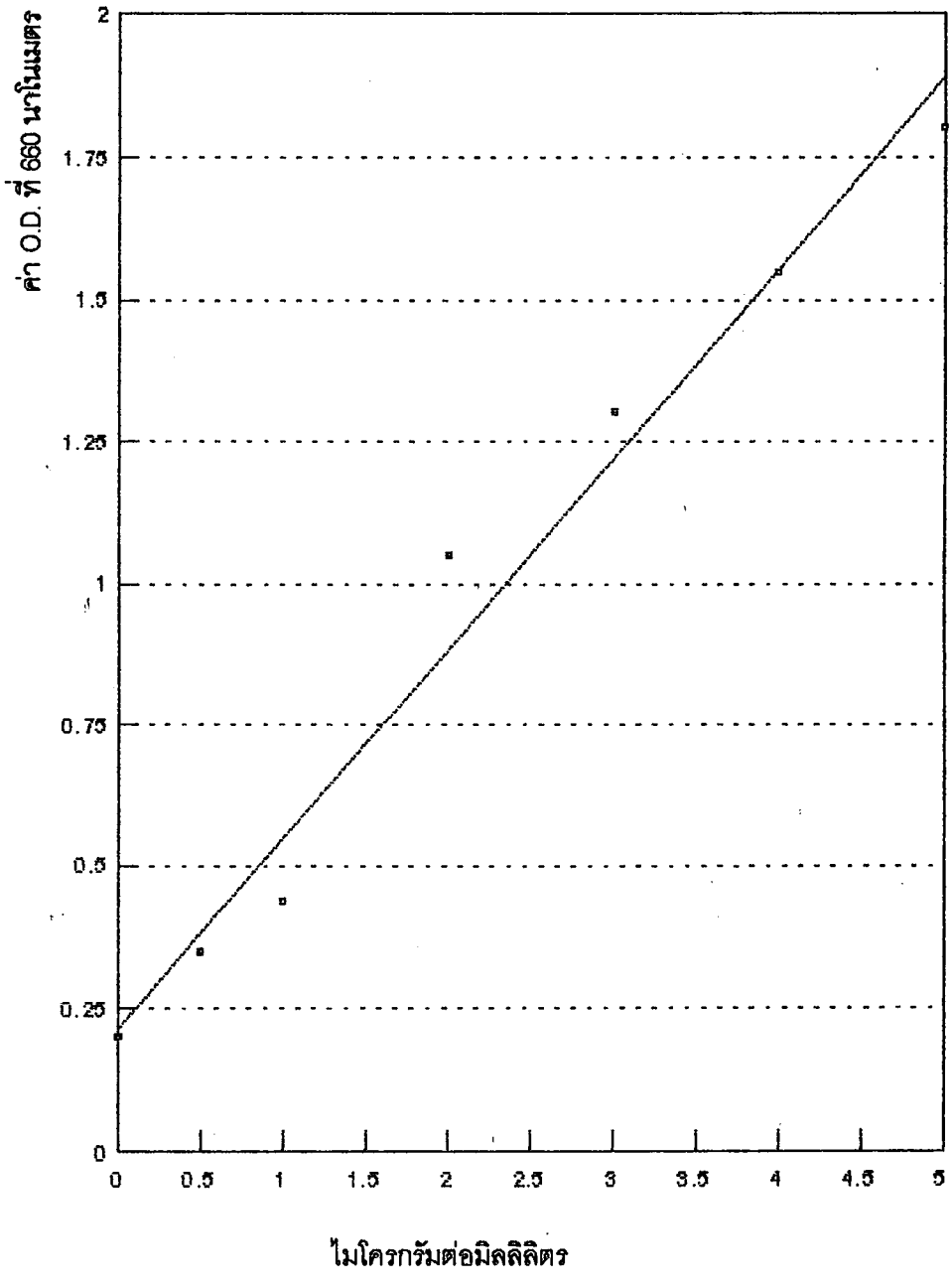
รูปที่ จ.4 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 120 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ในน้ำทิ้งปลา และน้ำทิ้งปลาเติมสารต่างๆ



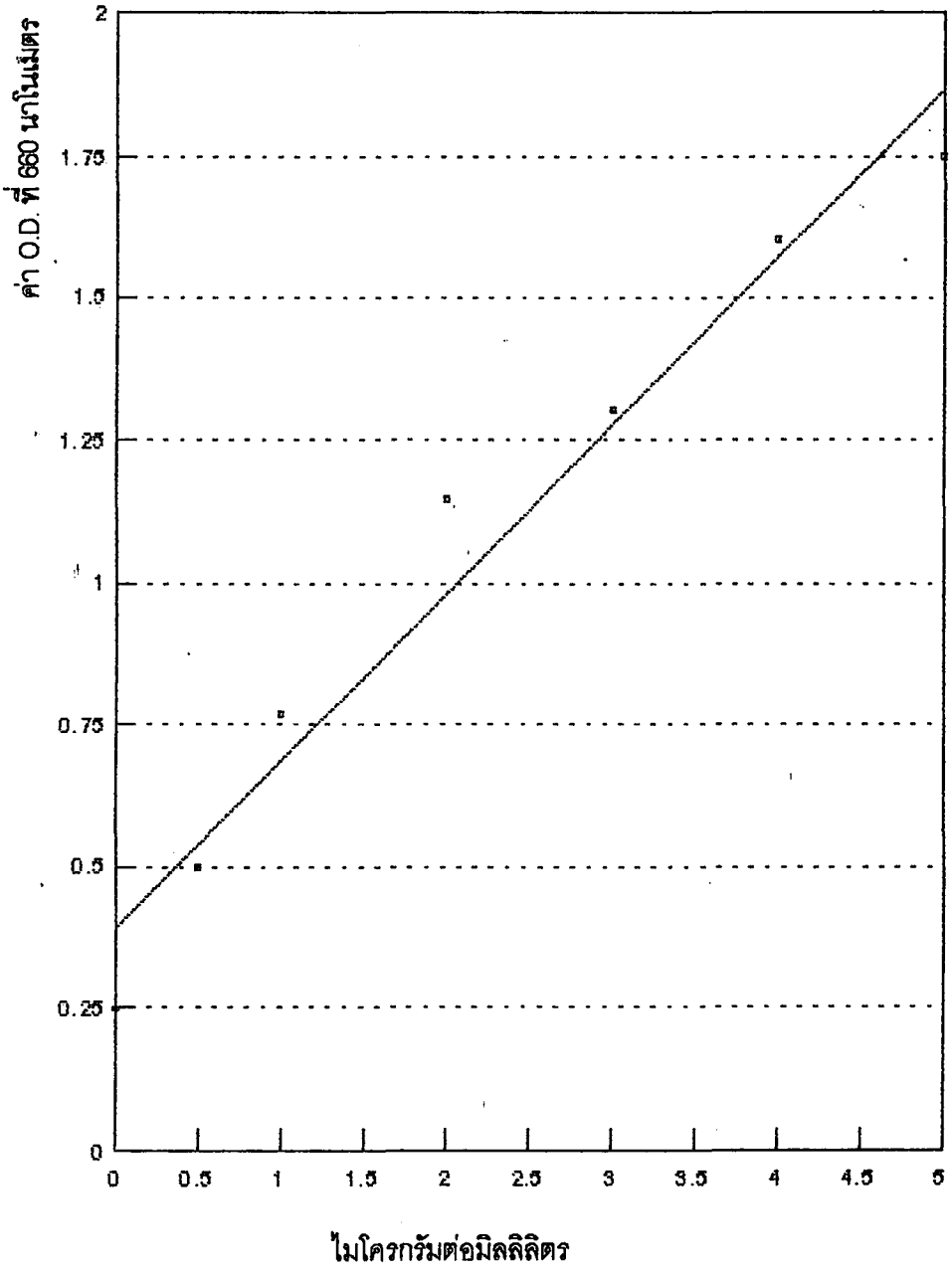
รูปที่ จ.5 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 24 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



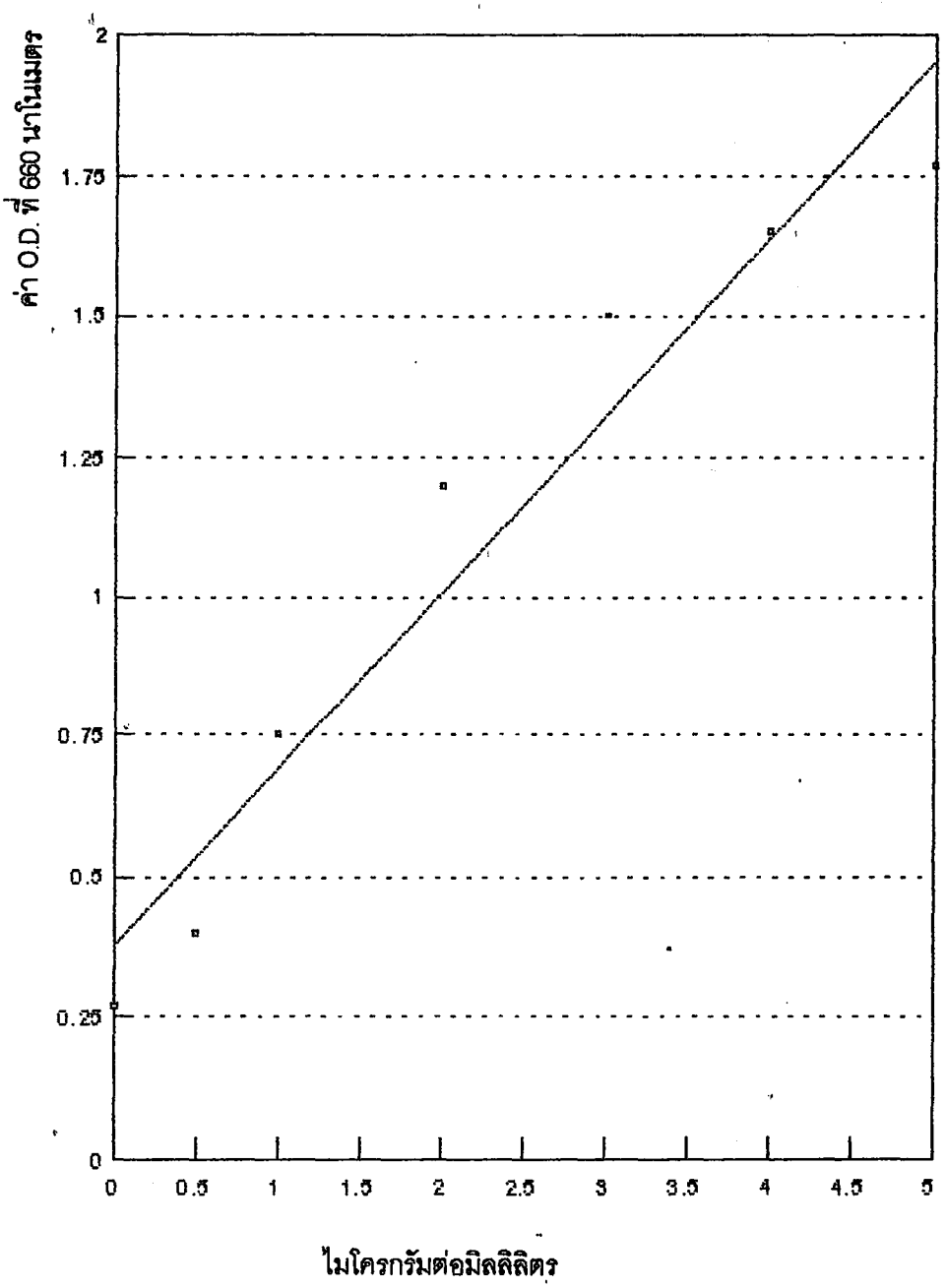
รูปที่ จ.6 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 48 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



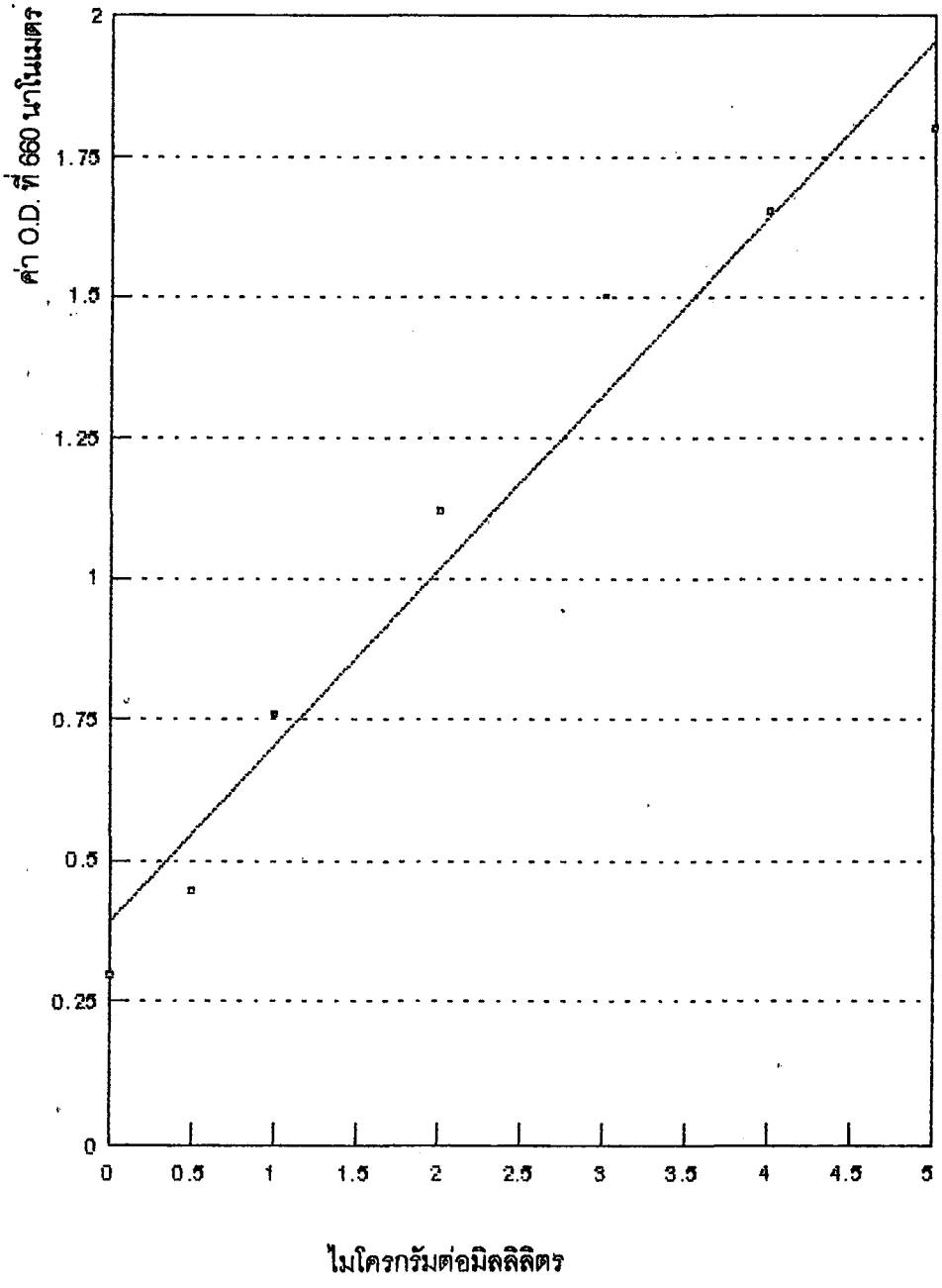
รูปที่ จ.7 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 72 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



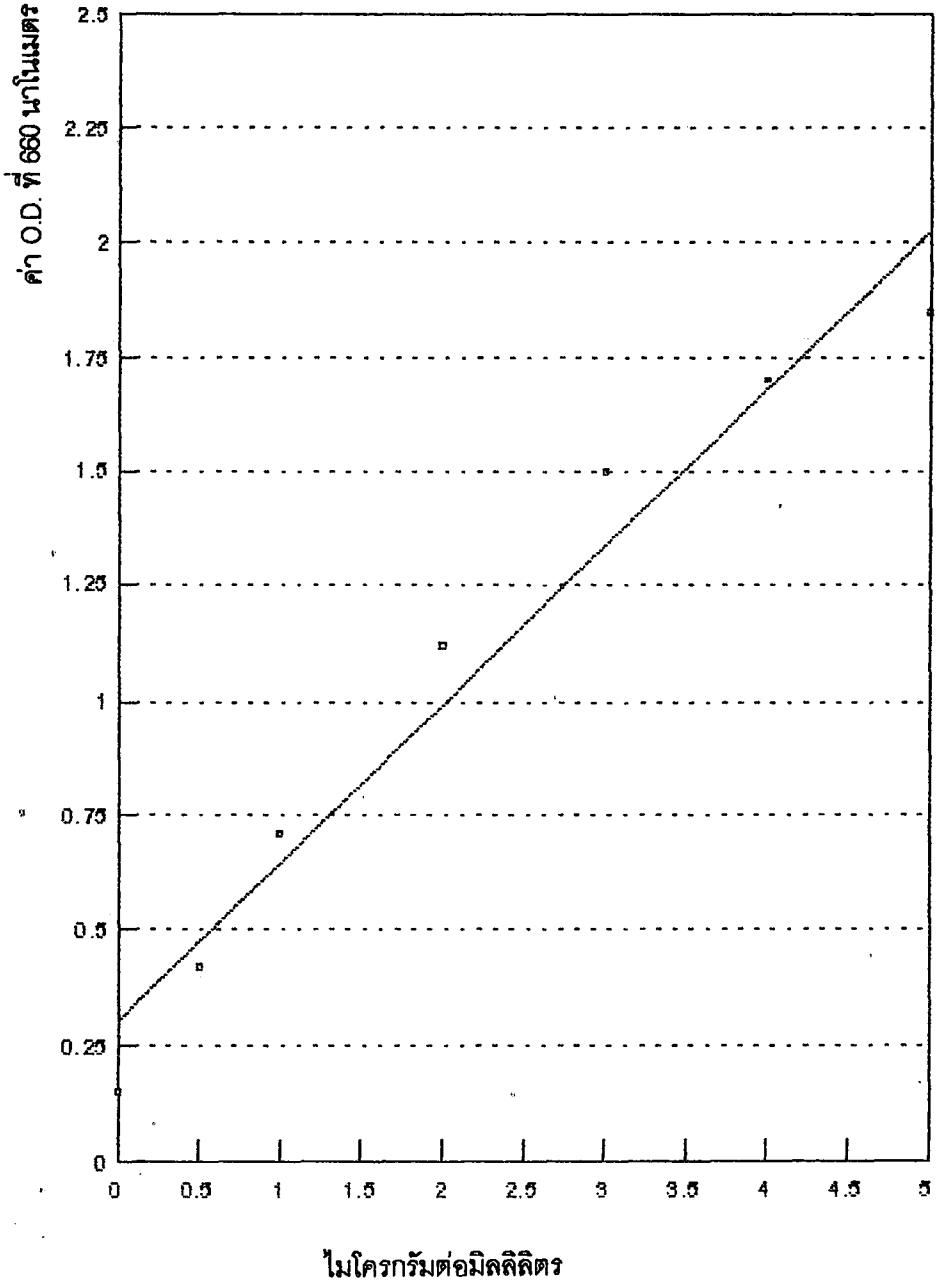
รูปที่ จ.8 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 96 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



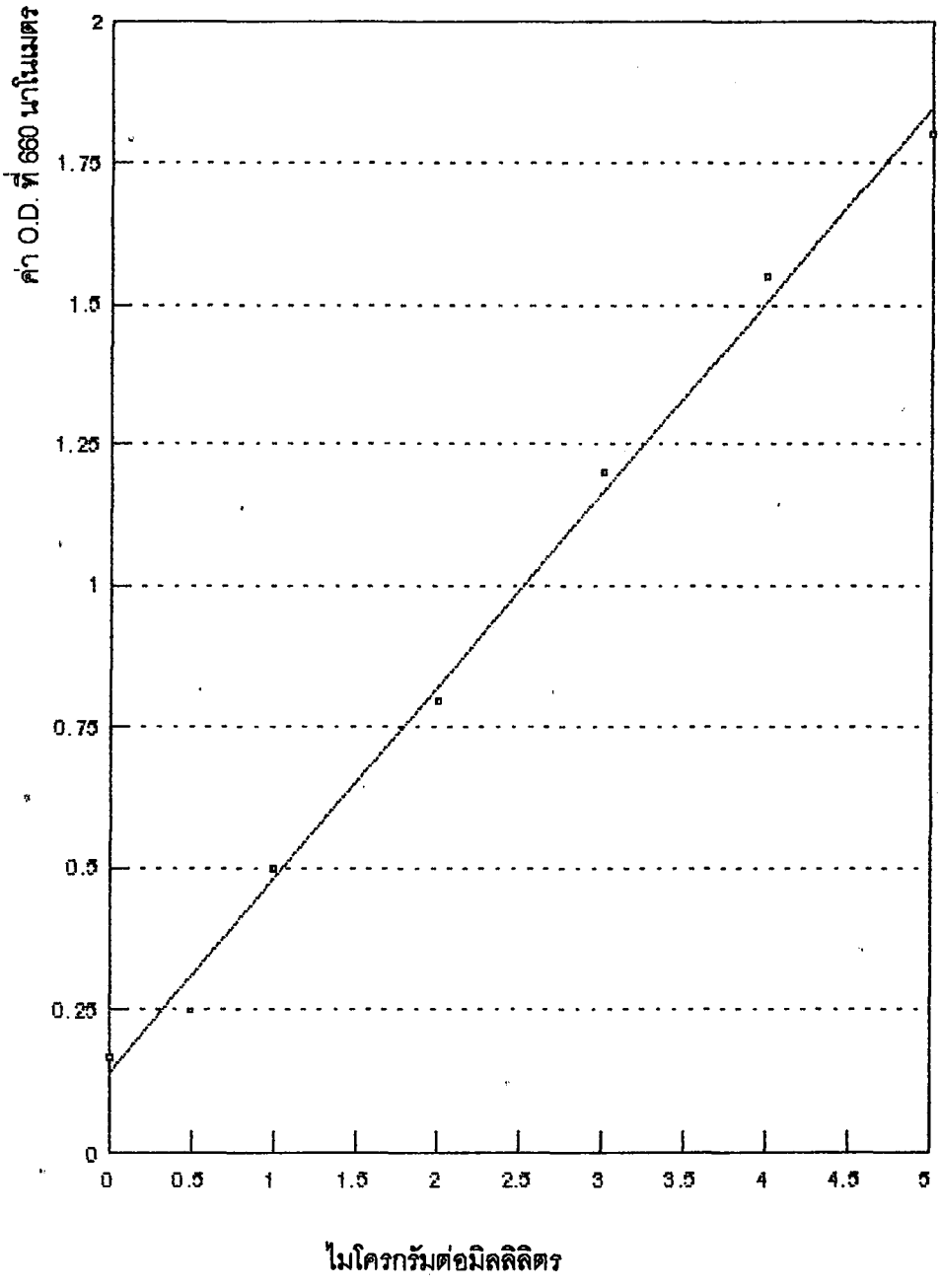
รูปที่ จ.9 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 120 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน complete medium สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



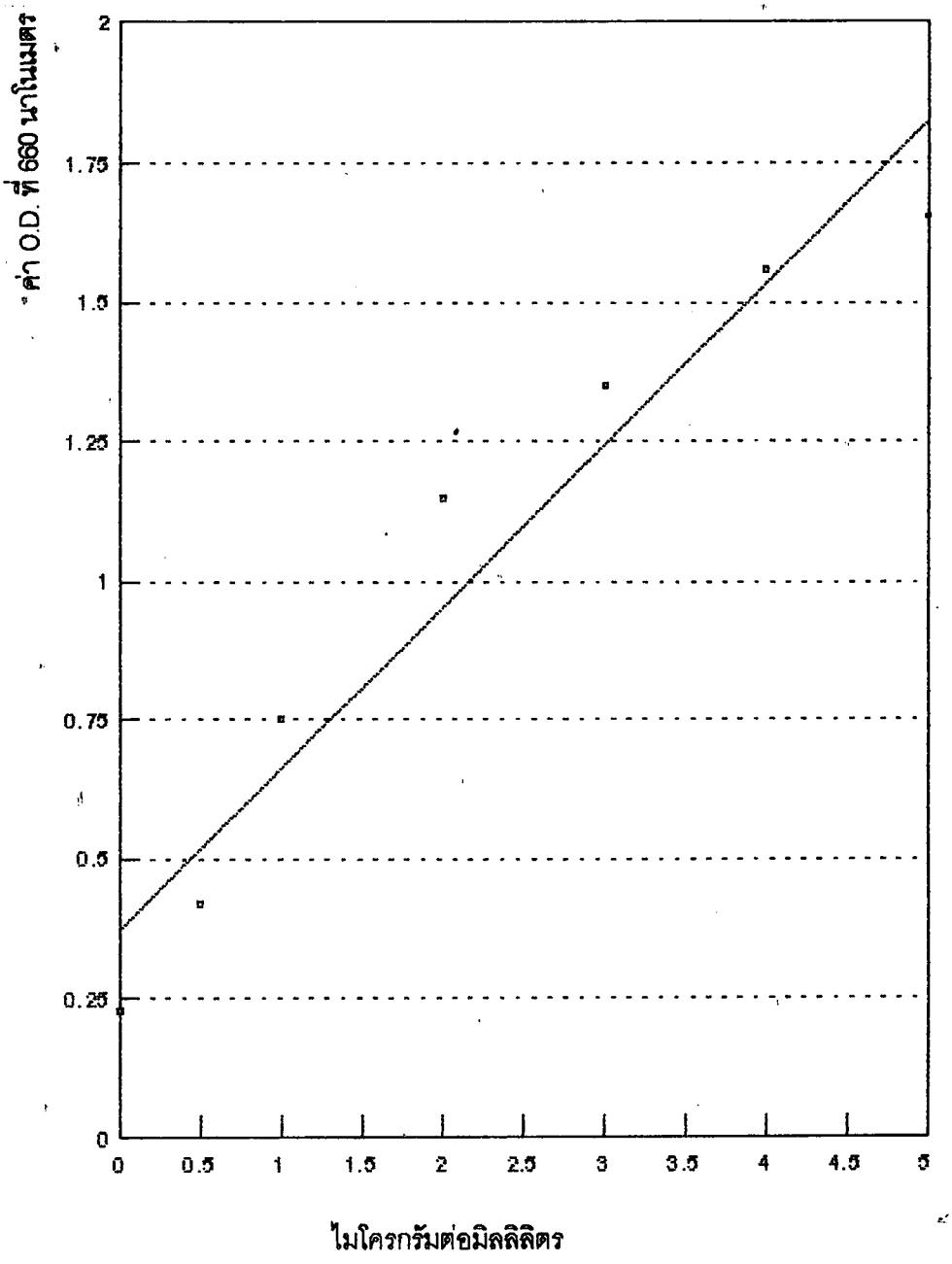
รูปที่ จ.10 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 24 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



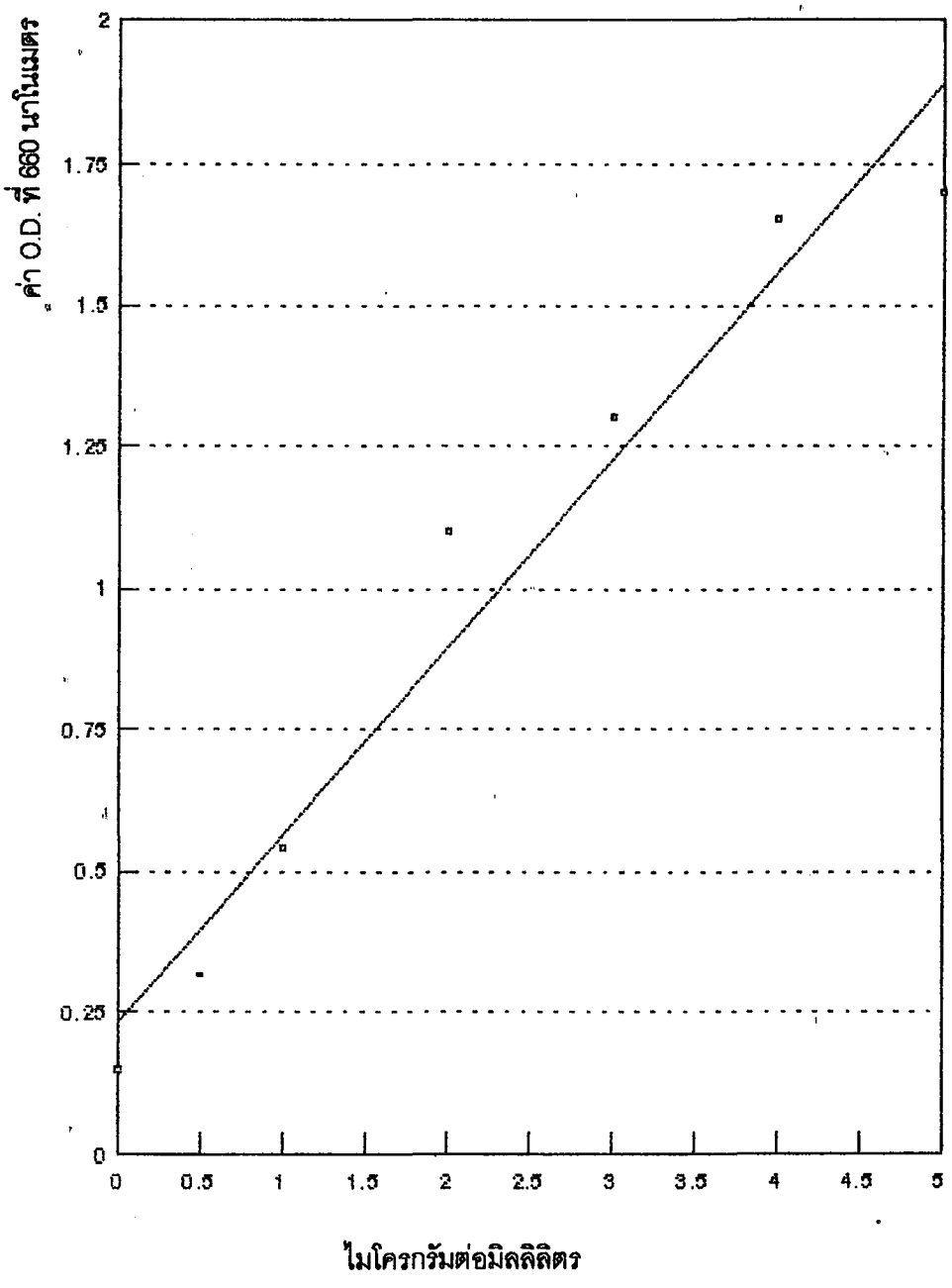
รูปที่ จ.11 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 48 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



รูปที่ จ.12 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 72 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และในถังหมัก



รูปที่ จ.13 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 96 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และในถังหมัก

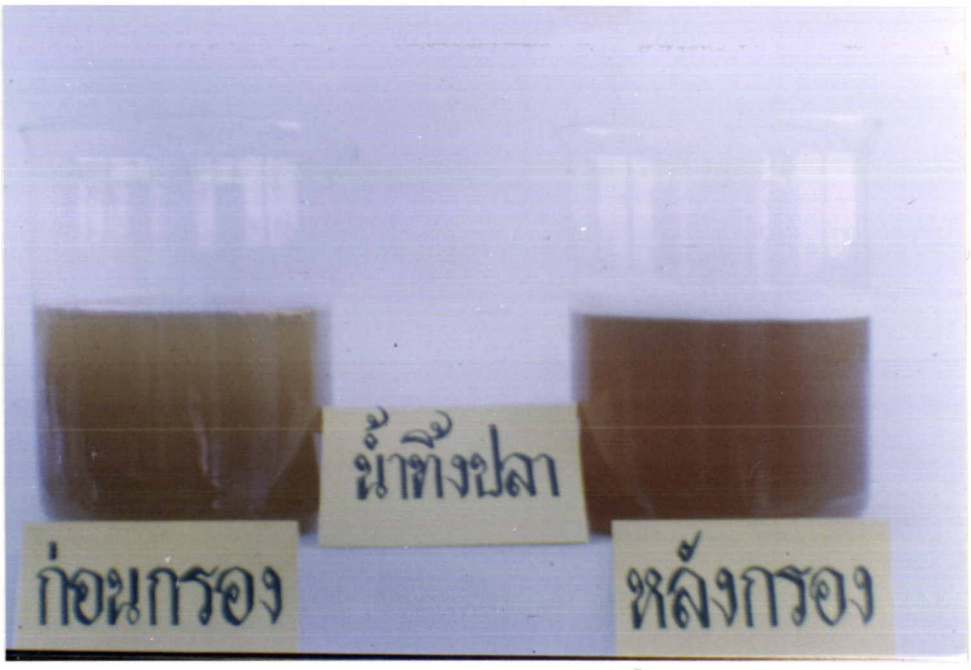


รูปที่ จ.14 แสดง calibration curve ของ working standard ชั่วโมงที่ 120 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี12 ใน น้ำทิ้งปลา สภาวะ stationary flask และในถังหมัก

ภาคผนวก ฉ.

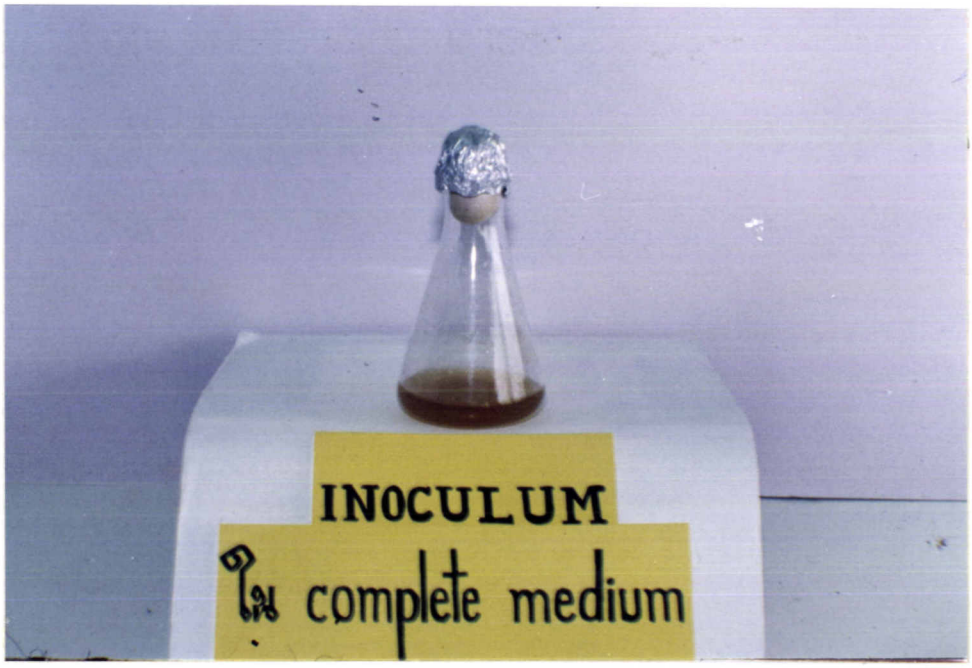
ภาพแสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ ฉ.1 แสดงการกรองน้ำทิ้งปลาจากกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง



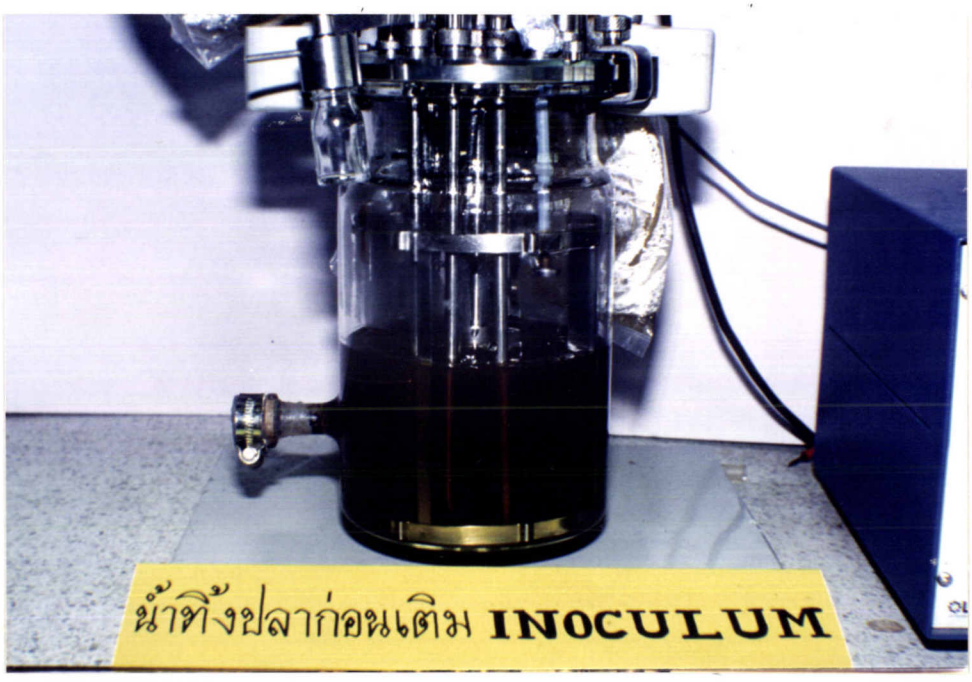
รูปที่ ฉ.2 แสดงน้ำทิ้งปลาก่อนกรองและน้ำทิ้งปลาหลังกรอง

รูปที่ ฉ.3 แสดงอาหาร complete medium ที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii

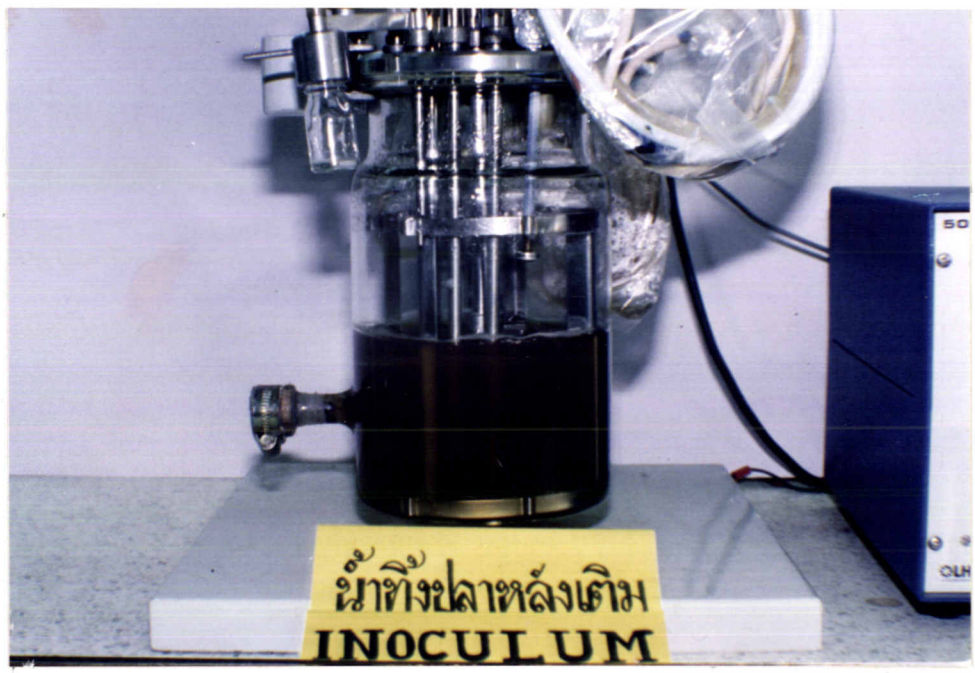


รูปที่ ฉ.4 แสดงกล้าเชื้อ ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium

รูปที่ ฉ.5 แสดงกล้าเชื้อ ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งปลา

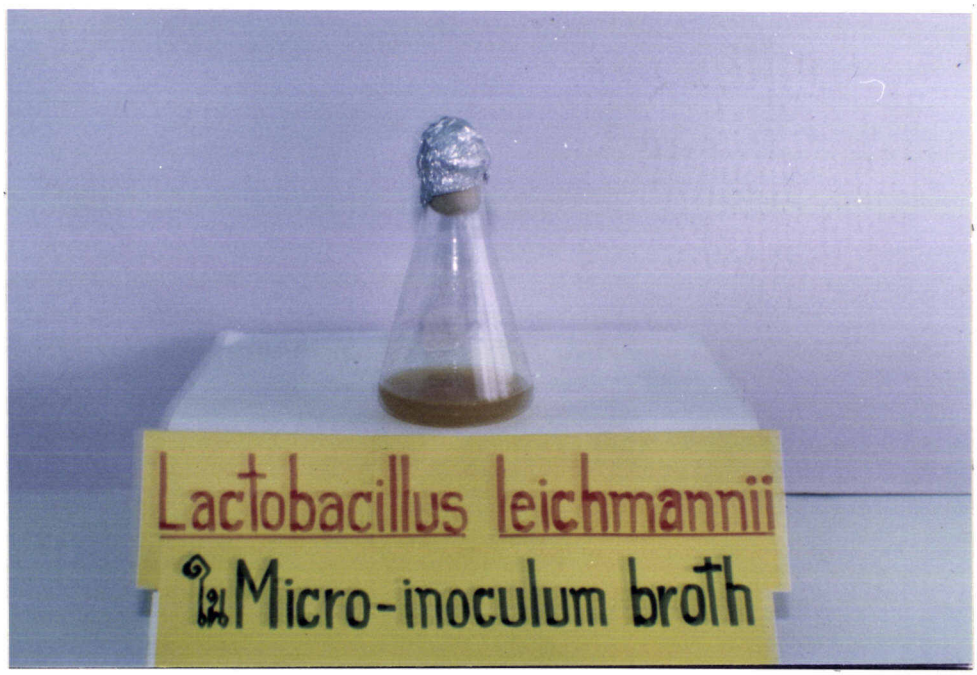


รูปที่ ฉ.6 แสดงน้ำทิ้งปลาใน Batch fermenter ก่อนเติมกล้าเชื้อ

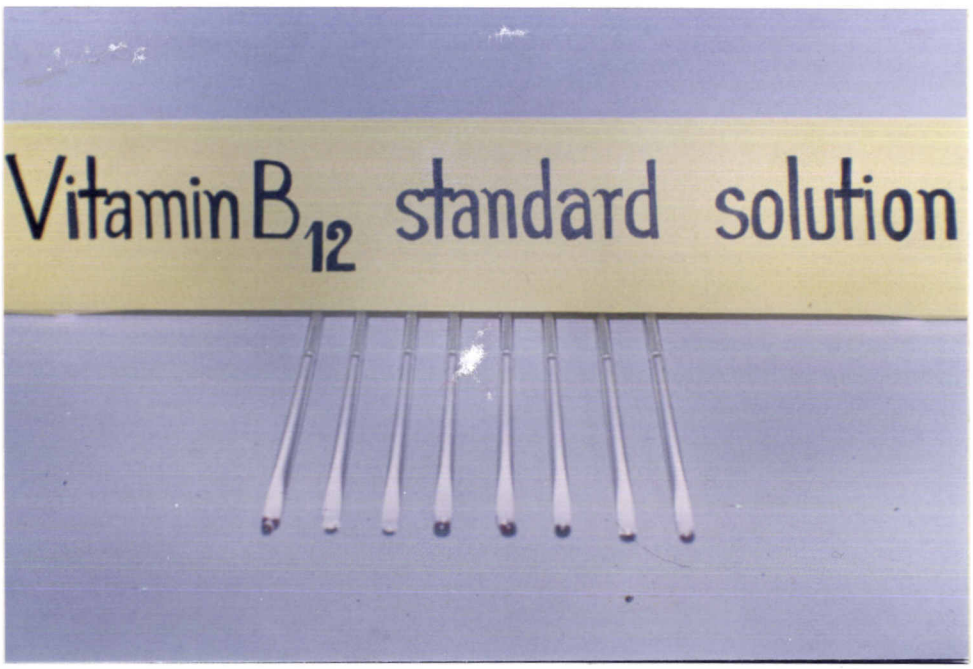


รูปที่ ฉ.7 แสดงน้ำทิ้งปลาใน Batch fermenter หลังเติมกล้าเชื้อ

รูปที่ ฉ.8 แสดง Stock culture ของเชื้อ Lactobacillus leichmannii ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



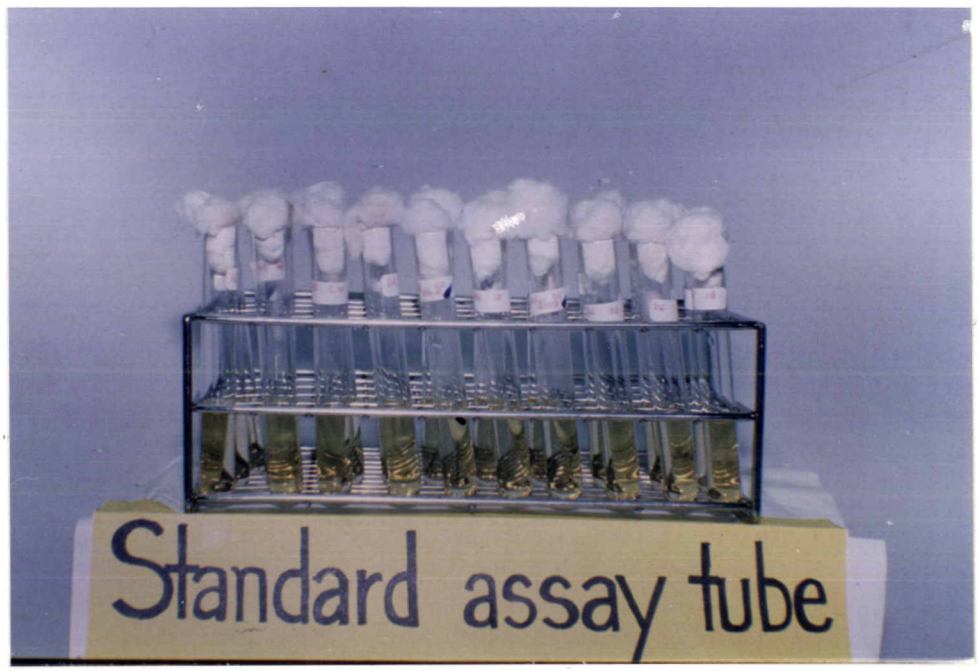
รูปที่ ฉ.9 แสดงการเจริญของ Lactobacillus leichmannii ใน micro inoculum broth



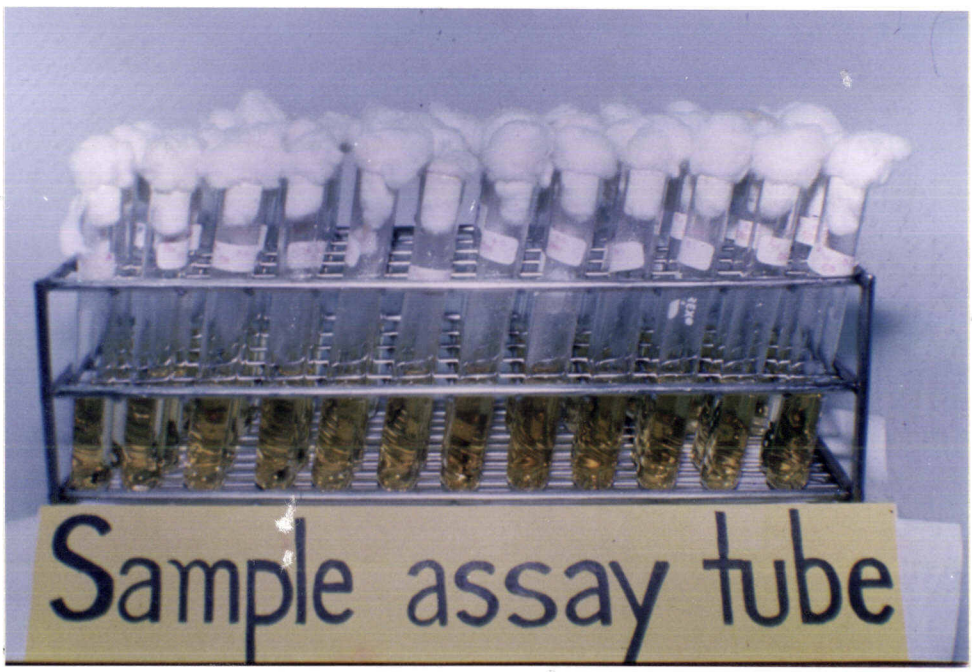
รูปที่ ฉ.10 แสดง vitamin B_{12} standard solution

รูปที่ ฉ.11 แสดง single strength assay medium

รูปที่ ฉ.12 แสดง double strength assay medium



รูปที่ ฉ.13 แสดงการเตรียม standard assay tube



รูปที่ ฉ.14 แสดงการเตรียม sample assay tube

รูปที่ ฉ.15 แสดงการบ่มเชื้อ Lactobacillus leichmannni ใน standard assay tube และ sample assay tube ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

1. ชลลวิชช์ ศิริขันธ์ วันวิสา ทวีแสง เสาวนีย์ จิรธารานนท์. " การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii. " โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2536.
2. พิณทิพย์ พูลโภคา. " การคัดเลือกสายพันธุ์ Pseudomonas spp. และการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12. " วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2523.
3. เพ็ญพันธ์ ชุณหฤทธิ์. " การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากถั่วเหลืองเลี้ยงเชื้อ Bacillus megaterium (ATCC 13639) เพื่อเป็นแหล่งอาหารโปรตีนและวิตามินบี 12. " วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2519.
4. พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์. " การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propioibacterium freudenreichii subsp. shermanii (ATCC 13673) โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ. " วิทยานิพนธ์. ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์. 2518.
5. บุษบา ยงสมิทธ์ ทอรายา เฟตซูโอะ และ ยามาเน ทซูเนโอะ. " การผลิตวิตามินบี 12 โดยแบคทีเรียที่ใช้เมธานอลเป็นวัตถุดิบ " รวบรวมเรื่องย่อสาขาพืช การประชุมทางการเกษตรและชีววิทยา ครั้งที่ 14 มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ 2518.
6. เสริมพล รัตสุข และ ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. การกำจัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งชุมชน. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย. 2518.
7. สุวิทย์ อารีกุล. " กรดโฟลิกและวิตามินบี 12 " ภาควิชารังสีไอโซโทปเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. 2522.
8. Association of vitamin ghemists, Inc. 1951. " Methods of vitamin assay. " Interscience, New York.

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

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

11. Baron, A.1962. "Use of thickening agent." U.S. Patent 3 , 067 , 109 , Dec. 4,1962. In : Noyes , R.,1969. Vitamin B_{12} manufacture, Noyes Development Corp, Newjersey.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

methods. Academic Press, Inc., New York and London.

57. Shorb, M.S. and G.M. Briggs. 1948. " The effect of disscociation in Lactabacillus lactis cultures on the requirement for vitamin B12 " J. Biol. Chem. 176 : 1463.

58. Speedie,J.D. and G.W. Hall.1960. "Vitamin B12 production by Propionibacterium shermanii." U.S. Patent. 2,951,917. July 15, 1963.

59. Sudaski, J.M. and R.A. Fisher. 1954. " Improvement in production of vitamin B12 produced by Propionibacterium freudenreichii " U.S. Patent 2,816,856 Dec 17, 1957.

60. Tanner, F.W. Jr. 1958. " process for the production of cobalamins." U.S. patent. 2,921,887. Jan 19, 1960.

61. Toraya, T.B. Youngsmith, S. Honda; Á. Tanaka and S. Fukai. 1976. " Production of vitamin B 12 from methanol-utilizing bacterium." J. Ferm. Tech. 54(2) : 102-108.

62. Vries, Wytske De ; W.C. Wilhelmina van Wijek-kapkeijn and A.H. stou themer. 1972. " Infreuence of oxygen on growth cytochrome synthesis and fermentation pattern in propionic acid bacterium." J. gen. microbial. Appl. Microbiol. 17 : 648-649.

63. Willium, R.T., 1955 The biochemistry of vitamun B12. Cambridge University Press

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

65. Zodrow, O.S. and W. Kaczmarck. 1967. " Effect of incubation temperature on the content of different corrinoids in the cell of P. shermanii." Acta Microbiol Polon., 16,233-226. Abstract in Microbiol. Abstracts 3.