สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (ATCC) จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

นายกิจจา ช. เจริญยิ่ง
นางสาวจิรัฐิ นรเศรษฐธีรกุล
นายธเนศ เอิบอิ่มฤทธิ์

ปวน.
ก637ก
2536

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

b12537557x

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2536

Production of Vitamin B_{12} by *Propionibacterium freudenreichii* (ATCC) from Livestock Chicken Waste Water

Mr.Kitcha Chor.Charoenying

Miss Jiratte Norasetteerakul

Mr.Thanate Oerbimrit

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1993

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

โดย นายกิจจา ช.เจริญยิ่ง

นางสาวจิรัฐิ นรเศรษฐธีรกุล

นายธเนศ เอิบอิ่มฤทธิ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.สุขใจ ชูจันทร์

ภาคชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(อาจารย์อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

(ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต) ประธานกรรมการ

(ผศ.สุขใจ ชูจันทร์) กรรมการ

(อาจารย์สมชาย ไกรรักษ์) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
ลักษณะ รูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii	4
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium freudenreichii	14
อาหาร	14
สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12	16
การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง	18
การตรวจหาหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์	27
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	31
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	45
ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) และน้ำหนักแห้งของเชื้อ (dry weight cell)	45
ผลการศึกษาอัตราการเจริญ(growth rate) และปริมาณเซลล์สูงสุด (maximum yeild) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ และน้ำทิ้งเติมสาร	45
ผลการเปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส	46
ผลการเปรียบเทียบปริมาณของ yeast extract	46

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ผลการเปรียบเทียบปริมาณของโคบอลท์	46
ผลการศึกษาอัตราการเจริญ, ปริมาณเซลล์สูงสุด และการผลิตวิตามิน บี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium และน้ำทิ้งเติมสารต่าง ๆ ณ สภาวะ stationary flask และ fermenter	46
ผลการวิเคราะห์ Biochemical Oxygen Demand (BOD)	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	78
ภาคผนวก	80
ภาคผนวก ก : อาหารเลี้ยงเชื้อ	80
ภาคผนวก ข : สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	82
ภาคผนวก ค : แผนภาพแสดงวิธีวิเคราะห์ผล	88
ภาคผนวก ง : วิธีการวิเคราะห์ผล	98
ภาคผนวก จ : รูปประกอบการทดลอง	135
เอกสารอ้างอิง	143

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria	8
2.2	แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria	9
2.3	แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria	9
2.4	แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี12 ของ propionic acid bacteria	10
2.5	แสดงขบวนการและวิธีการที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ในอุตสาหกรรม	26
4.1	แสดงคุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่	49
จ.1	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้ Inoculum size 2.0% หรือ 5.0% ใน complete medium สภาวะ Stationary flask	101
จ.2	แสดงผลระหว่างค่าความขุ่น(O.D.)และน้ำหนักแห้ง(dry weight cell) ของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium สภาวะ Stationary flask	102
จ.3	แสดงผลค่า pH ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่	102
จ.4	แสดงผลน้ำหนักของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ (กรัมต่อมิลลิลิตร)	103
จ.5	แสดงผลค่า Suspended solid ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่	103
จ.6	แสดงผลการวิเคราะห์ Total carbohydrate ของสารละลายมาตราฐานกลูโคส โดย Phenolic method	104
จ.7	แสดงผลการวิเคราะห์ Total carbohydrate ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ โดย Phenolic method	104

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
จ.8	แสดงผลปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรต เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ crude protein ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ โดยวิธี Semi-Micro Kjiedahl method	105
จ.9	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Glucose และ Yeast extract ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่เปรียบเทียบกับ Complete medium สภาวะ Stationary flask	106
จ.10	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Glucose ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Yeast extract 0.5% ในสภาวะ Stationary flask	107
จ.11	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Glucose 1.0% ในสภาวะ Stationary flask	108
จ.12	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในแต่ละสภาวะที่ทำการศึกษา ในสภาวะ Stationary flask	109
จ.13	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Glucose 1.5% และ Yeast extract 2.0% ในสภาวะ Stationary flask	110
จ.14	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Methionine และ Riboflavin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii และปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ สภาวะ Stationary flask	111
จ.15	แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของ Vitamin B_{12} working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษา เมื่อเติม Methionine และ Riboflavin ณ ชั่วโมงต่าง ๆ	112

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
จ.16	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหาร กับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 48	113
จ.17	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหาร กับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 72	114
จ.18	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหาร กับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 96	115
จ.19	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหาร กับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 120	116
จ.20	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน Complete medium กับน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation	117
จ.21	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของ Vitamin B_{12} working standard ของ Complete medium ณ ชั่วโมงต่าง ๆ	118
จ.22	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 48	119
จ.23	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 72	120

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
จ.24	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 96	121
จ.25	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 120	122
จ.26	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 144	123
จ.27	แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของ Vitamin B_{12} working standard ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ณ ชั่วโมงต่าง ๆ	124
จ.28	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 48	125
จ.29	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 72	126
จ.30	แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 96	127

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

จ.31 แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 120 128

จ.32 แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 144 129

จ.33 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารกับ Methionine และ Riboflavin 130

จ.34 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation 131

จ.35 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษามา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ fermentation 132

จ.36 แสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium และน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ที่ได้ทำการศึกษามาระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation 133

จ.37 แสดงผลค่า BOD น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ในสภาวะต่าง ๆ ที่ทำการศึกษา 134

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการ dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย propionic acid bacteria	5
2.2	แสดง ribofalvin เป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12	16
2.3	แสดงสมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12	20
2.4	แสดงการสังเคราะห์ corrin ring	21
2.5	แสดงโครงสร้างของวิตามินบี 12 และ related compound	30
4.1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร	50
4.2	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล์กับค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร	51
4.3	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ หรือ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ใน complete medium สภาวะ Stationary flask	52
4.4	แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ สภาวะ Stationary flask	53
4.5	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Glucose และ Yeast extract ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่เปรียบเทียบกับ Complete medium สภาวะ Stationary flask	54
4.6	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Glucose ในปริมาณต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Yeast extract 0.5% อุณหภูมิ 30 ^{o}C	55
4.7	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Glucose 1.0% ในสภาวะ Stationary flask	56

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.8	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในแต่ละสภาวะที่ทำการศึกษา ในสภาวะ Stationary flask	57
4.9	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Glucose 1.5% และ Yeast extract 2.0% ในสภาวะ Stationary flask	58
4.10	แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ methionine และ riboflavin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii และปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ สภาวะ Stationary flask	59
4.11	แสดงผลของ methionine และ riboflavin ที่มีต่อปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์ และโคบอลท์ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C	60
4.12	แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน Complete medium กับน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation	61
4.13	แสดงปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium และน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation อุณหภูมิ 30 ^{o}C	62
4.14	แสดง calibration curve of working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 48	63
4.15	แสดง calibration curve of working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 72	64

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.16 แสดง calibration curve of working standard ของ สภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 96 65

4.17 แสดง calibration curve of working standard ของ สภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 120 66

4.18 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 48 67

4.19 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 72 68

4.20 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 96 69

4.21 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 120 70

4.22 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 144 71

4.23 แสดง Calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 48 72

4.24 แสดง Calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 72 73

4.25 แสดง Calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 96 74

4.26 แสดง Calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 120 75

4.27 แสดง Calibration curve of working standard ของ น้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 144 76

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.28	เปรียบเทียบปริมาณ BOD ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ น้ำทิ้งเติมสารอาหารต่าง ๆ และน้ำทิ้งเติมสารอาหารต่าง ๆ หลังการหมัก	77
ฉ.1	แสดงการกรองน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่หลังต้ม	135
ฉ.2	เปรียบเทียบน้ำเลือดไก่ก่อนต้มและหลังต้ม	136
ฉ.3	แสดงการกลั่นน้ำกลั่น 2 ครั้ง สำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12	137
ฉ.4	แสดงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	138
ฉ.5	แสดงเชื้อ L. leichmannii ในอาหาร Microinoculum broth อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง	139
ฉ.6	แสดง Sample assay tube เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง	140
ฉ.7	แสดงการเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ศึกษา ในสภาวะ Fermentation	141
ฉ.8	แสดงผลึกวิตามินบี 12	142

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii (ATCC) จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่
โดย	นายกิจจา ช.เจริญยิ่ง
	นางสาวจิรัฐิ นรเศรษฐธีรกุล
	นายธเนศ เอิบอิ่มฤทธิ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2536

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลการเจริญของ Propionibacterium freudenreichii ในอาหาร Complete medium พบว่าสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 คือ ปริมาณอาหาร 50.0 มิลลิลิตร ที่สภาวะ Stationary flask, อุณหภูมิ 30.0 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0, ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.55 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร (O.D.660 เท่ากับ 0.5) สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ 39.78 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมกลูโคส 15.0 กรัม,ยีสต์สกัด(yeast extract) 20.0 กรัม, $CoSO_4.7H_2O$ 0.6 กรัม, เมไธโอนีน (methionine) 0.02 กรัม และไรโบฟลาวิน(riboflavin) 0.001 กรัม สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ 238.44 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่า 83.32 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับที่ผลิตได้จากอาหาร Complete medium ที่สภาวะเดียวกัน

เมื่อนำ Propionibacterium freudenreichii มาเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามที่ได้ทำการศึกษาเช่นเดียวกับข้างต้น ปริมาตร 1.0 ลิตร ซึ่งบรรจุในถังหมัก(Fermentor) ปริมาตร 2.0 ลิตร อุณหภูมิ 30.0 องศาเซลเซียส และกวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุดชั่วโมงที่ 96 ปริมาณ 245.73 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร Complete

medium ในสภาวะเดียวกันสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้เพียง 54.69 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งน้อยกว่า 77.74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่ผลิตได้จากน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารตามที่ศึกษาได้

การเลี้ยงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่สามารถลดปริมาณ BOD ในน้ำทิ้งจาก 29.4 กรัมต่อลิตรให้เหลือเพียง 9.764 กรัมต่อลิตร

Special Project Title	Production of Vitamin B_{12} by Propionicbacterium freudenreichii (ATCC) from Livstock chicken Waste Water
Name	Mr.Kitcha Chor.Charoenying
	Miss Jitatte Norasetteerakul
	Mr.Thanate Oerbimrit
Special Project Advissor	Asst.Prof. Sukjai Choojan
Department	Applied Biology
Acedemic Year	1993

Abstract

The growth of Propionibacterium freudenreichii in complete liquid medium was investigated. It was found that the optimal conditions for vitamin B_{12} production were containing 50.0 millilitres of complete medium in 250 millilitres in stationary of cultivation, at temperature 30.0 ^{o}C, initial pH 7.0 and inoculum 0.55 grams dry weight per litre(O.D. 660 = 0.5) yeildity vitamin B_{12} contain 39.78 micrograms per gram dry weight. Cell grown in 1.0 litre of a waste of toultry factory containing 15.0 grams glucose, 20.0 grams yeast extract, 0.6 grams $CoSO_4.7H_2O$, 0.02 grams methionine and 0.001 grams riboflavin produced the highest vitamin B_{12} contain yeilding 238.44 micrograms per gram dry weight, approximately higher than 83.32 percent of the growth in complete liquid medium art the same conditions.

Propionibacterium freudenreiichii was grown in fermentor 2.0 litres containing the waste of toultry factory which optimized formular 1.0 litre at 30.0 ^{o}C. The date was shown that at mixing rpm produced the highest vitamin B_{12} contain yeilding 245.73 micrograms per gram dry weight at 96 Hrs. In the otherhand cell grown in complete liquid medium produced vitamin B_{12} contain only 54.69 micrograms per gram dry weight at the same conditions, approximately lower than grown in the waste of toultry fatory.

The cultivation of Propionibacterium freudenreichii cause decrese of BOD content in the toultry factorial waste from 29.4 to 9.764 grams per litre.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่องนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ ถ้าไม่ได้รับความอนุเคราะห์ ความร่วมมือและความช่วยเหลือของบุคคล ดังต่อไปนี้

1. ผศ.สุชใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำและความรู้ซึ่งเป็นแนวทางสำหรับแก้ไขปัญหาต่างๆ ในโครงงานพิเศษ ตลอดจนอำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ดำเนินโครงงานพิเศษจนสำเร็จ

2. อาจารย์สมชาย ไกรรักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำและความรู้เกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการดำเนินโครงงานพิเศษ รวมทั้งแนวทางในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างดำเนินโครงงานพิเศษ

3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง และข้อมูลที่จำเป็นต่อการดำเนินการวิจัย

4. บริษัท ไก่สด ซี.พี. จำกัด ที่อนุเคราะห์น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตไก่สด

5. หน่วยงานบำบัดน้ำทิ้งนิคมฯลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านการวิเคราะห์น้ำทิ้ง

6. เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน

7. เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการดำเนินโครงการพิเศษ

จึงขอขอบคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2537

บทที่ 1
บทนำ

วิตามินบี 12 หรือ ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamin) เป็นวิตามินที่เป็นต้นกำเนิดของโคเอนไซม์บี 12 หรือ methyl cobalamin ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกรดโฟลิค (folic) ซึ่งส่วนใหญ่มักอยู่ในรูป methyl tetrahydrofolate ให้เป็นสารอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อร่างกาย นอกจากนี้โคเอนไซม์บี 12 ยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน methyl malonyl coA ให้เป็น succinyl coA และพบว่าถ้าร่างกายขาดหรือไม่สามารถดูดซึมวิตามินบี 12 ได้ จะเป็นโรคโลหิตจางชนิดรุนแรงถึงชีวิต ที่เรียกว่า Pernicious anemia ผู้ป่วยจะมีอาการผิดปกติทางระบบประสาท ร่วมกับความผิดปกติในการสังเคราะห์เม็ดเลือดแดง จากความสำคัญของวิตามินบี 12 ดังกล่าวข้างต้น วิตามินบี 12 จึงเป็นที่ต้องการสูงมากในทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และการปศุสัตว์

ในปัจจุบันการผลิตวิตามินบี 12 ในรูปที่ร่างกายสามารถนำมาใช้ได้ ได้มาจากการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์เท่านั้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ แบคทีเรีย โดยเฉพาะ Propionibacterium freudenreichii และเมื่อพิจารณาประกอบกับสภาพอุตสาหกรรมในประเทศไทย พบว่าโดยส่วนใหญ่เป็นอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้มีปริมาณสูงมาก ก่อให้เกิดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม แต่เมื่อพิจารณาในด้านความสมบูรณ์ของแหล่งอาหารจากน้ำทิ้งเหล่านี้ พบว่ามีความเหมาะสมในการนำมาเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับผลิตวิตามินบี 12 เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรม อาหาร และการปศุสัตว์ ทั้งยังเป็นการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้งเพื่อช่วยลดปัญหามลภาวะของสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เหตุจูงใจในการทำโครงงานพิเศษ

1. วิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ผลิตได้โดยจุลินทรีย์เท่านั้น และในปัจจุบันความต้องการวิตามินบี 12 ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร และปศุสัตว์สูงมาก

2. เพื่อเป็นการนำกากของเสียมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเป็นการลดปัญหามลภาวะ

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii

3. เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตวิตะมินบี 12 ในระดับถังหมัก (Fermentor)

วิธีการดำเนินการโดยย่อ

การดำเนินการโครงงานพิเศษ แบ่งออกเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่

ขั้นที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii

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

ขั้นที่ 4 การวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และจัดทำรายงาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและวิจัยที่เกี่ยวกับวิตามินบี 12 ต่อไป

2. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อขยายขนาดให้เป็นการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรม

3. เพื่อประโยชน์ในทางการแพทย์ เภสัชกรรม อุตสาหกรรมอาหารและการปศุสัตว์

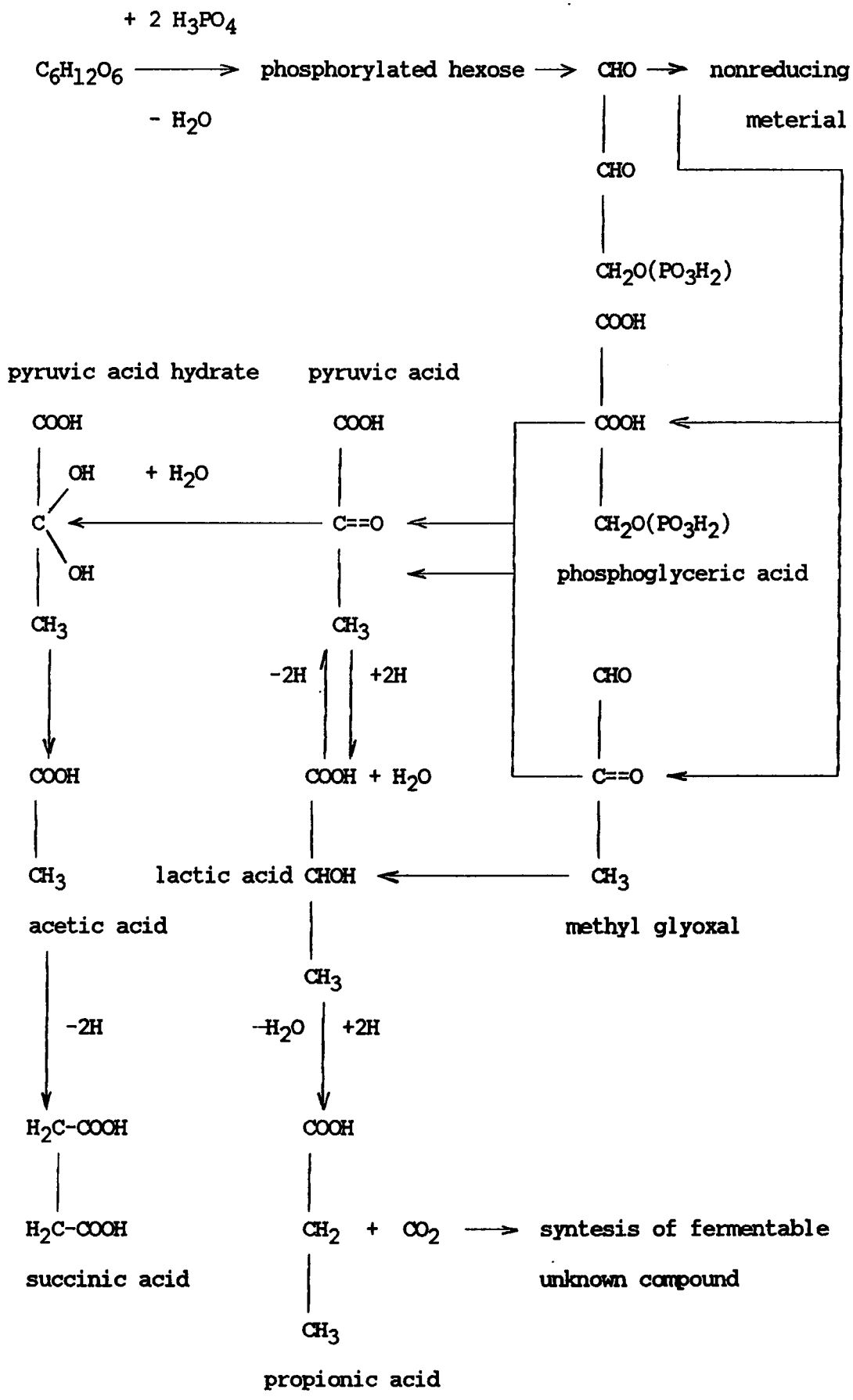
4. เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพ(Biotechnology) ให้สอดคล้องกับความต้องการของประเทศไทย

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. การศึกษาลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติ และประวัติการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium spp.

Prop. freudenreichii (21) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่แยกได้จาก dirary product, นมดิบ และ Swiss cheese เมื่อเชื้อเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ(anaerobic) จะมีรูปร่างกลม และขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน มักอยู่เป็นคู่หรือสายสั้น ๆ ส่วนในสภาวะที่มีการให้อากาศ(aerobic) รูปร่างอาจเป็น club-shaped และ branched หรือเป็นท่อนยาวที่ไม่เคลื่อนที่มี metacromatic granules ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างสปอร์ให้ผล catalase-positive เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จนถึง aero-tolerent สามารถหมักกรดแลคติก กรดไพรูวิก คาร์โบไฮเดรต และโพลีแอลกอฮอล์ได้ กรดโพรพิโอนิค และกรดอะซิติค คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในสภาพที่ไม่มีอากาศ หรือ microaerophillic fermentation ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการพ่นอากาศลงไปในถังหมัก การเลือกใช้ propionic acid bacteria ในกระบวนการหมักมีประโยชน์มากเพราะอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นกรด เนื่องจากมี propionic acid เกิดขึ้นทำให้สามารถป้องกันการ contamination ซึ่งมักจะเกิดกับการหมักธรรมดา การที่สามารถลด contamination และ infection ได้นั้นเพราะว่าระหว่างหมักในสภาพที่ไม่มีอากาศนั้น calcium propionate ทำหน้าที่เป็น bacteriostatic หรือ fungistic แต่ไม่เป็นพิษกับ Propionibacterium(58)

Wood et al. (83) ได้แสดงการ dissimilation ของน้ำตาลกลูโคสโดย propionic acid bacteria ตามแผนภาพดังนี้ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 แสดง dissimilation ของน้ำตาลกลูโคส โดย propionic acid bacteria

Hargrove และ leviton (36) ได้ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ propionic acid bacteria ที่สำคัญคือ Prop. freudenreichii และจาก Prop. shermanii เลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysate of casein	10	กรัม
L-Tryptophan	0.2	กรัม
L-Cystine	0.4	กรัม
Asparagin	0.2	กรัม
Xathine	0.02	กรัม
Adenine, guanine, uracil	0.02	กรัม
Riboflavin, thiamine	1.0	มิลลิกรัม
Niacin	2.0	มิลลิกรัม
Biotin	8.0	ไมโครกรัม
Pyridoxine, pyridoxal	4.0	มิลลิกรัม
Pyridoxamine	0.08	มิลลิกรัม
d-Calcium pantothenate	1.0	มิลลิกรัม
Para-aminobenzoic acid	2.0	มิลลิกรัม
Tween 80 solution	2.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
KH_2PO_4, K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4$	0.4	กรัม
NaCl, $FeSO_4$, $MnSO_4$	0.02	กรัม
N/5 phosphate	50	มิลลิลิตร
Buffer pH	6.8	

เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 โดยใช้ NaOH ปรากฏว่าให้วิตามินบี 12 จาก Prop. freudenreichii 6 ไมโครกรัมต่อลิตรและจาก Prop. shermanii 3 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณต่ำจากมาตรฐานที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีการทดลองค้นคว้าต่อไป เพื่อให้ได้วิตามินบี 12 มากขึ้น โดยการปรับความเข้มข้นของโคบอลท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน 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 ไมโครกรัมต่อลิตร

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

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

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

6. อิทธิพลของ nitrogenous compound ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ yeast extract และ beef extract เป็นแหล่งของวิตามิน และปัจจัยอื่น ๆ ที่จุลินทรีย์ต้องการ อาหารที่ใช้เตรียม ดังตารางที่ 2.4 เติม $CoCl_2.6H_2O$ 8 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ เชื้อเริ่มต้น ของเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 3 วัน 5 เปอร์เซนต์ ปรับ pH เท่ากับ 7 บ่ม 5 วัน ได้วิตามินบี 12 ดังตารางที่ 2.4 พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ proteinaceous material จะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น

ตารางที่ 2.1 แสดงอิทธิพลของโคบอลท์ และกรดแลคติกต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

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

ที่มา : (64 หน้า 105)

ตารางที่ 2.2 แสดงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน และปัจจัยอื่น ๆ ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

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

ที่มา : (64 หน้า 106)

ตารางที่ 2.3 แสดงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

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

ที่มา : (64 หน้า 106)

ตารางที่ 2.4 แสดงอิทธิพลของ nitrogenous compound ต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ propionic acid bacteria

ตัวอย่างที่	เปอร์เซนต์				วิตามินบี 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	0.4	-	1.0	2.0	590
5	0.4	-	1.0	3.0	600
6	-	0.3	1.0	1.0	390
7	-	0.6	1.0	1.0	440
8	-	1.0	1.0	1.0	460
9	-	-	1.0	1.0	80
10	0.5	-	1.0	1.0	440
11	1.0	-	1.0	1.0	450
12	1.5	-	1.0	1.0	460

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่เติมสารนั้น

ที่มา : (64 หน้า 107)

Sudasky และ Fischer (78) ได้ทำการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. freudenreichii โดยใช้ molasses เป็นแหล่งคาร์บอน และ waste brewer's yeast เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ครั้ง

1. ใช้ liquid waste brewer's yeast ใหม่ ๆ ในปริมาณ 6,000 แกลลอน ซึ่งมีส่วนที่เป็นของแข็ง 12.2 เปอร์เซนต์ แยกเอาออกโดยใช้ที่กรองขนาด 100 mesh ได้ยีสต์ 5,975 แกลลอน ให้ความร้อน 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 ปรับ pH เป็น 5.1 โดยเติม H_2SO_4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับ pH ให้เป็น 7.0 โดยการเติม aqua ammonia แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ Prop. freudenreichii อายุ 48 ชั่วโมง ปริมาตร 600 แกลลอนลงไป และหมักต่อไป 96 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการกวนอย่างช้า ๆ ปรับ pH ระหว่างการหมักให้อยู่ในช่วง 6.5 ถึง 7.0 ได้วิตามินบี 12 เป็น 17 มิลลิกรัมต่อแกลลอน

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

Hoffman et al. (41) ได้ทดลองใช้ Prop. shermanii (select PS-B_1) เลี้ยงในอาหารซึ่งประกอบด้วย molasses ที่มี dextrose 4 เปอร์เซนต์, corn steep liquor 8 เปอร์เซนต์ เติม dimethylbenzimidazole 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทดลองในถังหมัก ปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วย NH_4OH แล้วถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ หมัก 40 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้วิตามินบี 12 เป็น 25.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 143 กรัม หรือ 176.22 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

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

Becher et al. (17) ทดลองผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้ Prop. shermanii strain 33 หรือ ATCC 13673 ใช้อาหารที่ประกอบด้วย

glucose	10.0	กรัม
nitrogen in the form of a casien proteolyzate	1.5	กรัม
nitrogen in the form of a casien acid hydrolyzate	1.0	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม
K_3PO_4	1.6	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
$CoSO_4.7H_2O$	12.0	มิลลิกรัม
pantothenic acid	4.0	มิลลิกรัม
biotin	0.3	มิลลิกรัม
yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1.0	ลิตร

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

Rudyet al. (73) ได้ทดลองใช้เส้นใยของ Aspergillus niger ที่ได้จากการผลิต citric acid โดยเติมเส้นใย กับ molasses ลงไปในถังหมักเพื่อเลี้ยงเชื้อ Prop. shermanii พบว่า ได้วิตามินบี 12 เป็น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากหมักไป 96 ชั่วโมง ต่อมาเมื่อมีการเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต และเกลือโคบอลท์ พบว่าได้วิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นเป็น 2.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

Lim (46) ได้ทดลองเพื่อศึกษาว่า กรดอะมิโนตัวใดที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii (ATCC 6207) โดยใช้กรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ เช่น alanine, leucine, isoleucine, tyrosine, methionine, glutamic acid และอื่น ๆ ปรากฏว่า glycine ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 จึงทดลองเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในอาหารที่ประกอบด้วย

yeast extract	20.0	ส่วน
glucose monohydrate	25.0	ส่วน
$CoCl_2.6H_2O$	0.008	ส่วน
tap water	1,000.0	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 Weyhenmeyer (71) ศึกษาการสังเคราะห์ dimethylbenzimidazole (5,6-DMBIA) จากวิตามินบี 2 (riboflavin)โดยใช้เชื้อ Prop. shermanii strain 33 ใช้แบคทีเรียอายุ 3 วัน ซึ่งมีน้ำหนักเปียก 0.35 กรัม ละลายใน phosphate buffer 0.07 M pH 7.0 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติม 1-14-C-riboflavin ลงไปประมาณ 5 มิลลิกรัม นำไปเขย่า (shaking) ด้วยความเร็ว 100 รอบต่อวินาที 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. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี12 ของ Propionibacterium ssp.

1. อาหาร

แหล่งคาร์บอน มีหลายประเภทคือ ประเภทที่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น dextrose, maltose, xylose, invert sugar, corn syrup, lactose, sucrose, beet หรือ cane molasses, starch และ lactic acid, gluconic acid, citric acid และ glycerol โดยต้องใช้แหล่งคาร์-บอนในปริมาณ 5-10 เปอร์เซนต์ (15)

จากการศึกษาของ Osman (60) กล่าวว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเหมาะสำหรับการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii ส่วน Hargrove และ Leviton (36) ใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งอาจได้จากการเติมลงไปในอาหาร หรือได้จากขบวนการ fermentation ของน้ำตาลแลคโตสในนมโดยเชื้อ Lactobacillus casei ที่อยู่ร่วมกับ Propionibacterium spp. แบบ symbiosis Speedie และ Hall (76) ศึกษาขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Propionibacterium โดยใช้วิธีการแบบ batch process พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม คือ น้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลแลคโตส ซึ่งนิยมใช้ความเข้มข้น 8-10 เปอร์เซนต์

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

Osman (61) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ จากเกลือแอมโมเนีย พบว่าแอมโมเนียมซิเตรท แอมโมเนียมฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีเหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii

Kucheras (42) ศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะได้วิตามินบี 12 น้อยกว่าที่ใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน กรออะมิโนบางอย่าง เช่น glycine, methionine, serine, glutamic, arginine และ α-alanine ช่วยเร่งการผลิตวิตามินบี 12 แต่ cysteine จะยับยั้งขบวนการนี้ Bukin (22) ใช้ methionine ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 นอกจากนี้ยังพบว่า methionine ทำหน้าที่ methylation

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ โคบอลท์ ไซยาไนด์ และเหล็ก

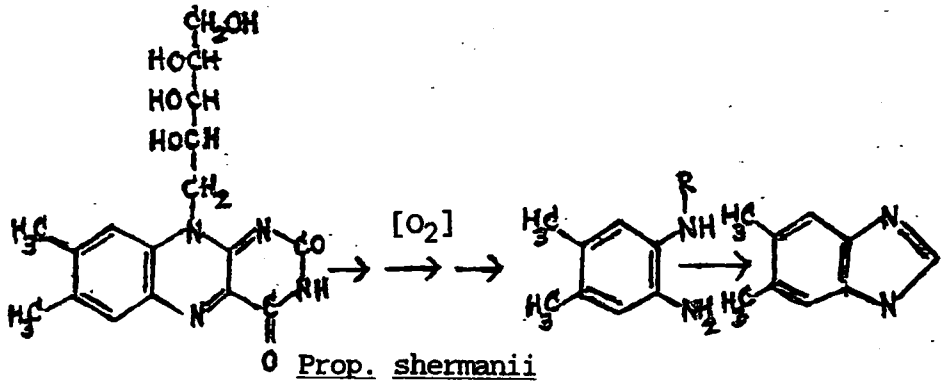
โคบอลท์ (Co) ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้ามีโคบอลท์ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม คือ สูงเกินไป จะเป็นพิษกับจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จะใช้โคบอลท์ในอาหารได้ในช่วงไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และมีผลไปถึงการสร้างวิตามินบี 12 อาจใช้โคบอลท์ในรูปของเกลือที่ละลายในน้ำได้ เช่น cobalt chloride, cobalt sulfate, cobalt nitrate หรือเกลือโคบอลท์อื่น ๆ (16)

ไซยาไนด์ ช่วยเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารจะต้องเติมลงในปริมาณที่พอเหมาะไม่เกิน 0.1-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ไซยาไนด์จะเติมในรูปของ ammonium cyanide, metal, alkali metal & alkaline earth, metal cyanides, ferrocyanides, ferricyanidases หรือในรูป sodium, potassium, barium, calcium, strontium และรูปอื่น ๆ หรือในรูปของเหลว และแก๊ซ เช่น hydrocyanic acid, hydrogen cyanide (16)

เหล็ก (Fe) มีความสำคัญต่อการเจริญ และผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii ส่วนแมกนีเซียมมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ทองแดง (Cu) และบิสมัท (Bi) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ธาตุอื่น ๆ นอกจากที่กล่าวมาแล้วไม่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ขณะที่ผงชักฟอกจะยับยั้งการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง

ขบวนการ metabolic ของจุลินทรีย์จะยับยั้งการเจริญ และการสร้างวิตามินบี 12 ของ Prop. shermanii (67)

วิตามินสำคัญที่ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 คือ วิตามินบี 2 จากการค้นคว้าของ Renz (70) พบว่าสามารถใช้วิตามินบี 2 แทน 5,6-dimethylbenzimidazole ซึ่งเป็น precursor ที่สำคัญของวิตามินบี 12 โดย Prop. shermanii สามารถเปลี่ยนวิตามินบี 2 เป็น 5,6-dimethylbenzimidazole ได้ ซึ่งมี pathway ดังนี้



riboflavin 5,6-dimethylbenzimidazole

รูปที่ 2.2 แสดง riboflavin เป็น precursor ที่สำคัญ

ต่อมา Renz (70) และ Weyhenmeyer (64) สามารถสังเคราะห์ 5,6-dimethylbenzimidazole ได้จากวิตามินบี 2 โดยเชื้อ Prop. shermanii strain 33

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12

สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหาร pH ที่เหมาะสมในการเจริญของ Propionic acid bacteria อยู่ระหว่าง 6.8-7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 (68) จะต้องรักษาระดับ pH ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4 ถึง 9 (ที่เหมาะสม 6 ถึง 7) เพราะ pH สูง หรือต่ำกว่านี้จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจาก cobalamin ไม่คงตัว หรือถูกทำลายได้ง่าย (69)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

อุณหภูมิ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในการหมักประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่แบคทีเรียพวกนี้เจริญได้ดี (68) จึงเหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12 ด้วย Zodrow (83) ทดลองใช้อุณหภูมิต่าง ๆ ในการหมักโดยใช้เชื้อ Prop. shermanii พบว่าได้วิตามินบี 12 มากที่สุดที่อุณหภูมิระหว่าง 18-21 องศาเซลเซียส

การให้อากาศ ศึกษาโดย Grant (31) ทดลองกับ Prop. freudenreichii ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารที่ช่วยส่งเสริมในการสร้างวิตามินบี 12 เมื่อถึงช่วงปลายของการหมักอาหารจะขาดคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดเจริญได้ จะต้องมีการ oxygenation หรือ areation เพื่อให้เกิดฟองอากาศในอาหาร วิธีนี้นิยมใช้ mechanical agitation และปรับ pH ของอาหารให้สูงขึ้นจะช่วยเพิ่มปริมาณของวิตามินบี 12 ได้ด้วย

การหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (82) ทำได้โดยการผ่าน non-oxidizing gas เช่น ไนโตรเจน หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ลงไปในอาหาร หรือ รักษาระดับแก๊ซเหนืออาหารให้สภาวะนี้ไม่ต้องกวน เพราะจะเป็นการนำออกซิเจนลงไปในอาหาร ต่อมาใช้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้นช่วยรักษาสภาพที่ไม่มีอากาศของอาหารในการหมักแบบธรรมดา ระยะเวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารสัมผัสกับอากาศ 70-80 ชั่วโมง ในระหว่างการหมักจะเพิ่มผลผลิตของวิตามินบี 12 มาก แม้ว่าจะให้ออกซิเจนเพียง 24-50 ชั่วโมงเท่านั้นก็ช่วยเพิ่มผลผลิต สภาวะที่ไม่มีอากาศนิยมทำในช่วงมากกว่าครึ่งหนึ่งของเวลาที่ใช้ในการหมักเล็กน้อย เมื่ออาหารสัมผัสกับออกซิเจนเป็นการทำให้อยู่ในสภาพ microaerophilic มากกว่าสภาวะที่มีอากาศ เพราะถ้าให้ออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ผลผลิตของ cobalamin น้อยลง

การหมักแบบครั้งคราว(Batch process) (76) ขบวนการผลิต cobalamin โดยเริ่มด้วยหมักอาหารเหลวด้วยเชื้อ Propionibacterium เป็นแบคทีเรียที่ผลิตวิตามินบี 12 ในสภาพที่ไม่มีอากาศ จากนั้นให้อาหารสัมผัสกับออกซิเจน และ recovery วิตามินบี 12 ได้จากอาหารที่ใช้ในการหมักแบบครั้งคราว อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะของการหมัก

เช่น องค์ประกอบของอาหาร อายุและขนาดของ เชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิ pH และ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

การหมักแบบต่อเนื่อง(Continuous process) (76) การหมักแบ่งเป็น 2 ตอน ระยะแรกหมักในสภาพไม่มีอากาศ เรียกว่าตอนที่ 1 ระหว่างนี้จะมีการเติมสารอาหารลงไปจะหมักต่อไปถึงตอนที่ 2 ระยะนี้อาหารสัมผัสกับอากาศและเติมอาหารลงไปอีก อัตราในการเติมอาหารลงไปในตอนที่ 1 และตอนที่ 2 จะต้องมีปริมาตร และความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งการผลิตวิตามินบี 12 จะเกิดขึ้นในการหมักตอนที่ 2

Baron (16) พบว่าเมื่อเติม thickening agent ลงไปในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ จุลินทรีย์เจริญได้ในอาหารนั้นโดยไม่ต้องมีการกวน และมีประโยชน์มากในแง่การเจริญ และ activity ของเซลล์ ในสภาพนี้ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นและได้ cobalamin เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ thickening agent ที่เติมลงไปทำให้แบคทีเรียมีความทนทาน หรือสามารถปรับตัวให้ทนต่อสารพิษที่มีความเข้มข้นสูงได้ดีกว่าสภาพธรรมดา เช่น การหมักในสภาพที่มี thickening agent จุลินทรีย์ทนต่อโคบอลท์ และไซยาไนด์ออกได้ดีกว่าในสภาพปกติ จึงช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 และสามารถใช้ thickening agent เพื่อให้ได้สภาพ microaerophilic และ การเพิ่มความหนืดทำให้อาหารกลายเป็น semi-solid ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ตกไปอยู่ที่ก้นภาชนะ thickening agent ที่ใช้ ได้แก่ วุ้นมีความเข้มข้นในช่วง 0.1-2.0 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก corn strach ความเข้มข้น 1.0-10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมี thickening agent อื่น ๆ ที่ใช้ได้ คือ methyl cellulose, carboxymethyl cellulose, carragenin, pectin, sodium alginate, gum tragacanth, polyvinyl pyrrolidone

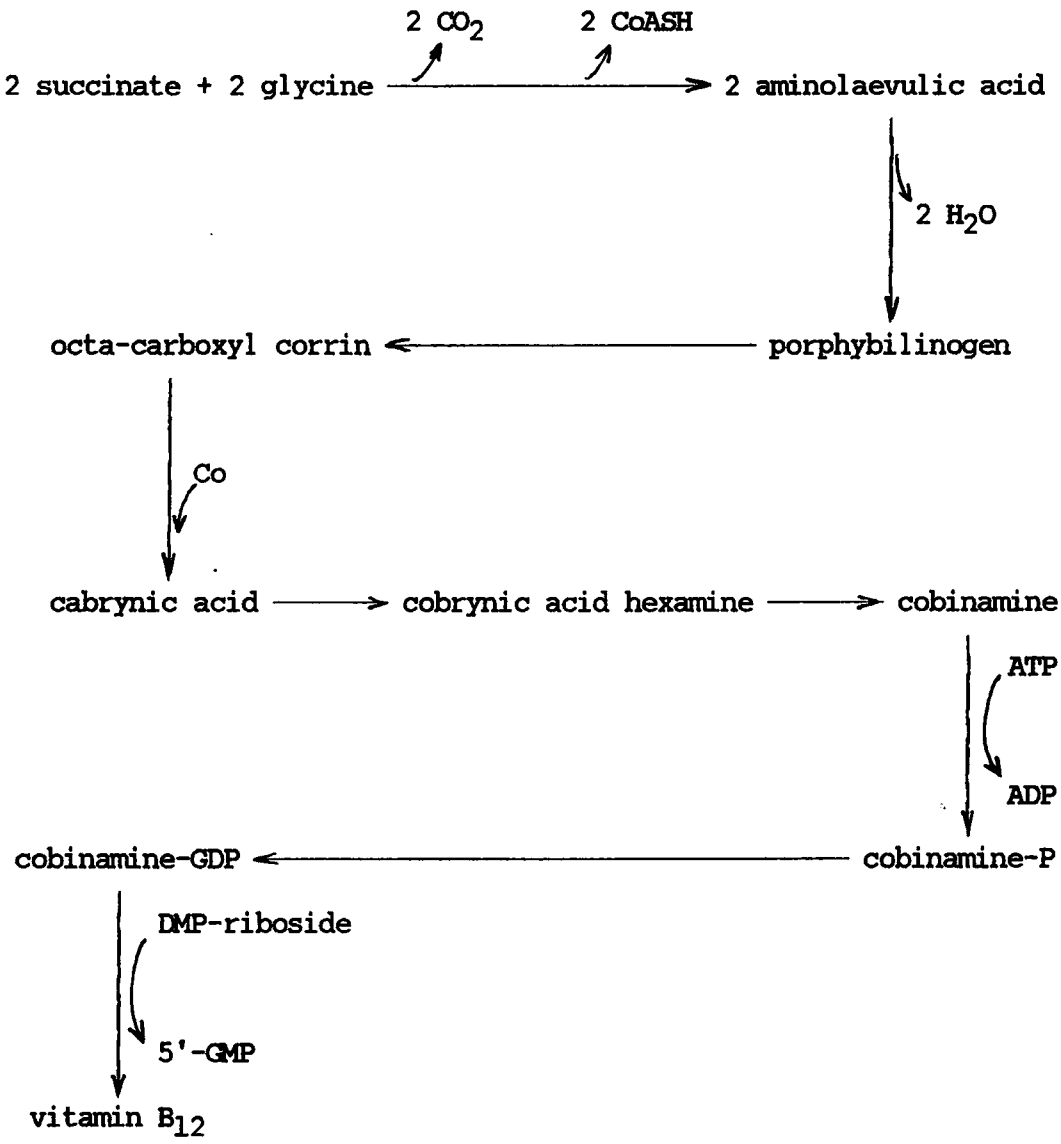
3. <u>การสังเคราะห์วิตามินบี 12 และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง</u>

ในปี 1926 Minot และ Murphy (52) รายงานว่าตับมีสารที่สามารถรักษาโรค perniciousanemia ได้ และสารนี้ถูกสกัดครั้งแรกออกจากตับในปี 1948 โดย Rickes <u>et al</u>. (71) และ Smith (74) สารนี้มีชื่อว่า วิตามินบี 12 ละลายน้ำได้ มีโมเลกุลใหญ่

น้ำหนัก 1350 เป็นผลึกรูปเข็มหรือปริซึมสีแดงเข้ม สูตรเคมีคือ $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ (73) มีโครงสร้างสลับซับซ้อนยากแก่การศึกษา แต่ Hodgkin etal. (39) ก็ได้พยายามศึกษาต่อมา และในที่สุดก็เสนอสูตรโครงสร้างวิตามินบี 12 ได้สำเร็จโดยใช้วิธี x-ray diffraction technique 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)(20,64,69,80) การเรียกชื่อสารนี้ขึ้นกับสูตรโครงสร้าง คำว่า cobalamin หมายถึงโมเลกุลของวิตามินบี 12 แต่ถ้าแกนของ planar group เป็นสารอื่น ก็มีวิธีการเรียกชื่อแตกต่างกันออกไป แสดงไว้ในรูปที่ 2.3

สมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12 เสนอโดย Boretti et al. (19)



ADP = adenosine diphosphate ATP = adenosine triphosphate

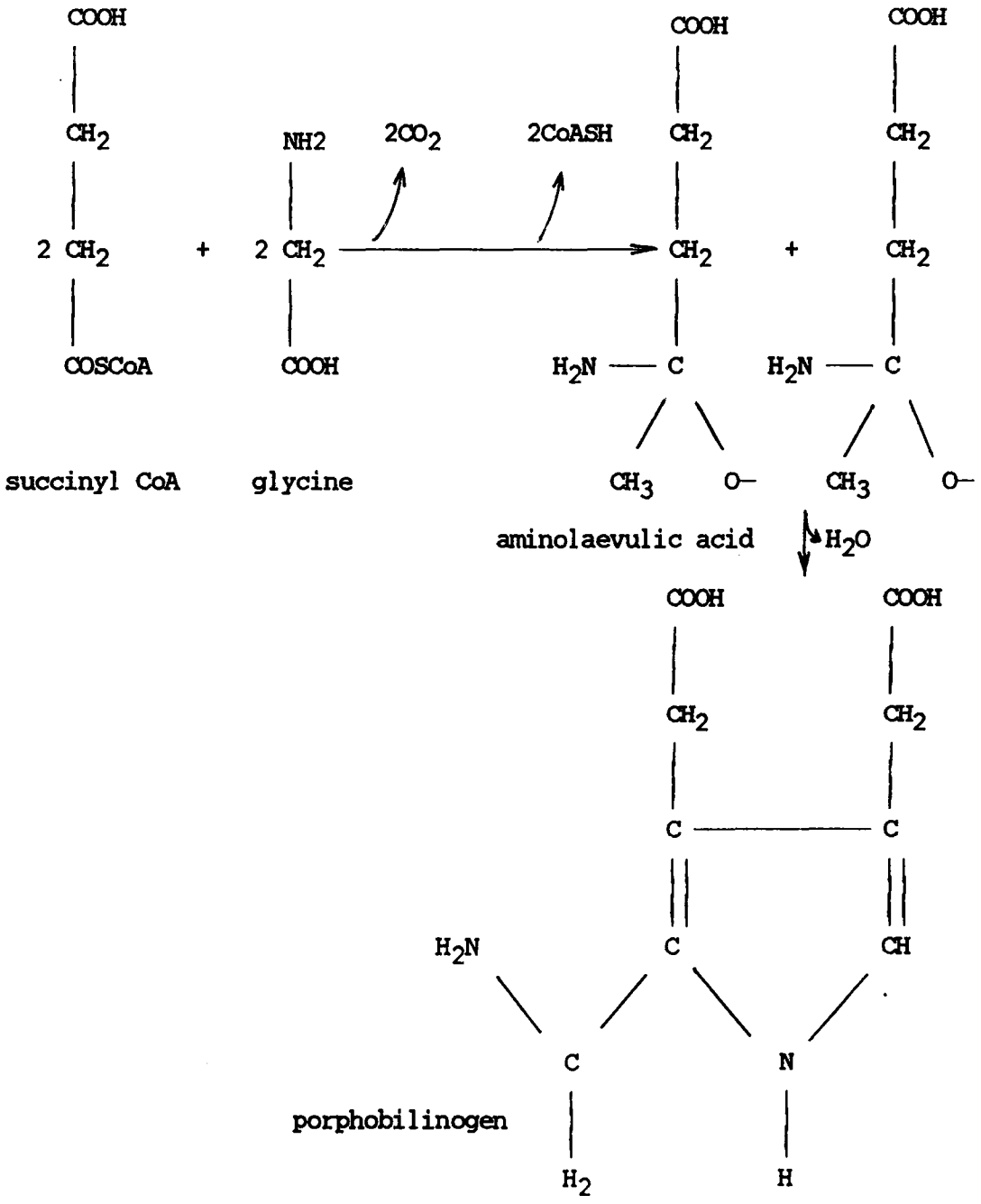
GMP = guanosine monophosphate GTP = guanosine diphosphate

DMP-riboside = dimethylbenzimidazole-riboside

รูปที่ 2.3 แสดงสมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12

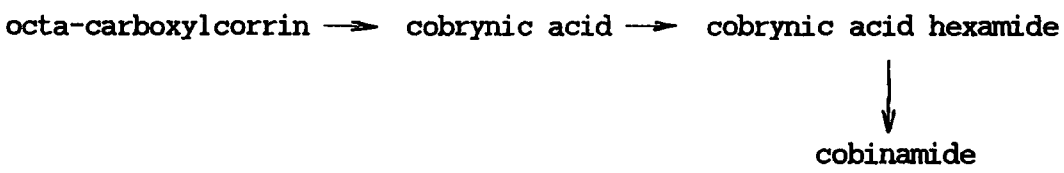
จากสมมติฐานของ biosynthesis pathway ของวิตามินบี 12 รูปที่ 2.3 สามารถแบ่งเป็น 4 ขั้น (69,81)

1. Formation of the corrin ring : Neuberger et al. (55) แสดงให้เห็นว่า pyrrole ring เกิดจาก prophobilinogen และ prophobilinogen เปลี่ยนมาจาก succinate และ glycine ดังนี้



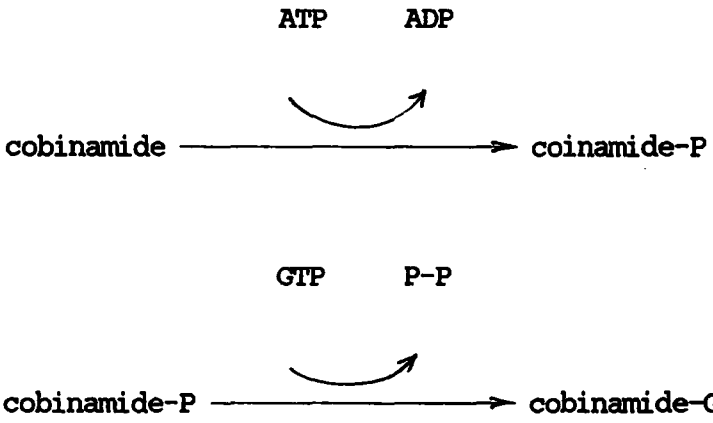
รูปที่ 2.4 แสดงการสังเคราะห์ corrin ring

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

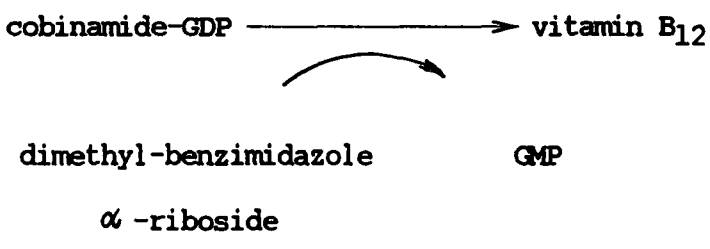


2. Incorporation of nucleotide residue

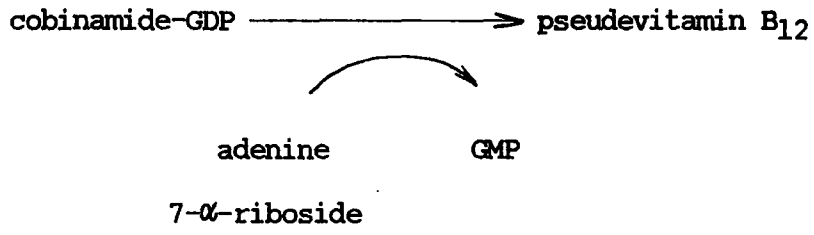
Boretti et al. (19) กล่าวว่า cobinamide จะถูก activate ให้อยู่ในรูป cobinamide-GTP ซึ่งเป็น intermidiate ที่สำคัญใน biosynthesis ของวิตามินบี 12 ดังนี้



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



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



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

จุลินทรีย์สร้างวิตามินบี 12 ขึ้นภายในเซลล์และไม่ปล่อยออกมานอกเซลล์ Perlman (64) รายงานว่าวิตามินบี 12 ที่พบในจุลินทรีย์อยู่ในรูปของ coenzyme ถึง 80 เปอร์เซนต์ และส่วนที่บริสุทธิ์ที่สุดที่เตรียมได้จากจุลินทรีย์มี cobinamide peptide อยู่ 23 เปอร์เซนต์ การสังเคราะห์ coenzyme B_{12} เกิดขึ้น เมื่อมีการเติม adenine nucleoside ให้กับวิตามินบี 12 แล้ว จึงจะได้ coenzyme B_{12} ได้มีผู้สกัด coenzyme B_{12} จาก Prop. shermanii และจาก Clostridium tetanomorphum ได้ cofactor ที่ใช้ในการสร้างคือ glutathione, $NADH_2$, flavin, $MnCl_2$ และ ATP ใช้วิธี label C^{14} ของ ATP แสดงให้เห็นว่า ATP ให้ทั้ง adenine และ sugar residue ในการสร้าง coenzyme B_{12} นั่นคือ adenosine ถูก incorporate เข้าไปโดยไม่มีการบุบสลาย และในสภาพปกติ adenine nucleoside จะไปติดกับ ring ของวิตามินบี 12 ก่อนที่จะสร้างเป็นโมเลกุลที่สมบูรณ์ (69)

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

แบคทีเรีย ได้แก่

Aerobacter aerogenes (68)
Agrobaccterium radiobacter (40)
Alcaligenes faecalis (41)
Azotobacter sp.(64)
Bacillus megterium (26,29,45,64,68)
B. subtilis (71)
B. stearothermophillus (15)
Butyribacterium rettgeri (64)
Clostridium butyricum (82)
Cl. cochlearium (82)
Cl. flabelliferum (82)
Cl. tetanomorphum (82)
Escherichia coli (35)
Flavobacterium acetylicum (26)
F. acidificum (26)
F. aquatile (26)
F. arborescens (26)
F. devorans (34)
F. esteroaromaticum (26)
F. flavescens (26)
F. solare (67)
F. suaveolens (26)
Lactobacillus arabinosus (72)
L. casei (75)
Prop. freudenreichii (44)
Prop. shermanii (36)
Prop. zeae (26)
Proteus vulgaris (38)
Pseudomonas aeroginosa (71)
Ps. fluorescens (71)
Ps. midenbergii (71)
Ps. mucidolens (71)
Ps. lumichroma (71)
Ps. chloraraphis (71)
Ps. denitrificans (71)
Rhizobium trifolii (43)
Rh. meliloti (43)
Serratia marcescens (78)
Staphylococcus aureus (73)
Streptococcus faecalis (75)

แอคทิโนมัยซีส ได้แก่

Micromonospora รวมทั้ง 69 species ที่ไม่สามารถ classified และ identified species (82)

Micromonospora purpuria (81)
M. echinospora (81)
M. halophytica (81)
M. fusca (81)
M. chalcea (81)
M. carbonacea (81)
Mycobacterium phlei (26)
My. smegmatis (70)
My. tubercurosum (66)
Norcardia rugosa (48)
Sreptomyces albidoflavus (26)
St. antibioticus (26)
St. aureofaciens (63)
St. aureus (26)
St. colombiensis (26)
St. farinosus (26)
St. fradiae (26)
St. griseus (41)
St. olivaceus (32,33,34)
St. roseochromogenes (26)
St. vinaceus (18)
Streptomyces sp.(26)

ยีสต์ ได้แก่

Torula sp. (83)

รา ได้แก่

Penicillium lilacinum (78)

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) ได้แก่

Anabaena cylindrica (26)
Claothrix parietina (26)
Plectonema nostocorum (26)

สาหร่ายทะเล (marine algae) ได้แก่

Ceranium rubrum (26)
Champia parvula (26)

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

ตารางที่ 2.5 ขบวนการและอาหารที่ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ในอุตสาหกรรม

จุลินทรีย์	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณวิตามินบี 12 (mg/liter)	สภาวะ
Bacillus megaterium	Beet or can molasses; ammonium phosphate; cobalt salt; inorganic salts	0.45	18 hour aerated fermentation
Propionibacterium freudenreichii	Cornsteep liquor; glucose; cobalt salt; maintained at pH 7 with NH_4OH	19	6-day batch fermentation (3 day anaerobic +3 day 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)

จุลินทรีย์	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณวิตามินบี 12 (mg/liter)	สภาวะ
Streptomyces olivaceus	Glucose; soybean meal; distiller' solubles; cobalt salt; inorganic salts	3.3	6-day batch (aerated)
Streptomyces species	Soybean meal; glucose; cobalt salt; K_2HPO_4	5.7	6-day batch (aerated)

ที่มา : (73 หน้า 141)

4. การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 โดยใช้จุลินทรีย์ (Microbiological assay)

จุลินทรีย์ที่ใช้ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 (73) มี 4 ชนิด คือ Lactobacillus, Escherichia coli (mutant type), Euglena gracilis และ Orchromonas malhamensis

1. Lactobacillus species แรกที่ใช้ในการตรวจหาวิตามินบี 12 คือ L.lactis Dorner (LLD) เพราะพบว่าต้องการสารที่แยกได้จากตับ จากการศึกษาต่อมาได้ใช้ L. leichmannii (ATCC 4797) หรือ L. leichmannii (ATCC 7830) แทน เพราะพบข้อผิดพลาดจากการใช้ L. lactis Dorner 8000 ในการตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ความยุ่งยากในการใช้ Lactobacillus ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 พบในกรณีที่มีสารปฏิชีวนะอยู่ด้วย และจุลินทรีย์พวกนี้ยังตอบสนองต่อ deoxyriboside และ sensitive ต่อ sodium chloride ใน assay medium นอกจากนี้ยังสามารถใช้

สารที่คล้ายคลึงกับวิตามินบี 12 เช่น Factor A, 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 24 ชั่วโมง วิธีการ assay ที่เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป คือวิธีของ Association of vitamin chemists (12) และ U.S. Pharmacopeia (25)

2. Escherichia coli (mutant)

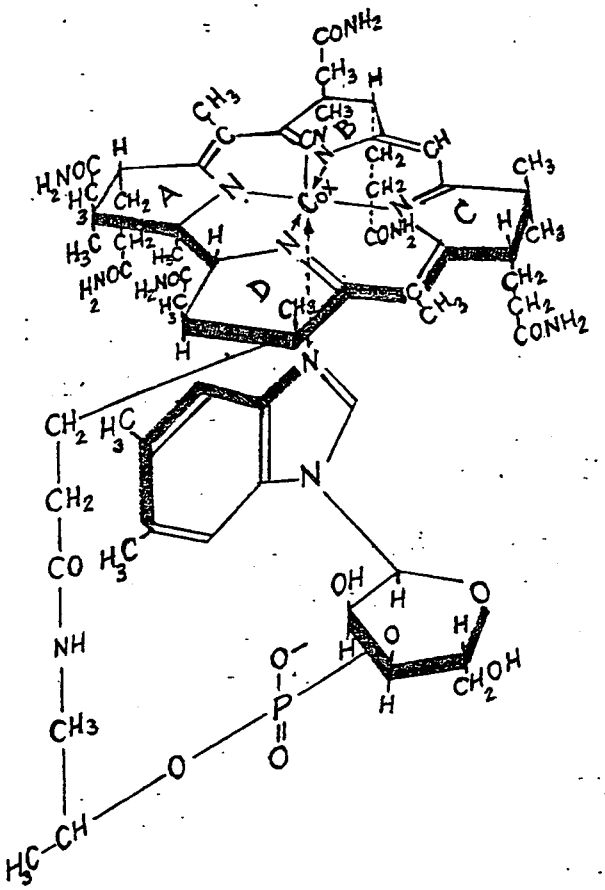
ในสภาพธรรมดาจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่ต้องการวิตามินบี 12 แต่ E. coli ที่ใช้ตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 แยกได้โดย Davis และ Mingioli (27) เป็นพวก ultraviolet-induced stable mutant, No.113-3 ต้องการ methionine และวิตามินบี 12 ในการเจริญแต่ไม่ตอบสนองต่อ deoxyriboside อาจใช้ assay ด้วยวิธี tube assay โดยวัดความขุ่นแต่มีข้อบกพร่องที่ความสามารถในการใช้ประโยชน์มีขอบเขตจำกัด คือ ใช้ได้ดีกับ 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 ได้โดยตรง ดังนั้นจึงไม่ต้องใช้ cyanide ช่วย stabilize และยังตอบสนองต่อวิตามินบี 12 ทุกแบบ การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ใช้วิธี turbidimetric หรือไตเตรทด่าง(alkali) ใช้เวลา 8 วัน เมื่อมีการปรับปรุงอาหารและสภาวะการเจริญจึงสามารถลดเวลาลงเหลือ 5-6 วัน

4. Orchromonas malhamensis

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



Trivial names and abbreviations are given in parentheses.

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

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

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

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

รูปที่ 2.5 Structure of vitamin B_{12} and related compounds

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

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

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

อาหารที่ใช้

น้ำทิ้งจากการผลิตไก่สดได้รับจาก บริษัท ไก่สด ซี.พี. จำกัด มีนบุรี กรุงเทพมหานคร

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. เครื่องแก้วต่าง ๆ

สารเคมี

1. Glucose
2. Yeast extract
3. $CoSO_4.7H_2O$
4. H_2SO_4
5. NaOH
6. Methioinine
7. Riboflavin
8. Cyanocobalamin
9. Viamin B_{12} assay medium
10. $Na_2SO_3.5H_2O$
11. Boric acid

วิธีการทดลอง

1. <u>การเตรียมอาหารที่ใช้ผลิตวิตามินบี 12</u>

1.1 การเตรียม complete medium

ศึกษาการเตรียม และรายละเอียดในภาคผนวก ก

1.2 การเตรียมน้ำทิ้งไก่เพื่อการทดลอง

1.2.1 นำน้ำทิ้งที่ได้จากโรงงานมาทำการต้มให้เดือด เพื่อตกตะกอนเลือดที่ปนมากับน้ำทิ้ง จากนั้นนำน้ำทิ้งที่ต้มแล้วมาทำการกรองด้วยเครื่องกรองสูญญากาศของ Tokyo Rikakikia Co., LTD. Type 4-35 โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

1.2.2 แบ่งน้ำทิ้งเก็บใส่ขวดสีชาแช่แข็งไว้เพื่อสะดวกแก่การไปใช้

1.2.3 เมื่อจะนำมาใช้ให้ละลาย โดยแช่ในอ่างที่มีน้ำหล่ออยู่

1.2.4 นำมากรองอีกครั้งเพื่อแยกเอาตะกอนที่แขวนลอยออก ด้วยเครื่องกรองแบบสูญญากาศของ Tokyo Rikakikia Co., LTD. Type 4-35 โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1

1.2.5 ปรับ pH ตามที่ต้องการด้วย NH_4OH 15 เปอร์เซนต์ หรือ HCl 15 เปอร์เซนต์

1.2.6 นำมานึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

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

2.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

2.1.1 ถ่ายเชื้อ <u>Prop. freudenreichii</u> จาก agar stab ลงใน complete medium ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2.1.2 บ่มฟลาสก์ในข้อ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน

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

2.1.4 ทำ suspension ของเชื้อให้เจือจางลงจนได้ O.D. เท่ากับ 0.5 ใช้ suspension นี้เป็นเชื้อเริ่มต้น ในการทดลองแต่ละครั้ง

2.2 การวัด O.D. ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน

2.2.1 เตรียมอาหารที่จะศึกษาบรรจุลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร

2.2.2 inoculate ด้วยเชื้อเริ่มต้น จากข้อ 2.1.4 ทำ 2 ซ้ำ(duplicate) ทุกการทดลอง

2.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2.4 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 144, 168 ชั่วโมง นำแต่ละฟลาสก์มาวัด O.D.โดยใช้อาหารชนิดเดียวกันกับที่ทำการศึกษาเป็น blank (ถ้าค่า O.D. มากเกินกว่าที่เครื่อง Spectrophotometer จะวัดได้ ต้องทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น และต้องทำการเจือจาง blank ในอัตราส่วนเดียวกัน)

2.2.5 จดค่า O.D. สองซ้ำในระยะเวลาที่กำหนดหาค่าเฉลี่ย

2.3 การเขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโต

เขียนกราฟระหว่างค่า O.D. เฉลี่ยกับระยะเวลาโดยให้แกนตั้งของกราฟเป็นค่า O.D. และแกนนอน เป็นช่วงเวลา

2.4 การหาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด

หาอัตราการเจริญ และปริมาณสูงสุด โดยอ่านผลจากกราฟแสดงการเจริญเติบโต (2.3) โดยที่อัตราการเจริญ อ่านค่าได้จากความชัน (slope) ของกราฟแสดงการเจริญเติบโต ปริมาณเซลล์สูงสุด อ่านค่าได้จาก O.D. ที่มีค่าสูงสุด

3. การเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักแห้ง(dry weight cell)

3.1 Inoculate เชื้อ Prop. freudenreichii (O.D.เท่ากับ 0.5) ลงใน complete medium บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งได้ปริมาณเซลล์สูงสุดประมาณ 4 วัน

3.2 เมื่อครบวันที่ 4 นำมาวัดค่า O.D. แบ่งใส่หลอด centrifuge จำนวน 2 หลอด ๆ ละ 10 มิลลิลิตร นำส่วนที่เหลือมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1, 1:3, 1:5 จากนั้นนำไปวัดค่า O.D. แบ่งใส่หลอด centrifuge ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนละ 2 หลอด) จากนั้นนำหลอด centrifuge ทั้ง 4 หลอด ไปเหวี่ยงปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที (ที่ทำอย่างละ 2 หลอด เพราะต้องทำ 2 ซ้ำ)

3.3 รินน้ำออกให้เหลือแต่ตะกอน เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วย cyclo mixer จากนั้นนำไปปั่นใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์จุลินทรีย์

3.4 เมื่อได้ตะกอนเซลล์ครั้งสุดท้าย เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปทำการเขย่า ทำเป็น suspension

3.5 เทใส่ในกระทงอลูมิเนียมที่ทำการอบจนน้ำหนักคงที่แล้ว ทั้งหมด 8 กระทง

3.6 นำเข้าตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบอีก ทำซ้ำ 3 ครั้ง จนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งไม่เปลี่ยนแปลง

3.7 นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาเขียนเป็นกราฟมาตรฐาน ระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักแห้ง โดยให้ O.D. เป็นแกนตั้ง และน้ำหนักแห้งเป็นแกนนอน สามารถใช้เปรียบเทียบหาน้ำหนักแห้งของเชื้อนี้ ในอาหารอื่น ๆ จากค่า O.D. ที่อ่านได้

4. ศึกษาการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อในน้ำทิ้งไก่

4.1 เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหาร complete medium และในน้ำทิ้งไก่

4.1.1 ฟลาสก์ที่ 1 ใช้ complete medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.1.2 ฟลาสก์ที่ 2 ใช้น้ำทิ้งไก่อย่างเดียว โดยไม่เติมทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.1.3 ฟลาสก์ที่ 3 เติมสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ลงในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.1.4 ฟลาสก์ที่ 4 เติมสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน คือ yeast extract ปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ ลงในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.1.5 ฟลาสก์ที่ 5 เติมน้ำตาลกลูโคส และ yeast extract ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์และ 0.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับลงในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เปรียบเทียบอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.2 เปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส ในปริมาณต่าง ๆ กันดังนี้ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ โดยที่ทุก ๆ เปอร์เซนต์ เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซนต์ ปรับ pH ให้ได้ 7.0

ศึกษาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.3 เปรียบเทียบปริมาณของ yeast extract

เปรียบเทียบระหว่างการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งไก่ เมื่อเติม yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ ดังนี้ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ โดยที่ทุก ๆ เปอร์เซนต์ เติมน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ปรับ pH ให้ได้ 7.0

ศึกษาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.4 เปรียบเทียบปริมาณของเกลือโคบอลท์

เปรียบเทียบปริมาณของเชื้อ เมื่อเติมโคบอลท์ซัลเฟตในปริมาณต่าง ๆ กัน ดังนี้ 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร พร้อมด้วยน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract ในปริมาณที่ศึกษาได้จากข้อ 4.2 และ 4.3 คือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปรับ pH ให้ได้ 7.0

ศึกษาอัตราการเจริญ และปริมาณเซลล์สูงสุด เช่นเดียวกับข้อ 2.4

4.5 เปรียบเทียบปริมาณสารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งไก่

4.5.1 ฟลาสก์ที่ 1 เติมน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตรอย่างเดียว โดยไม่เติมทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน โคบอลท์ และสารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12

4.5.2 ฟลาสก์ที่ 2 เติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์ และโคบอลท์ซัลเฟต 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.5.3 ฟลาสก์ที่ 3 เติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์, โคบอลท์ซัลเฟต 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ วิตามินบี 2 (riboflavin) 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.5.4 ฟลาสก์ที่ 4 เติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์, โคบอลท์ซัลเฟต 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ methionine 2.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4.5.5 ฟลาสก์ที่ 5 เติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์, โคบอลท์ซัลเฟต 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, วิตามินบี 2 (riboflavin) 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ methionine 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ลงในน้ำทิ้งไก่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ศึกษาอัตราการเจริญ ปริมาณเซลล์สูงสุดเช่นเดียวกับข้อ 2.4 และปริมาณวิตามินบี 12 เช่นเดียวกับข้อ 5

5. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12

5.1 หาปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium ณ สภาวะ stationary และ fermantation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ

5.2 หาปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งไก่ เมื่อเติม glucose 1.5 เปอร์เซนต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และวิตามินบี 2 (riboflavin) 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ณ สภาวะ stationary และ fermentation ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ

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

5.3 การเตรียม sample (extraction)

5.3.1 ปิเปต sample ลงในหลอด centrifuge ฝาเกลียว 10 มิลลิลิตร เติม buffer cyanide solution 1 มิลลิลิตร

5.3.2 เขย่าหลอดด้วย cyclo mixer

5.3.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5.3.4 นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 7000 rpm เวลา 15 นาที

5.3.5 ปิเปต supernatant เก็บไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้อ cobalamin จะถูกปล่อยออกจากเซลล์ และเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนของ supernatant

5.3.6 เจือจาง supernatant ที่ได้ เพื่อให้ความเข้มข้นวิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่น double distillation ในอัตราส่วน 1, 1:10, 1:100 และ 1:1000

5.3.7 นำ sample ที่เจือจางได้ไปหาปริมาณวิตามินบี 12

5.4 การเตรียม vitamin B_{12} standard solution

5.4.1 การเตรียม working standard vitamin B_{12} ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (79) 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 : ปิเปต stock solution ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรจาก ampule บรรจุวิตามินบี 12 เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางเป็น 100 เท่า โดยใช้น้ำกลั่น double distillation

solution B : ปิเปต solution A 0.1 มิลลิลิตร และ KCN 0.05 เปอร์เซนต์ 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น double distillation จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร standard solution นี้ใช้เป็น working standard ที่มีวิตามินบี 12 เข้มข้น 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4.3 การเตรียม standard assay tube

5.4.3.1 ปิเปต solution B ใส่ใน assay tube ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ปริมาตร 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ(triplicate)

5.4.3.2 เติมน้ำกลั่น double distillation ให้ครบ 1.5 มิลลิลิตร

5.4.3.3 เติม double strength assay medium ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตรรวม 3.0 มิลลิลิตร

5.4.3.4 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer

5.4.3.5 นำทั้ง standard assay tube และ sample assay tube ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น

ในการ assay หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องทำ calibration curve of standard vitamin B_{12} ทุกครั้งเพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อ และอุณหภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก calibration curve

5.5 การเตรียม sample assay tube

5.5.1 ปิเปต supernatant ของ sample ที่เจือจางแล้วในหัวข้อ 5.3.6 ทุกความเข้มข้น ปริมาตร 0.2, 0.5 และ 1.0 เติมน้ำกลั่น double distillation และ double strength assay medium เช่นเดียวกันกับ standard assay tube (ข้อ 5.4.3.2 - 5.4.3.3) โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate)

5.5.2 ทุกหลอดผสมโดยใช้ cyclo mixer

5.5.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 10 นาที พร้อมกับ sample assay tube ทิ้งไว้ให้เย็น

5.6 การเตรียม suspension ของเชื้อ L. leichmannii

5.6.1 ถ่ายเชื้อ L. leichmannii จาก stock culture ลงใน Tomato Juice Agar ทุกวันใน 1 สัปดาห์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพ active

5.6.2 ถ่ายเชื้อ L. leichmannii จาก agar stab ในข้อ 5.6.1 ลงใน micro-inoculum broth (ศึกษาการเตรียมจากภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.6.3 นำมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางให้ค่า O.D. เท่ากับ 0.5

5.6.4 ปิเปตเชื้อใส่หลอด centrifuge 5.0 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็วรอบ 6000 rpm แยกตะกอนเซลล์ไว้

5.6.5 ล้างตะกอนเซลล์เพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 โดยใช้ single strength assay medium (ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) 3-4 ครั้ง

5.6.6 เติม single strength assay medium 10 มิลลิลิตรลงในตะกอนเซลล์ที่ได้ จากนั้นเจือจางให้เป็น 1:1000 ด้วย double strength assay medium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

5.6.7 นำ suspension เชื้อที่ได้หยดลงใน standard assay tube และ sample assay tube หลอดละ 1 หยด โดยใช้ micropipette ยกเว้นหลอด blank

5.6.8 เขย่าด้วย cyclo mixer นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 40 ชั่วโมง

5.6.9 วัดค่าความขุ่นของเชื้อ นำข้อมูลมาเขียนกราฟ และคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12 ใน sample ออกมาเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. <u>การวิเคราะห์สารต่าง ๆ ในน้ำทิ้งไก่</u>

6.1 วิเคราะห์ปริมาณ crude protien โดยวิธี kjedahl method

6.1.1 ปิเปตน้ำทิ้งไก่ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด digest tube

6.1.2 เติมpotassium sulfate 5 กรัมและ copper sulfate 0.1 กรัม

6.1.3 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 10.0 มิลลิลิตร ใส่เศษกระเบื้องเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง

6.1.4 ทำการย่อยโปรตีน โดยใช้ Kjeltec ตั้งอุณหภูมิที่ 420 องศาเซลเซียส ทำการย่อยเป็นเวลา 30 นาที จนสารละลายเป็นสีเขียวใส

6.1.5 ทิ้งให้เย็น(ไม่ควรทิ้งให้เย็นนานจนเกินไป เพราะอาจทำให้เกลือตกผลึก และไม่ควรร้อนจนเกินไป อาจทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรง) เติมน้ำกลั่น 75.0 มิลลิลิตร

6.1.6 เติมด่าง NaOH ความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นโดยใช้เวลา 3 นาที เก็บแอมโมเนียในกรดบอริกความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งหยด screened methyl red indicator 2-3 หยด

6.1.7 ใช้เวลาในการกลั่น 5 นาที ปิดเครื่อง

6.1.8 ทำการไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N.H_2SO_4 จดปริมาตรที่ใช้

6.1.9 ทำการทดลองแบบเติมอีกครั้งโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำสารละลายที่กลั่นได้ ไตเตรทกับ 0.1 N.H_2SO_4 จดปริมาตรที่ใช้ไป นำไปคำนวณปริมาณโปรตีน

6.2 วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยใช้ phenolic method

6.2.1 เจือจางน้ำทิ้งไก่ในอัตราส่วน 1, 1:10, 1:100, 1:1000

6.2.2 ปิเปตน้ำทิ้งไก่ทุกความเข้มข้น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

6.2.3 เติม phenol 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

6.2.4 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร โดยปิเปตลงไปตรง ๆ ไม่ให้สัมผัสข้าง ๆ หลอด

6.2.5 นำไปแช่เย็นในน้ำแข็ง แล้ววัดค่า O.D. ที่ 488 นาโนเมตร

6.2.6 การหา standard curve ของ glucose

6.2.6.1 ชั่ง glucose 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

6.2.6.2 ปิเปตสารละลายจากข้อ 6.2.5.1 ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.4 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร

6.2.6.3 เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด

6.2.6.4 เติม phenol 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6.2.6.5 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปิเปตลงไปตรง ๆ ไม่ให้สัมผัสข้าง ๆ หลอด

6.2.6.6 นำไปแช่เย็นในน้ำแข็ง แล้ววัดค่า O.D. ที่ 488 นาโนเมตร

6.2.6.7 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ standard curve ของกลูโคส

6.3 การวิเคราะห์หาค่า BOD ตามวิธีของ American Pulbic Health Association (7)

วิเคราะห์ค่า BOD ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ 3 ชนิด

ชนิดที่ 1 หา BOD ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่

ชนิดที่ 2 หา BOD ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส 1.5 เปอร์เซนต์ yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์ โคบอลท์ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร วิตามินบี 2 (riboflavin) 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ชนิดที่ 3 หา BOD ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ หลังจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Prop. freudenreichii ชั่วโมงที่ 144

6.3.1 การวัด pH ของน้ำทิ้งก่อนที่ต้องการวิเคราะห์

6.3.1.1 ถ้า pH มากกว่า 7 ทำให้เป็นกลางด้วยกรด H_2SO_4 1 N.

6.3.1.2 ถ้า pH มากกว่า 7 ทำให้เป็นกลางด้วยด่าง NaOH 1 N.

6.3.2 การเตรียมน้ำเจือจาง

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

6.3.2.2 ผ่นอากาศในน้ำที่เตรียมใน 6.3.2.1 โดยใช้ air pump เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6.3.3 การเตรียม diluted sample

การเตรียม sample เพื่อ incubate ควรทำหลายๆ dilution โดยใช้หลักทั่ว ๆ ไปในการทำดังนี้

0.1 - 1.0 เปอร์เซนต์ สำหรับ strong waste

1.0 - 15.0 เปอร์เซนต์ สำหรับ raw and settle sewage

5.0 - 25.0 เปอร์เซนต์ สำหรับ oxidize effluent

25.0 - 100.0 เปอร์เซนต์ สำหรับ polluted river water

6.3.3.1 ปิเปต sample ถ่ายใน dilution water ซึ่งบรรจุในกระบอกตวงขนาด 1 ลิตร

6.3.3.2 ค่อย ๆ คน dilution water และ sample โดยไม่ให้มีฟองอากาศ

6.3.3.3 ค่อย ๆ ริน dilution sample ลงในขวด BOD 3 ขวด

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

6.3.4 การหา dissolved oxygen

6.3.4.1 เติม $MnSO_4$ 2.0 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มอยู่ในน้ำ

6.3.4.2 เติม A-I-A 2.0 มิลลิลิตร โดยให้ปลายปิเปตจุ่มอยู่ในน้ำ

6.3.4.3 ปิดจุก เขย่าขวดคว่ำและหงายสลับกัน จนเกิดปฏิกิริยาทั่วทั้งขวด

6.3.4.4 รอจนได้ตะกอนสีน้ำตาลแดงประมาณครึ่งขวด เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 2 มิลลิกรัม โดยให้กรดค่อย ๆ ไหลลงไปข้างขวด

6.3.4.5 ปิดจุดเขย่าขวดตั้งทิ้งไว้ จนเห็นน้ำใสสีน้ำตาลแดง

6.3.4.6 ใช้ปิเปตดูดน้ำใสสีน้ำตาลแดงปริมาตร 203 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร

6.3.4.7 นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate 0.025 N จนเปลี่ยนเป็นสีแดงเรื่อ ๆ

6.3.4.8 เติมน้ำแป้งลงไป 3-4 หยด เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินไตเตรทต่อเป็นสีขาวใส

6.3.4.9 จดปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน sodium thiosulfate ที่ใช้ไปทั้งหมด นำไปคำนวณหาค่า DO

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. ผลการเปรียบเทียบระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) กับ น้ำหนักแห้งของเชื้อ (dry weight cell)

จากการทดลองได้กราฟมาตรฐาน ระหว่างความขุ่นของเชื้อ (O.D.) กับน้ำหนักแห้งของเชื้อ เป็นเส้นตรงดังแสดงในรูปที่ 4.2 ในการทดลองต่อไปจะใช้กราฟมาตรฐานนี้เทียบกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จากค่า O.D. ที่อ่านได้

2. ผลการศึกษาอัตราการเจริญ (growth rate) และปริมาณเซลล์สูงสุด (maximum yield)ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่และน้ำทิ้งที่เติมสาร

2.1 ผลการศึกษาการเติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำทิ้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าน้ำทิ้งมีค่า BOD เท่ากับ 29,400 มิลลิกรัมต่อลิตร, ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ เท่ากับ 4946.67 มิลลิกรัมต่อลิตร,คาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 0.20 เปอร์เซนต์,โปรตีน เท่ากับ 0.37 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีแหล่งไนโตรเจนและคาร์โบไฮเดรตอยู่บ้าง ดังนั้นจึงทดลองเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium, น้ำทิ้ง, น้ำทิ้งที่มีการเติมสารบางชนิด เพื่อช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น โดยเติมน้ำตาลกลูโคส, yeast extract ปริมาณเท่ากับใน complete medium ปรากฏว่าน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมกลูโคสและ yeast extract มีอัตราการเจริญของเซลล์และให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด ส่วนน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่และ complete medium มีอัตราการเจริญและปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่มีสารอาหารใกล้เคียงกับใน complete medium แต่ถ้าเติมแหล่งไนโตรเจน และคาร์โบไฮเดรตเพิ่มลงไปในน้ำทิ้ง จะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุด

3. ผลการเปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส

ผลจากการศึกษา ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii โดยใช้น้ำหิ้งไก่ ปรากฏว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม คือ 1.5 เปอร์เซนต์เหมาะสมที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.6

4. ผลการเปรียบเทียบปริมาณ yeast extract

ผลจากการศึกษา ปริมาณ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii โดยใช้น้ำหิ้งพบว่าปริมาณ yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์ เหมาะสมที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.7

5. ผลการเปรียบเทียบปริมาณโคบอลท์

ผลการเปรียบเทียบปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Prop. feudenreichii โดยใช้น้ำหิ้งพบว่าปริมาณ $CoSO_4.7H_2O$ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ $CoSO_4.7H_2O$ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8

6. ผลการศึกษาอัตราการเจริญ(growth rate)ปริมาณเซลล์สูงสุด(maximum yield) และการผลิตวิตามินบี 12 ของ Prop. freudenreichii ใน complete medium และน้ำหิ้งเติมสารต่าง ๆ ณ สภาวะ stationary flask และ fermenter ที่มีระบบการกวน

ทดลองศึกษาการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้อาหาร complete medium และ น้ำหิ้งเติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซนต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารช่วยเพิ่มผลผลิต ปรากฏว่าใน complete medium ในสภาพ stationary ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 39.78 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง

ในชั่วโมงที่ 96 และในน้ำทิ้งที่เติมสารต่างๆ ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 238.44 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 96 เมื่อทดลองศึกษาการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ใน fermentor โดยใช้อาหาร complete medium และน้ำทิ้งเติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซนต์, yeast extract 2.0 เปอร์เซนต์, $CoSO_4.7H_2O$ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, methionine 2.0 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร, riboflavin 0.01 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารช่วยเพิ่มผลผลิต ปรากฏว่า ใน complete medium ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดเท่ากับ 54.69 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 96 และได้ปริมาณวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งที่เติมสารเท่ากับ 245.73 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง ในชั่วโมงที่ 96

จากการวัดผลอัตราการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์ โดยใช้ complete medium ดังแสดงโดยรูปที่ 4.12 และ 4.13 จะเห็นว่าการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์เชื้อจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 และปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 และลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องมาจากในอาหารมีการสะสมของสารบางชนิด เช่น propionic acid หรือ acetic acid จากจุลินทรีย์ไปยับยั้งการสร้างวิตามินบี 12 หรือการที่เซลล์ autolysis ทำให้วิตามินบี 12 แปรรูปเป็นสารอื่น ซึ่งทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ (1)

จากการทดลองเลี้ยงจุลินทรีย์ในสภาวะ batch fermenterได้ปริมาณวิตามินบี 12 จาก complete medium 54.69 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากสภาวะ stationary flask ทั้งนี้เนื่องมาจากระบบ fermenter ที่ใช้มีใบพัดกวนทำหน้าที่กวนให้สารอาหารและเซลล์จุลินทรีย์ผสมเข้ากัน และความเข้มข้นของสารอาหารเท่ากันทั่วถังหมัก ทำให้จุลินทรีย์สามารถใช้อาหารในการผลิตวิตามินบี 12 ได้เต็มที่ ไม่เกิด substrate inhibition เช่นในสภาวะ stationary ส่วนปริมาณวิตามินบี 12 ที่ได้จากน้ำทิ้งที่เติมสารต่าง ๆ ในสภาวะ batch fermenter มีค่ามากกว่าปริมาณวิตามินบี 12 ที่สภาวะ stationary flask ก็เนื่องมาจากเหตุผลเดียวกัน แต่การผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ควรมีการปรับปรุงให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น โดยมีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ให้เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงเชื้อเป็นแบบต่อเนื่องหรือ ทดลองศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ exponential-fed batch Toraya et al.(78)

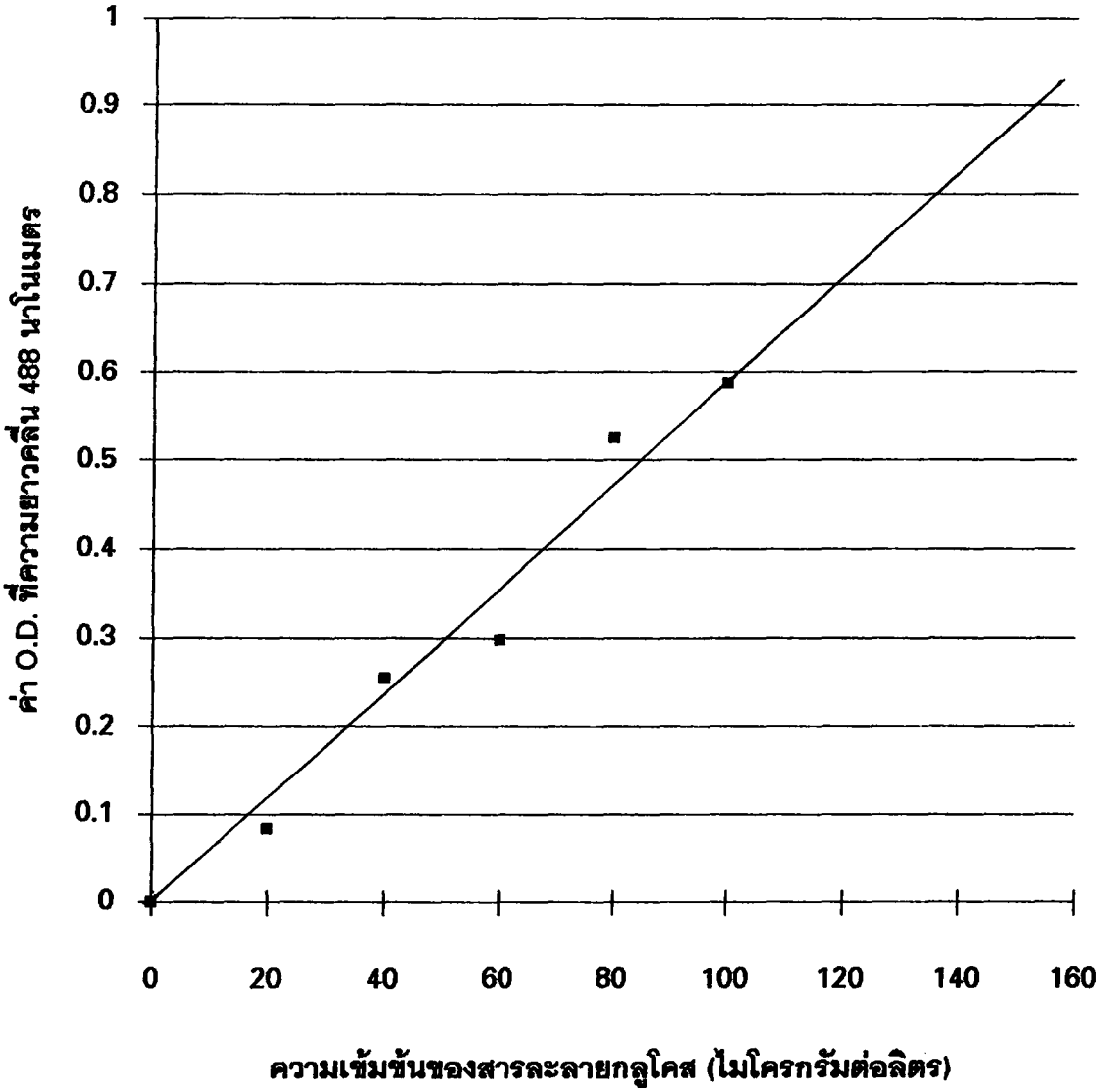
ได้ศึกษาโดยใช้อัตราการเติมแหล่งอาหารคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นให้สมดุลกับปริมาณจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น พบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นถึงประมาณ 20 เท่า ของการเลี้ยงจุลินทรีย์ในฟลาสก์ ซึ่งไม่ได้เติมอาหารให้สมดุลกับเชื้อ

7.ผลการวิเคราะห์ Biochemical Oxygen Demand (BOD)

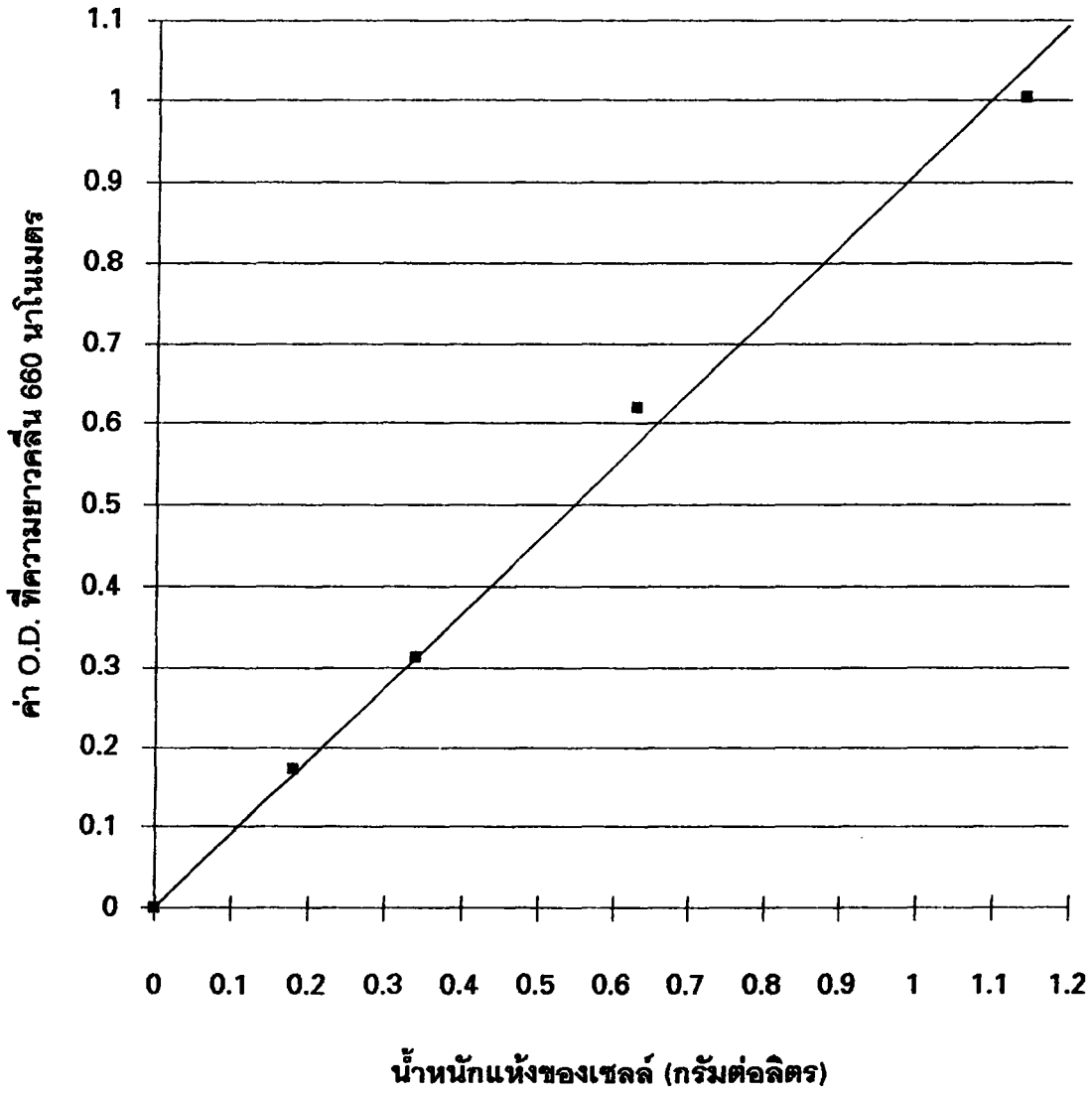
จากการวิเคราะห์ BOD ในน้ำทิ้งเติมสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 และ น้ำเหลือจากการเลี้ยง Prop. freudenreichii เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่า BOD ของน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่มีค่า 29,400 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำทิ้งเติมสารมีค่า BOD เท่ากับ 87,300 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำเหลือจากการหมักมีค่า BOD เท่ากับ 9,764 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.28 จะเห็นได้ว่าในน้ำทิ้งมีค่า BOD สูงทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะในน้ำทิ้งประกอบด้วยธาตุอาหารต่าง ๆ มีปริมาณโปรตีน น้ำตาลในปริมาณที่เหมาะสม และจากการศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ในน้ำทิ้ง พบว่าเมื่อเติมสารต่าง ๆ ลงไป จะทำเพื่อให้การเจริญของจุลินทรีย์ได้สูงกว่าการเจริญในน้ำทิ้งที่ไม่ได้เติมสารนั้น จากการทดลองพบว่าสามารถลดค่า BOD ของน้ำทิ้งลงได้ 66.79 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ และลดค่า BOD ของน้ำทิ้งได้ถึง 88.52 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับน้ำทิ้งที่เติมสารต่าง ๆ แล้ว แต่ค่า BOD ของน้ำเหลือจากการเลี้ยงแบคทีเรียยังสูงมาก ดังนั้นจึงต้องอาศัยกระบวนการกำจัดน้ำเสียวิธีต่าง ๆ ร่วมด้วยเพื่อประโยชน์ในการลดปัญหาน้ำเสียเป็นพิษ

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณสมบัติของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

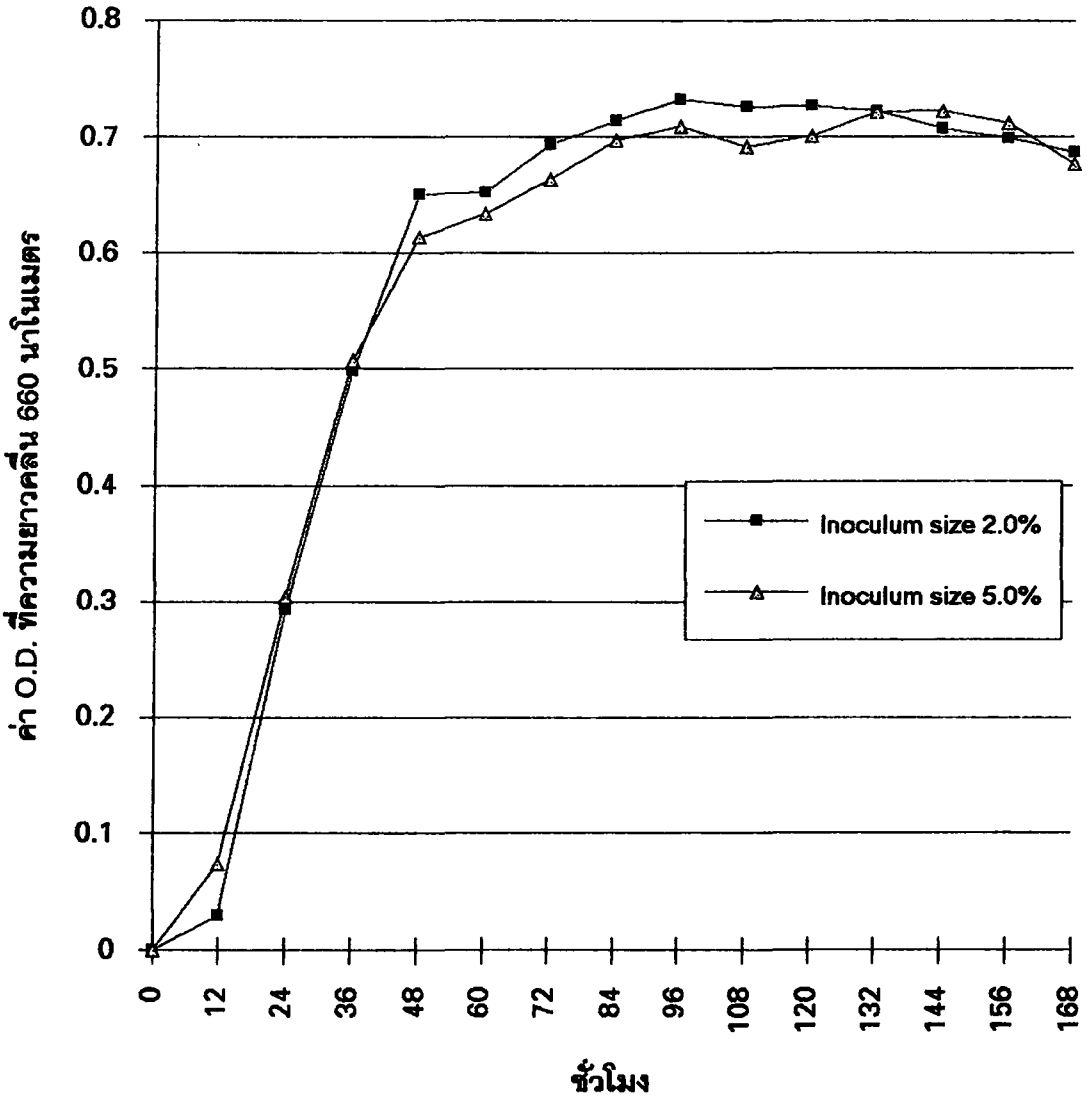
ค่า pH	7.321
น้ำหนัก (กรัมต่อมิลลิลิตร)	1.0075
suspended solid (มิลลิกรัมต่อลิตร)	4946.67
% total carbohydrate	0.02
% crude protein	0.37
ค่า BOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	29,400



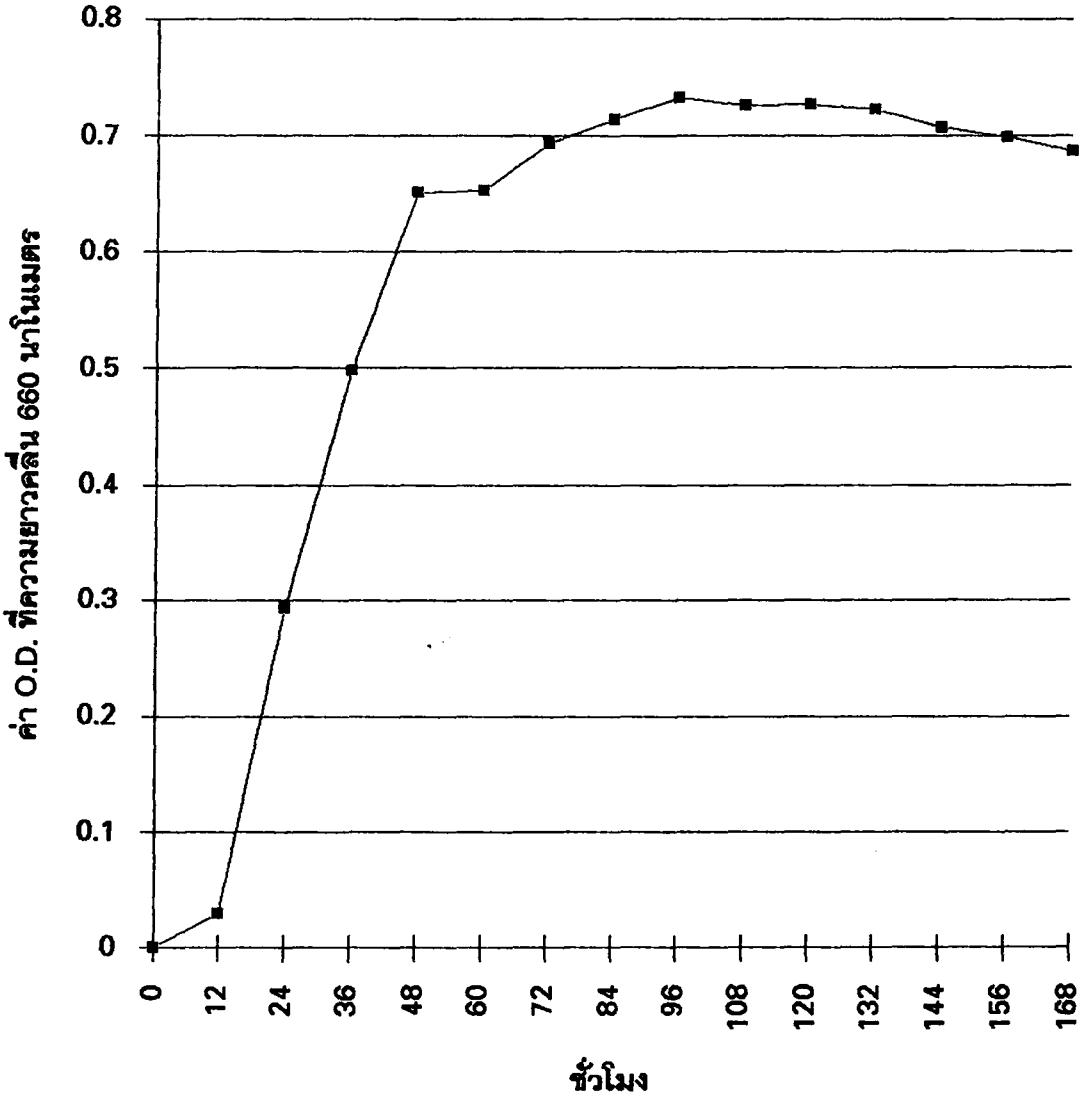
รูปที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร



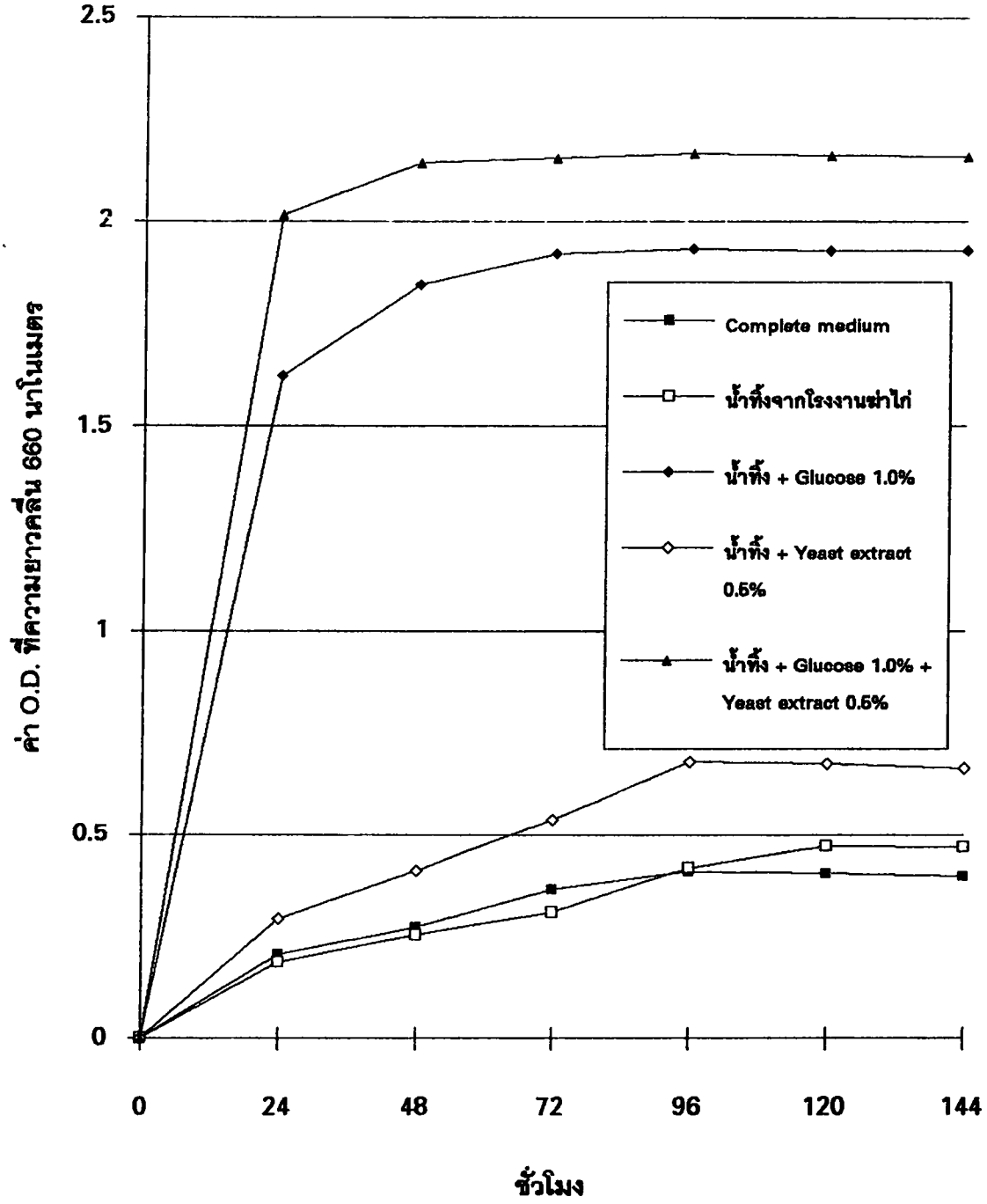
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งของเซลล์กับ
ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร



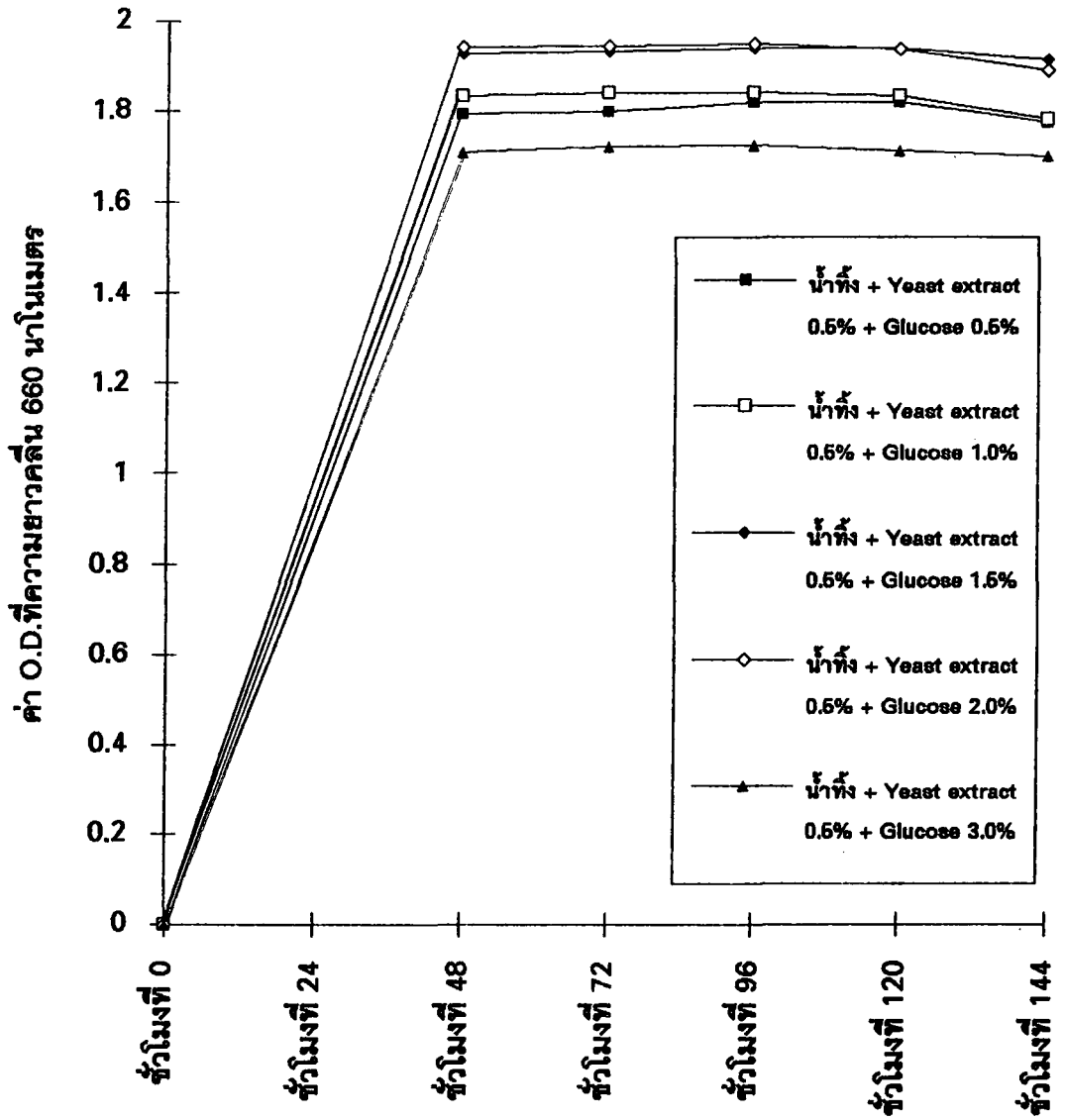
รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 2.0 เปอร์เซ็นต์หรือ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ใน complete medium pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask



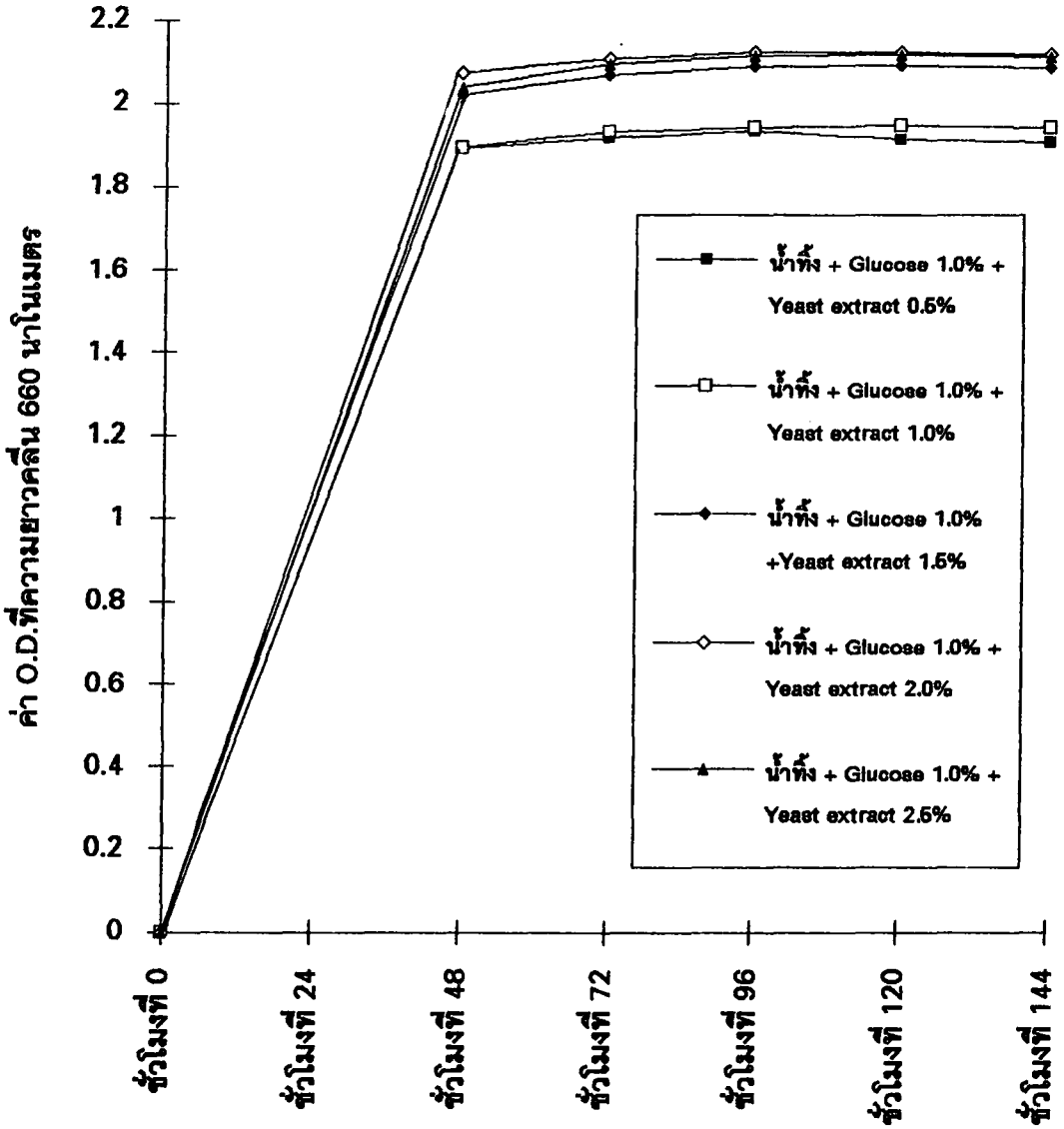
รูปที่ 4.4 แสดงการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน complete medium pH เท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask



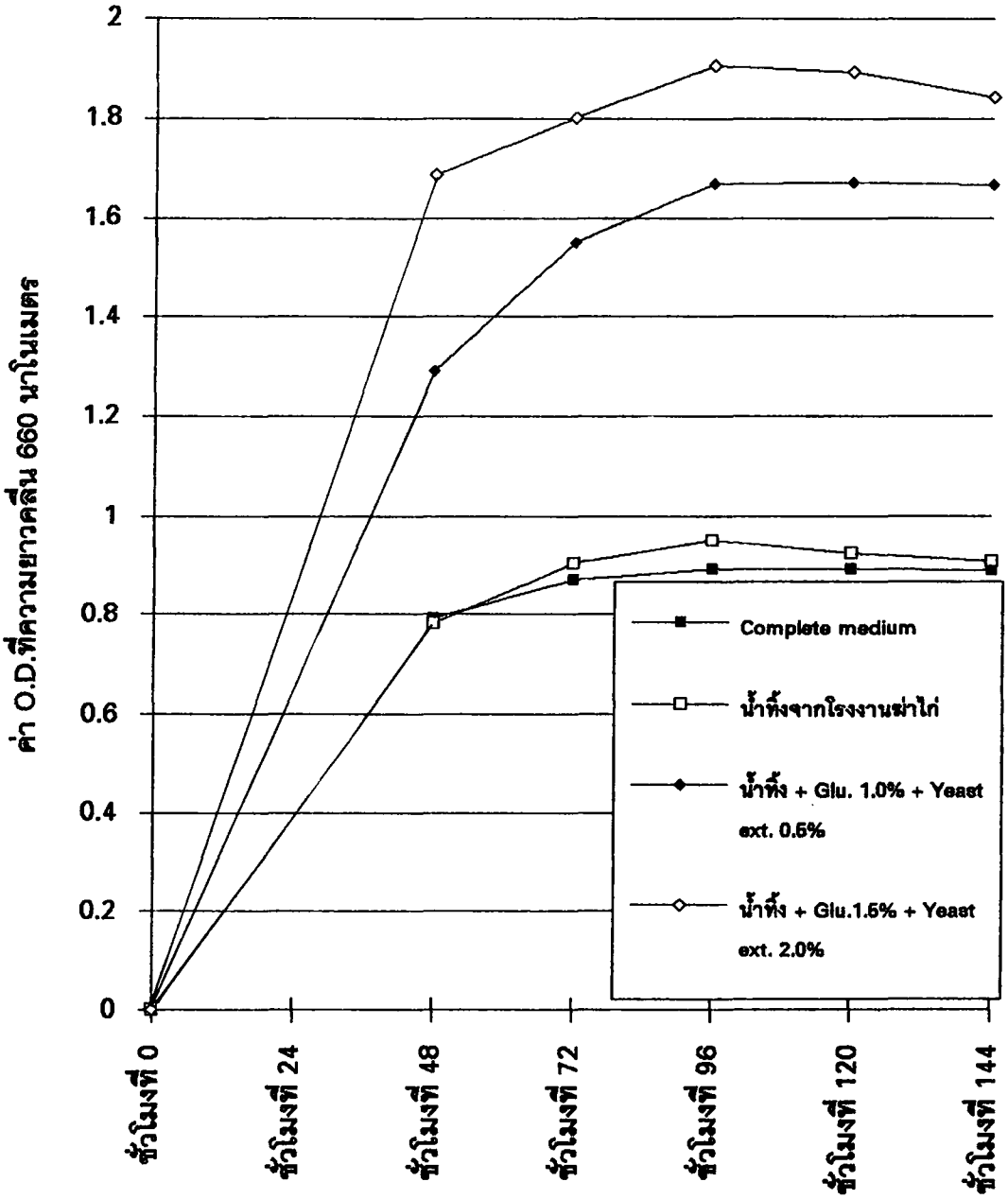
รูปที่ 4.5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสและ yeast extract ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ เปรียบเทียบกับ complete medium สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



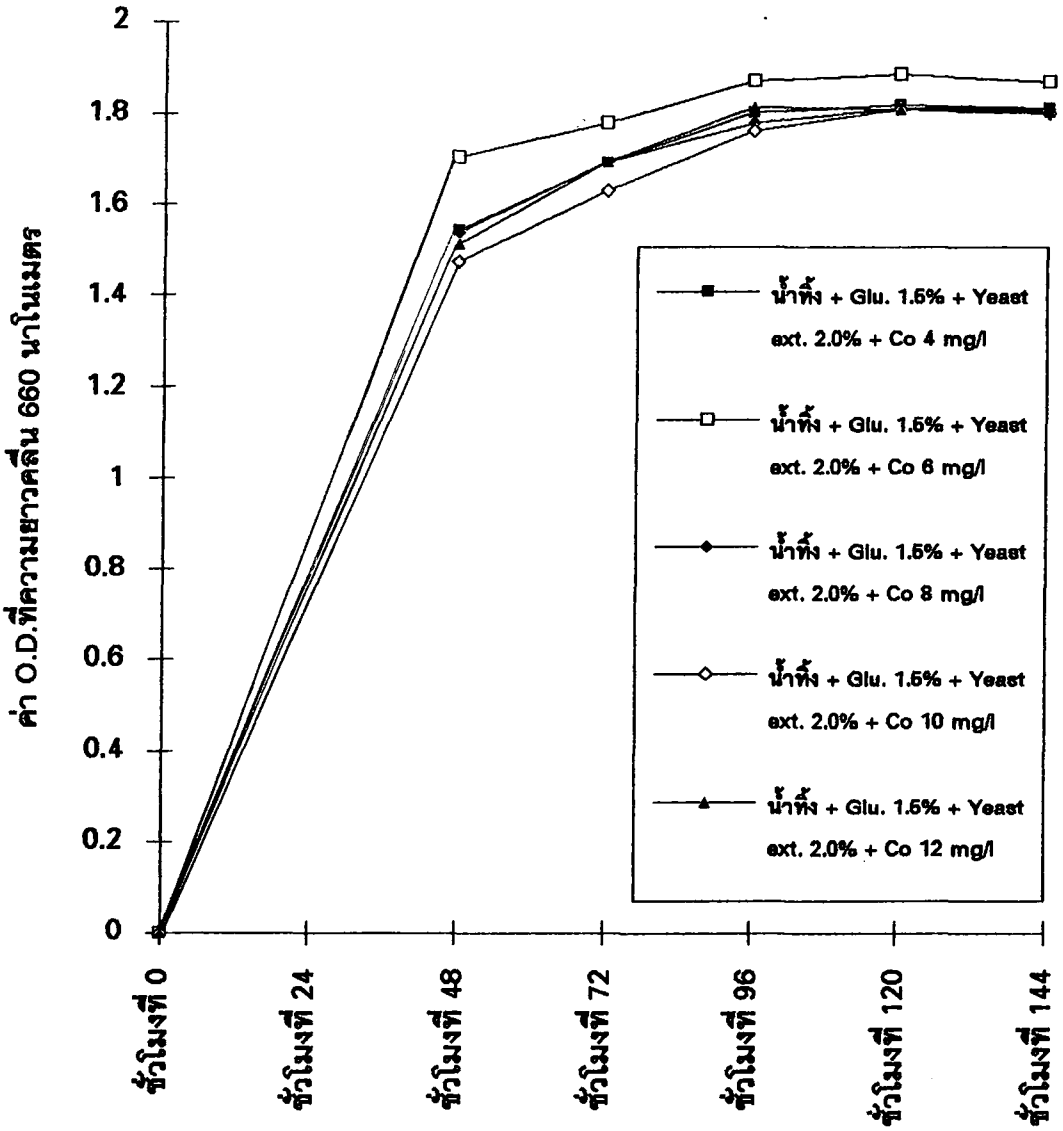
รูปที่ 4.6 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของกลูโคสในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติม yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



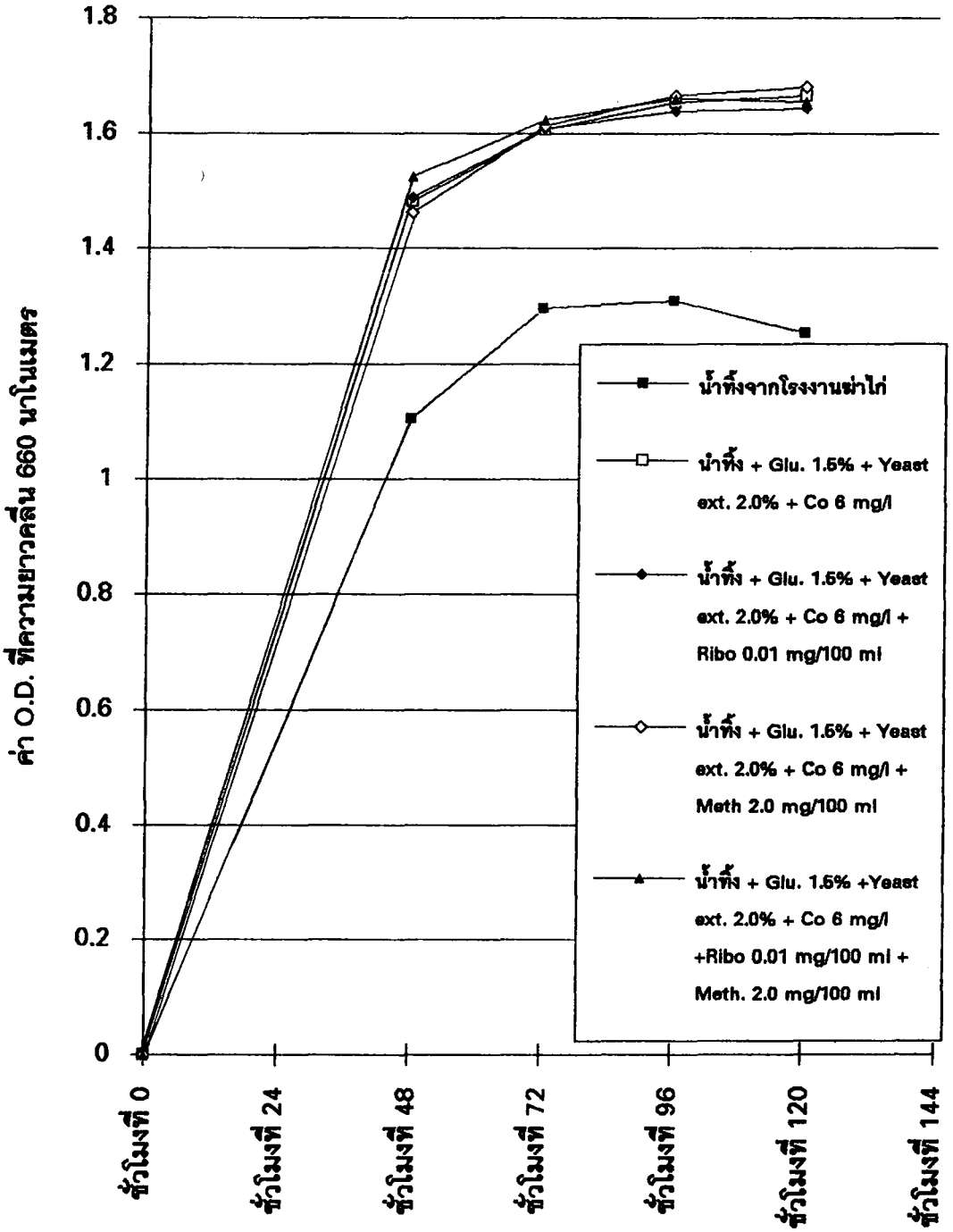
รูปที่ 4.7 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งที่เติมกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



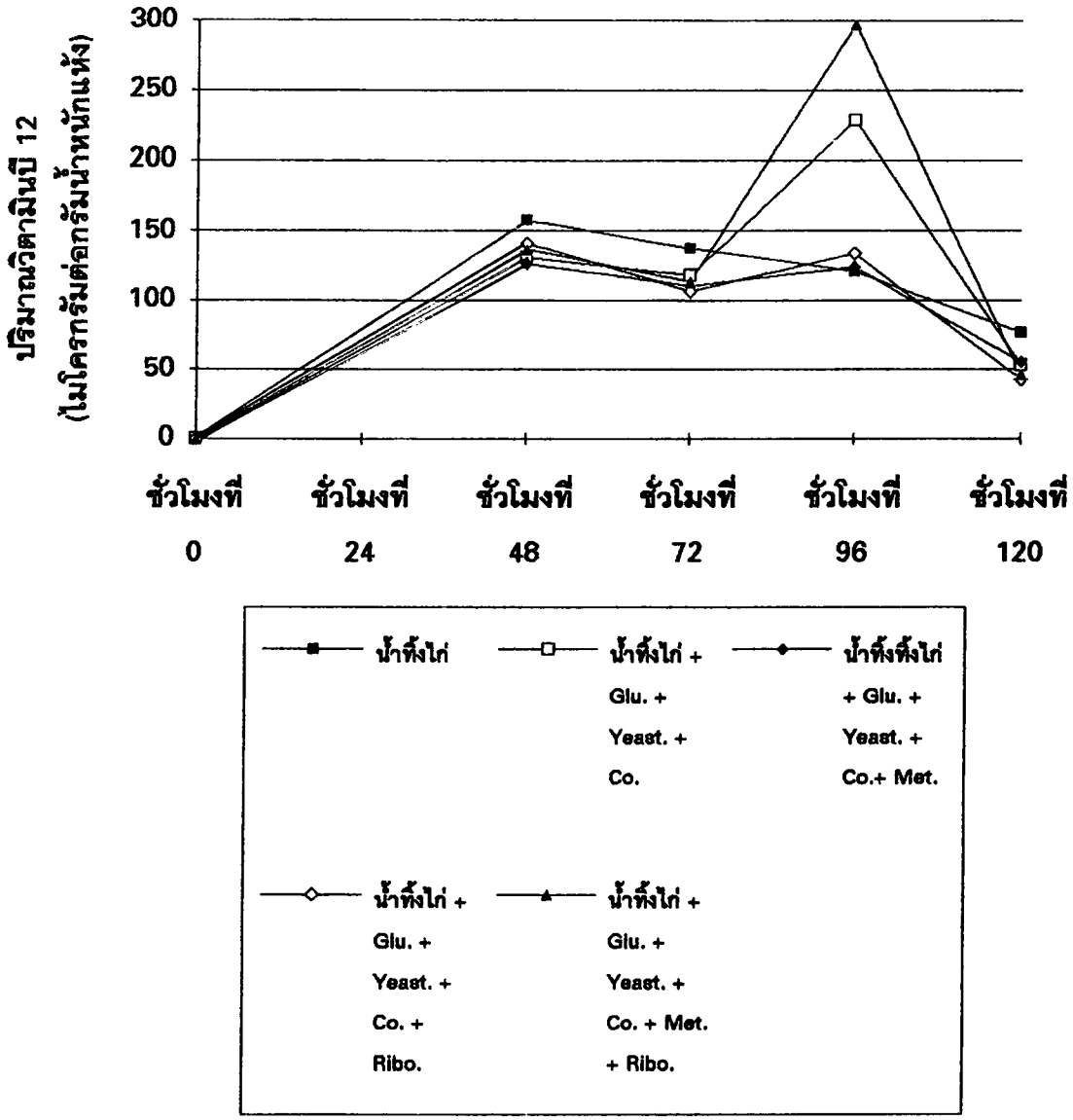
รูปที่ 4.8 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในแต่ละสภาวะที่ทำการศึกษา ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



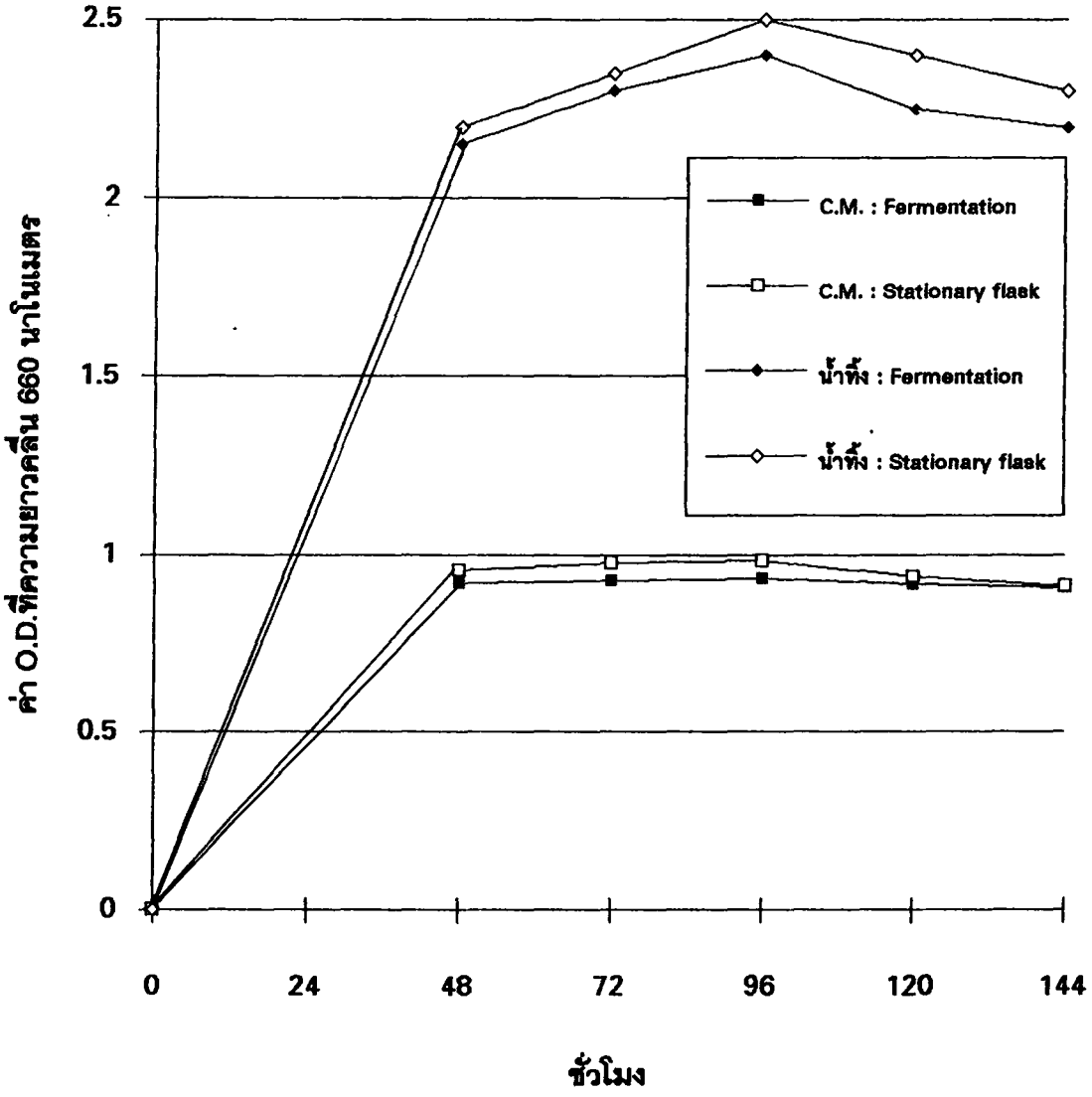
รูปที่ 4.9 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของโคบอลท์ ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



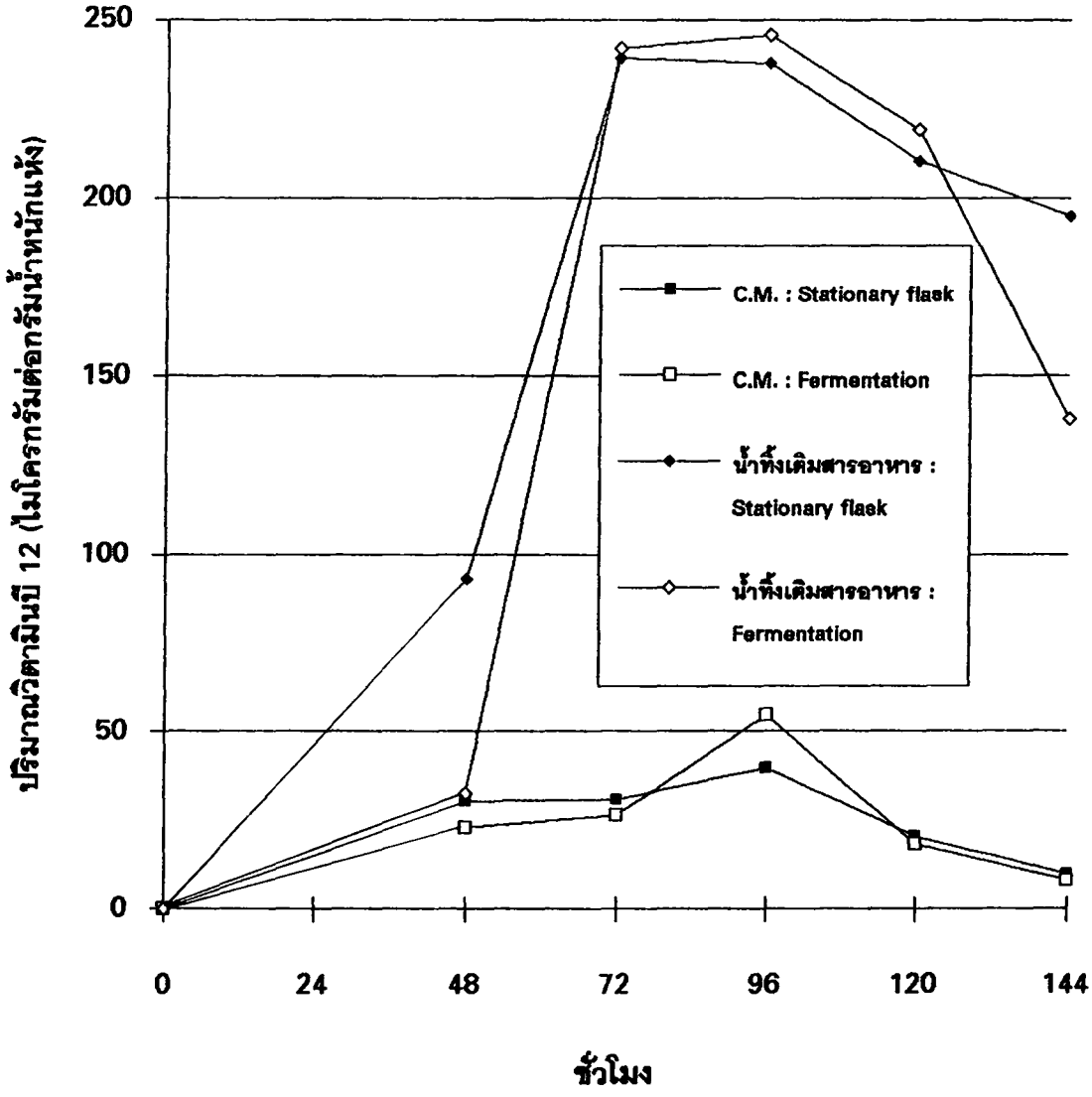
รูปที่ 4.10 แสดงผลของ methionine และ riboflavin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii และปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ Yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์ และโคบอลท์ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



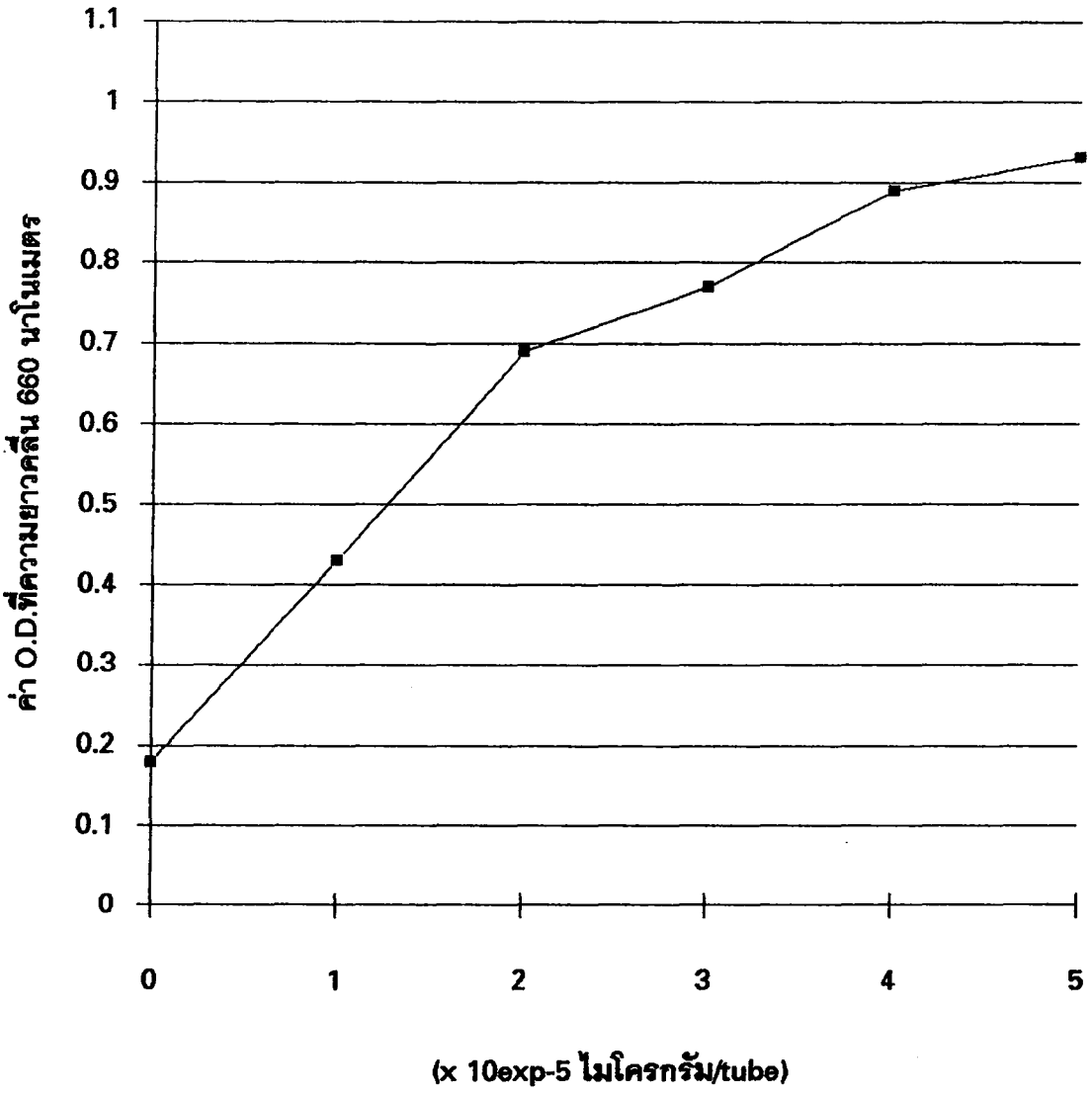
รูปที่ 4.11 แสดงผลของ methionine และ riboflavin ที่มีต่อปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมกลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 2.0 เปอร์เซ็นต์ และโคบอลท์ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



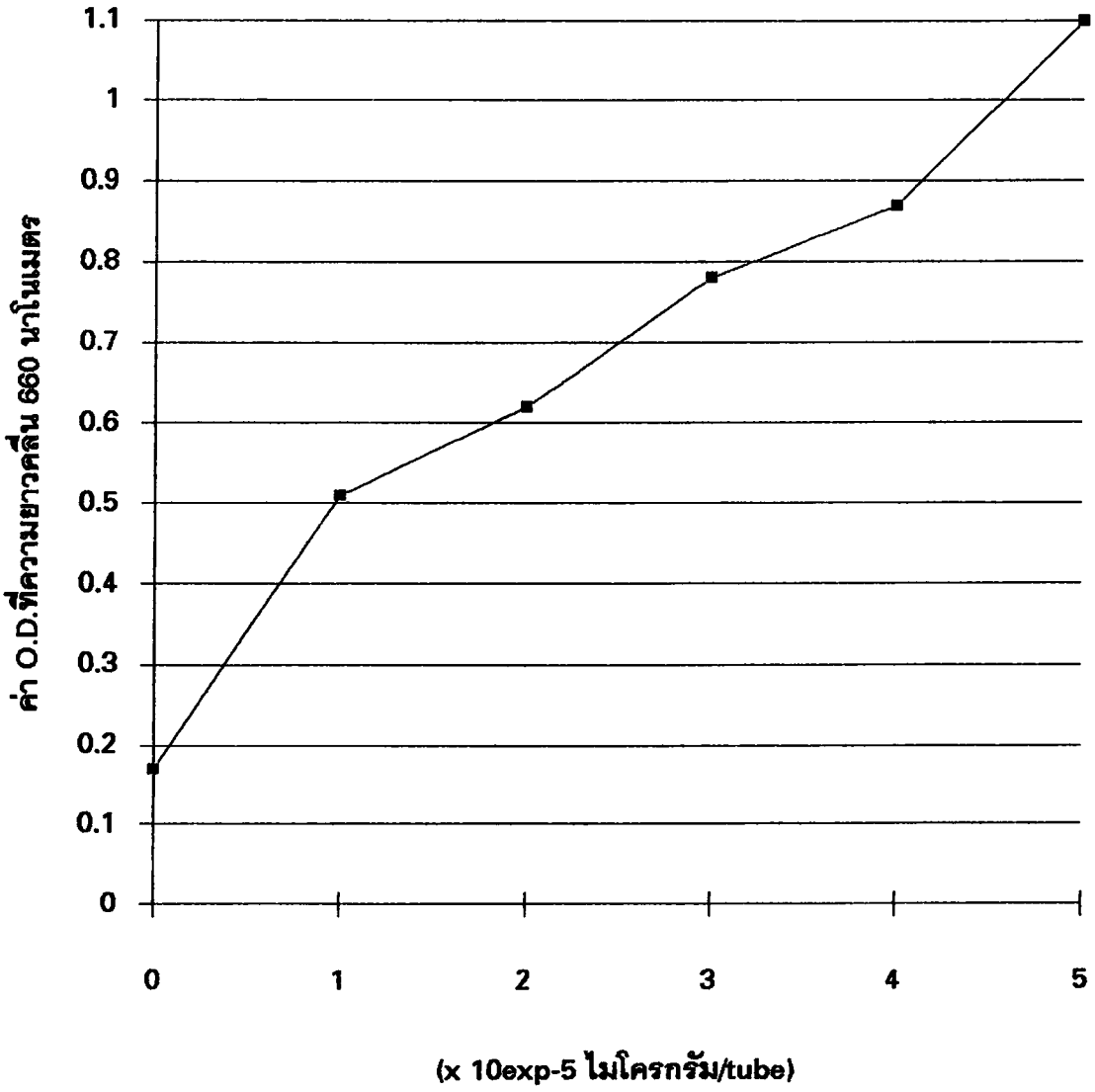
รูปที่ 4.12 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน complete medium กับน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



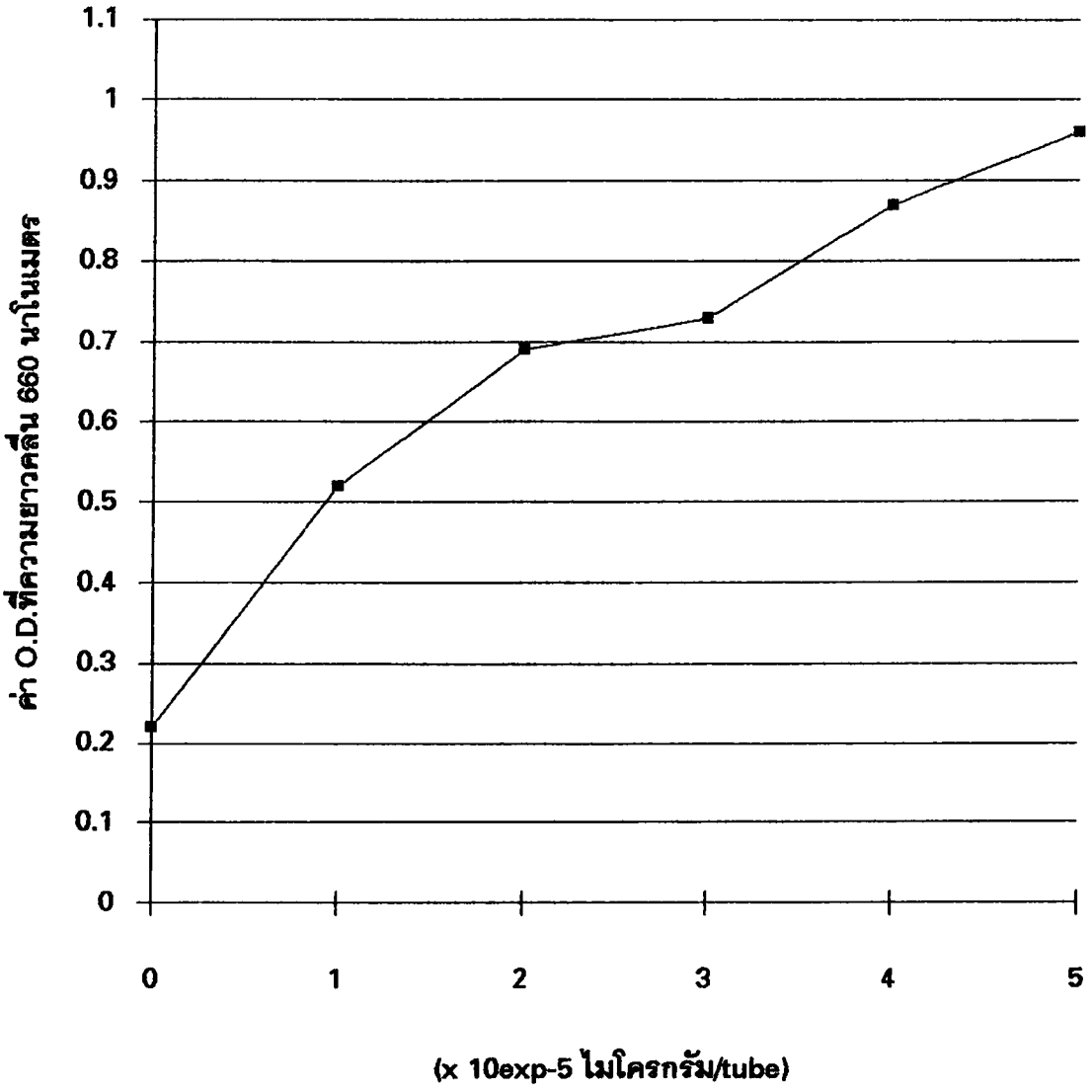
รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณวิตามินบี 12 ใน complete medium และน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ stationary flask กับ fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



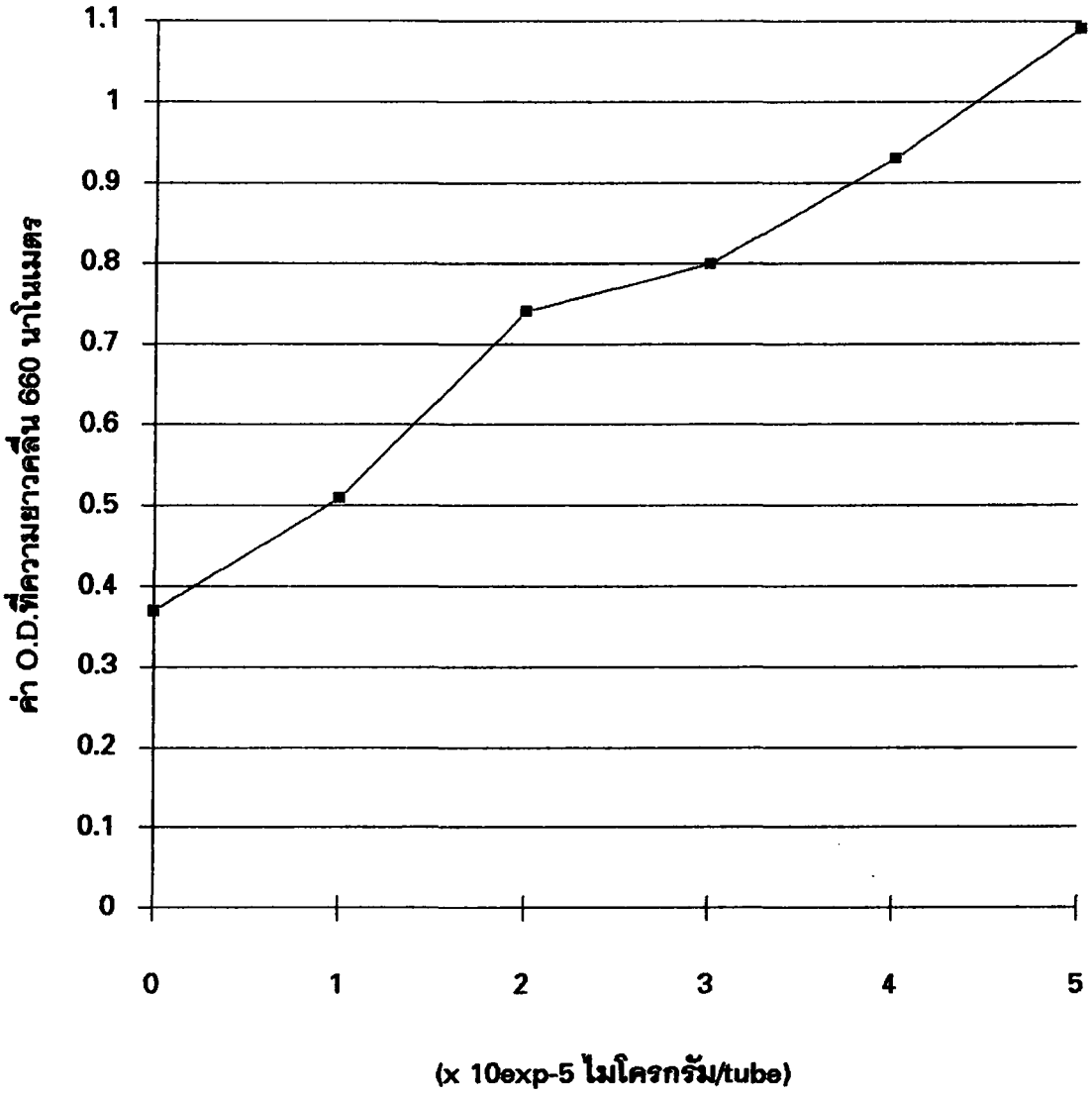
รูปที่ 4.14 แสดง Calibration curve of working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 48



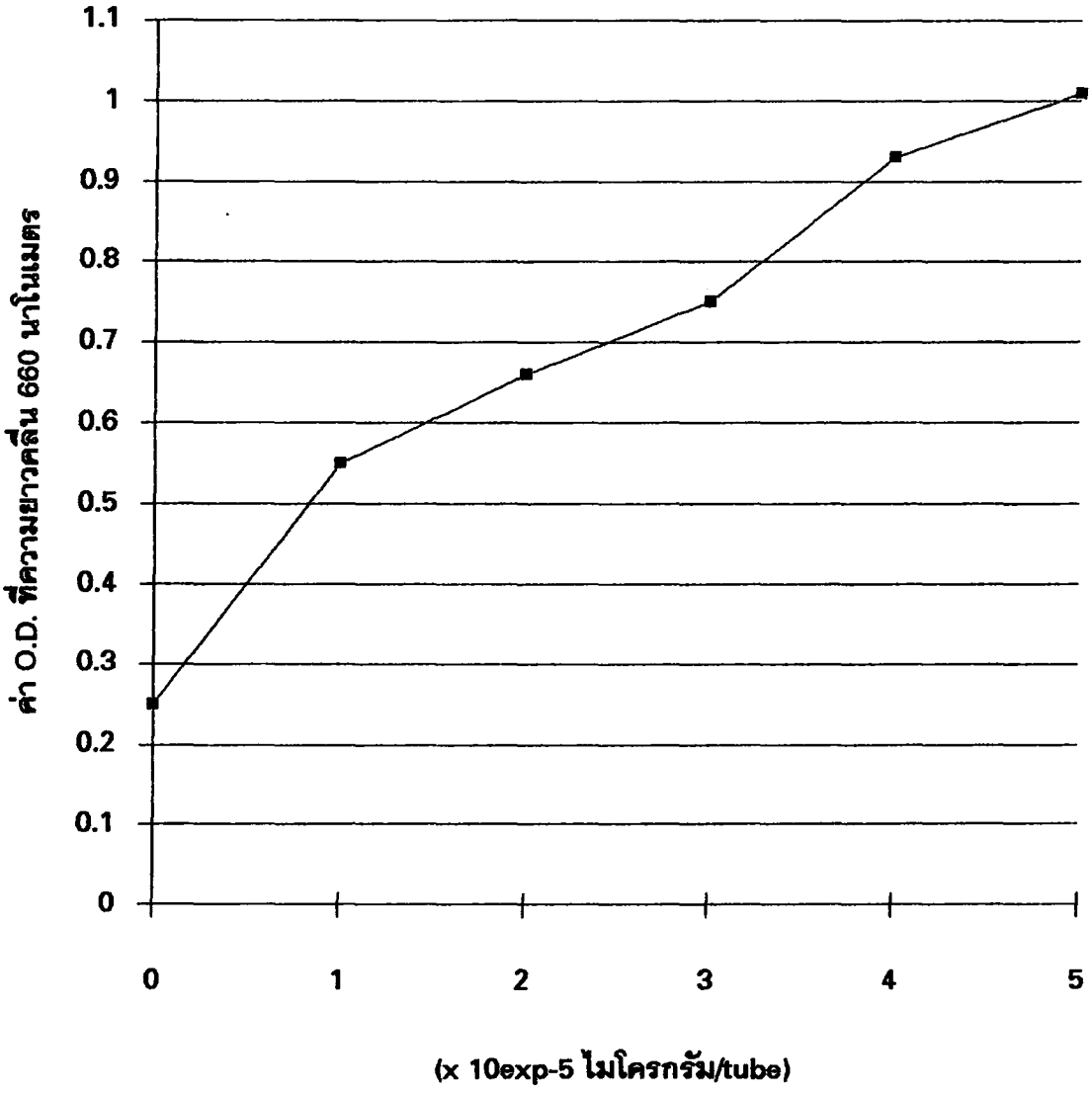
รูปที่ 4.15 แสดง Calibration curve of working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 72



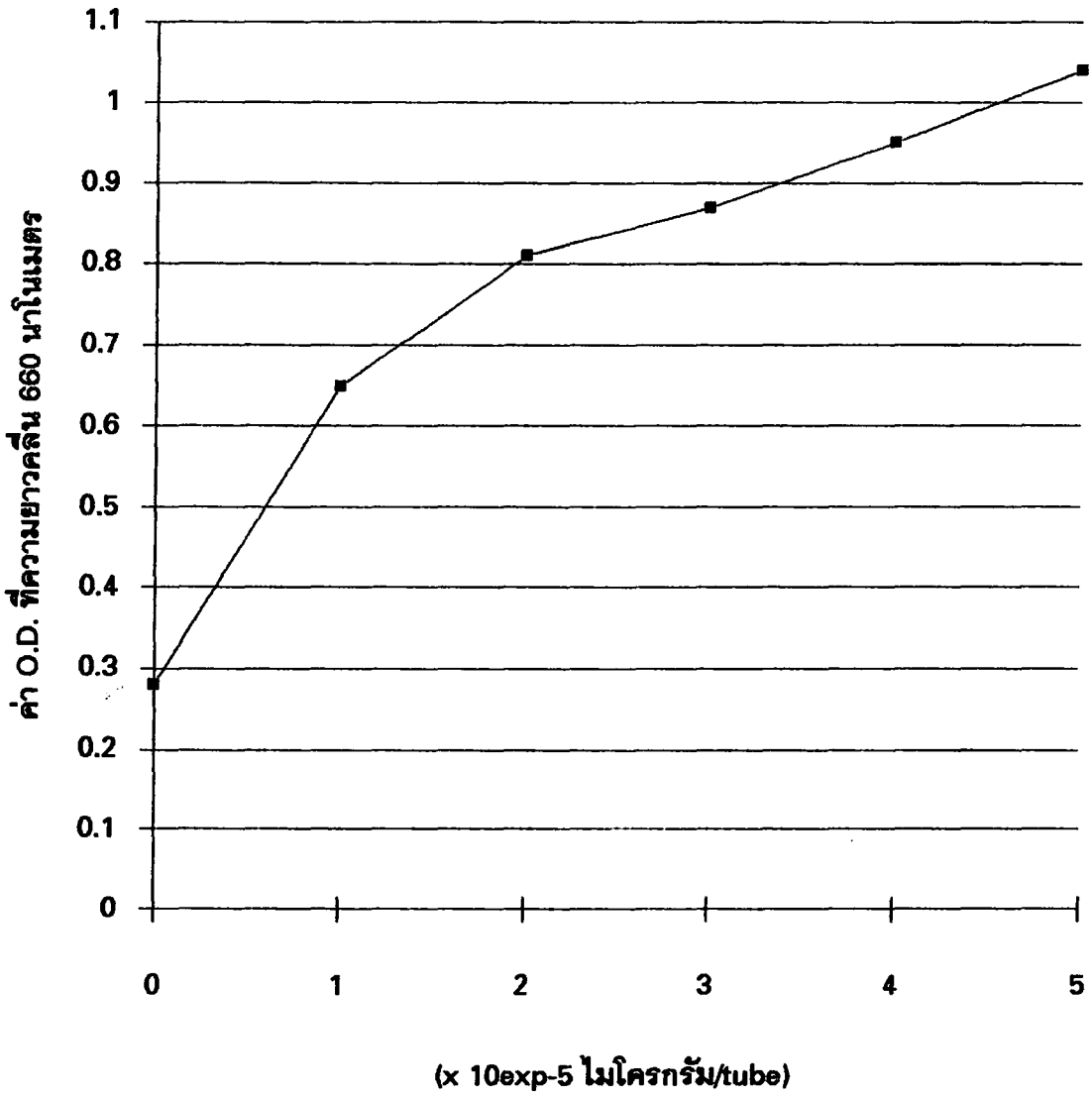
รูปที่ 4.16 แสดง Calibration curve of working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 96



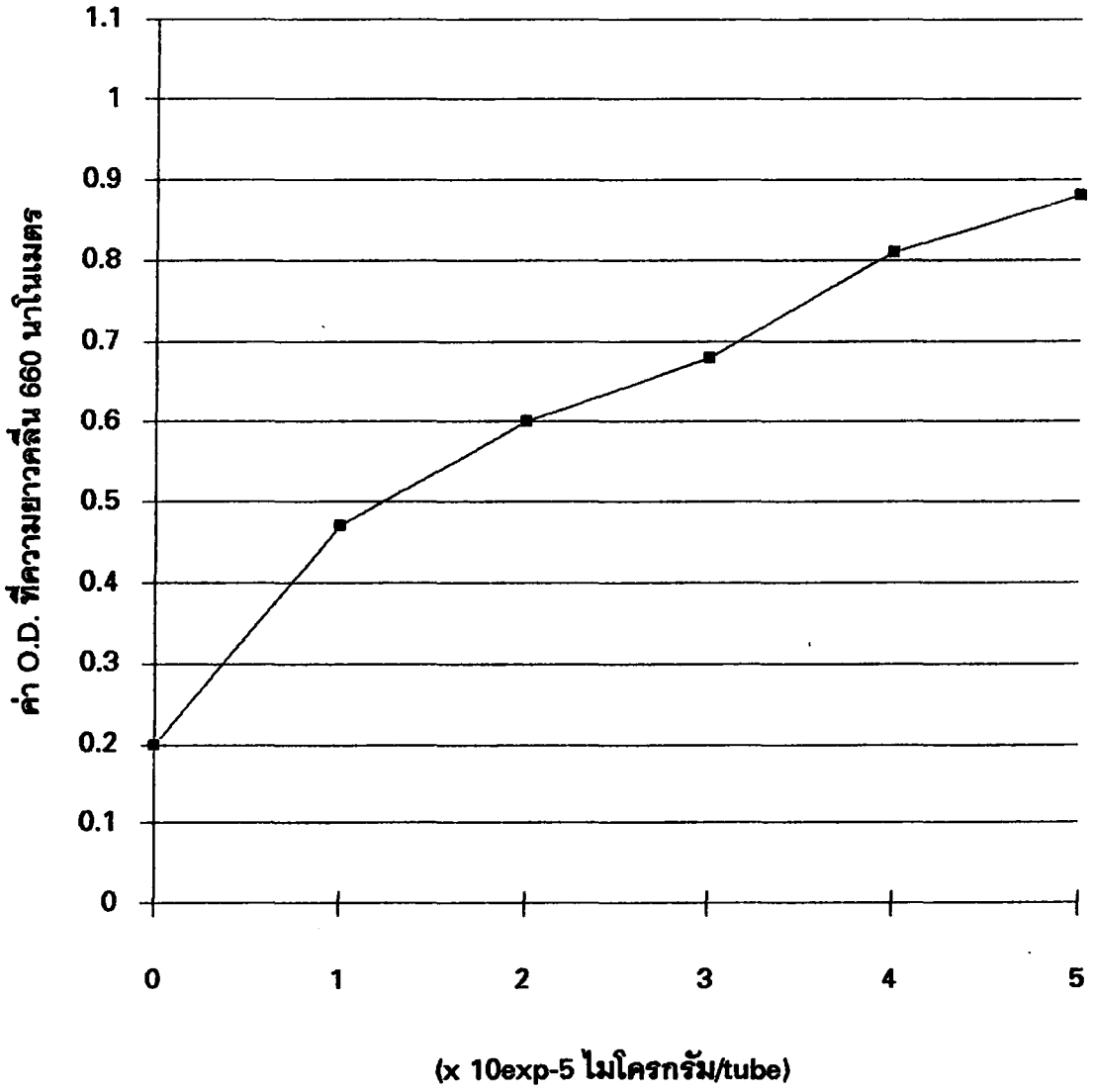
รูปที่ 4.17 แสดง Calibration curve of working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษา ชั่วโมงที่ 120



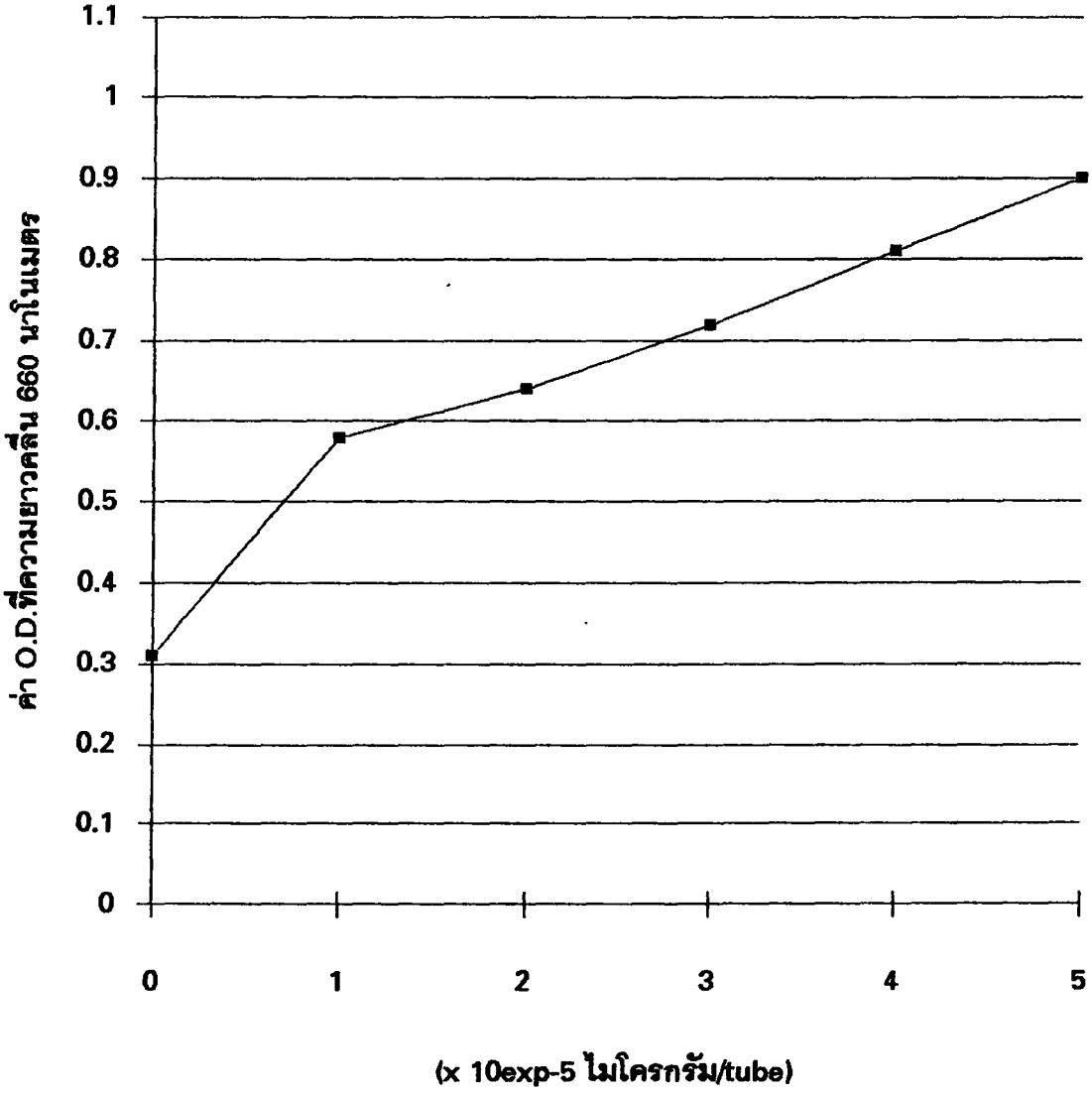
รูปที่ 4.18 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 48



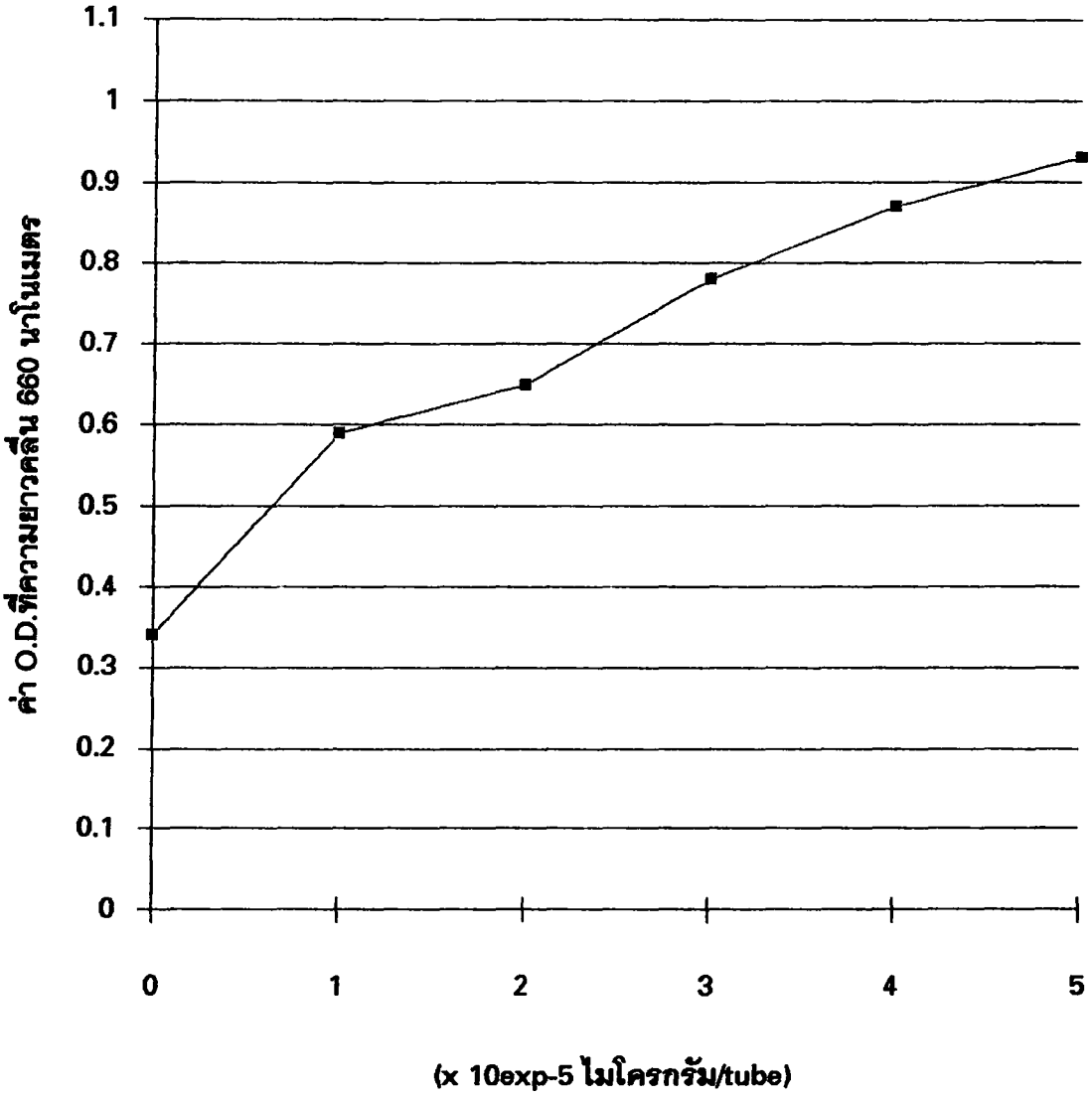
รูปที่ 4.19 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ข้าวโพงที่ 72



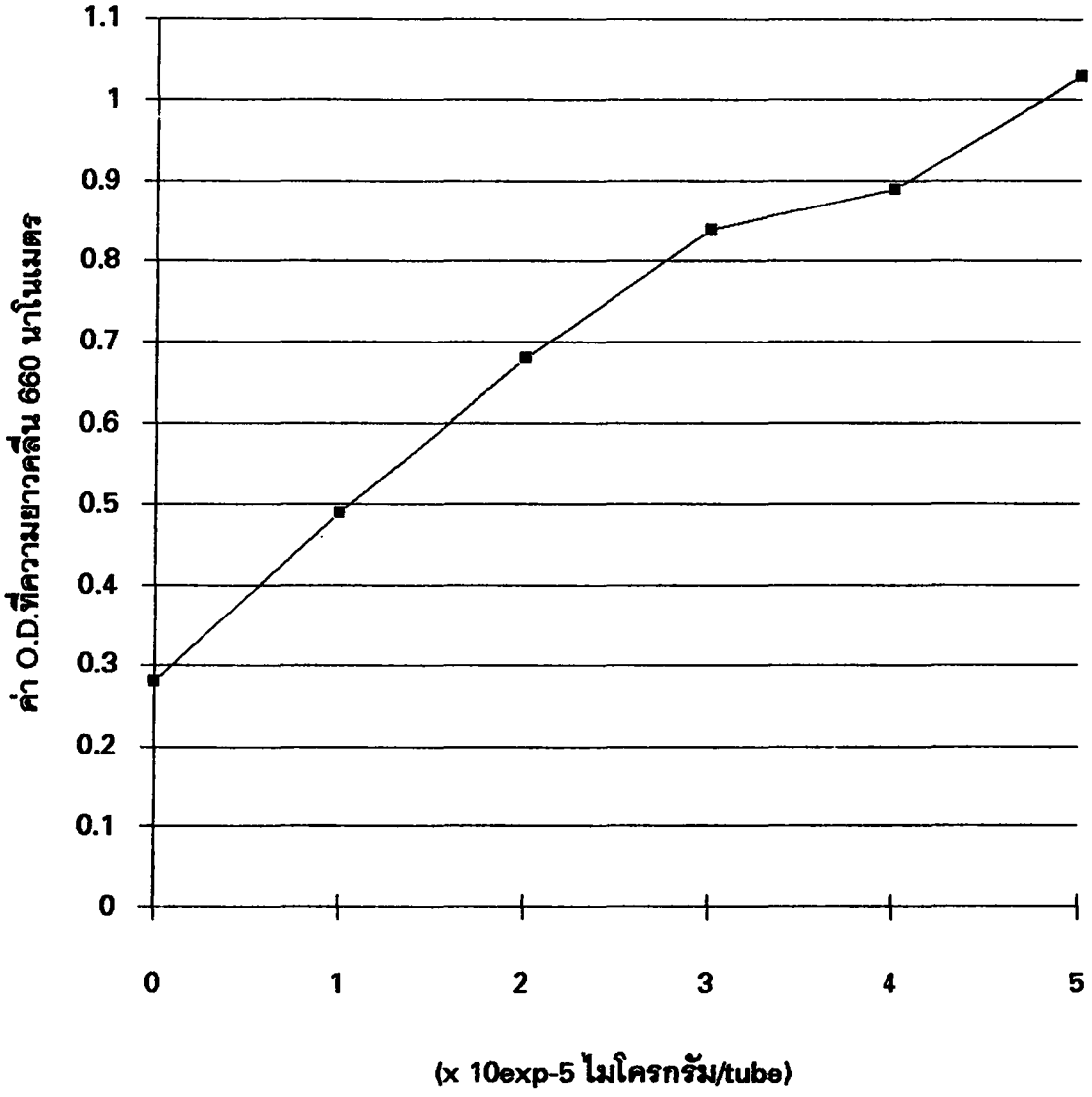
รูปที่ 4.20 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ช้าวโพดที่ 96



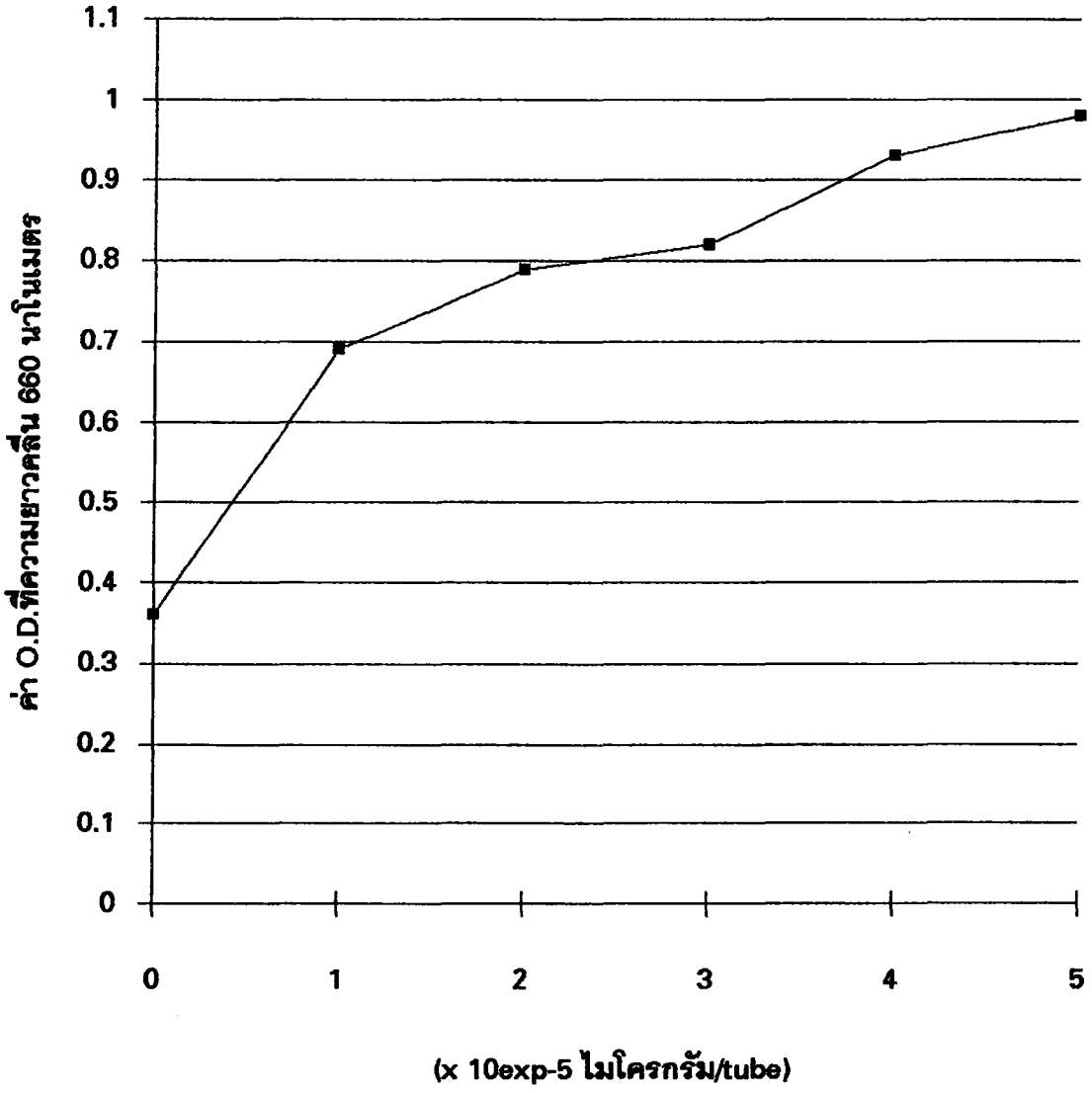
รูปที่ 4.21 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 120



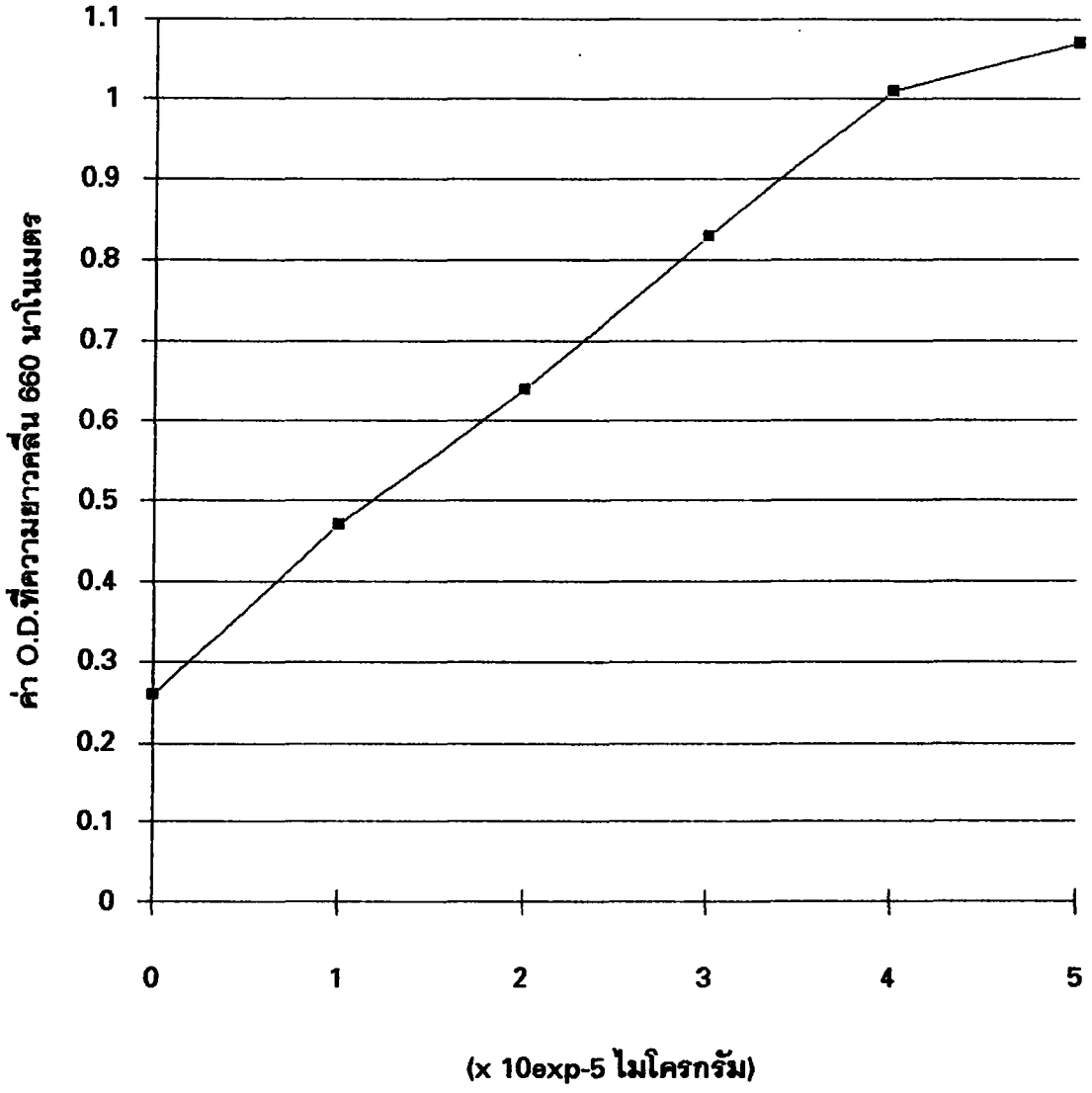
รูปที่ 4.22 แสดง Calibration curve of working standard ของ complete medium ชั่วโมงที่ 144



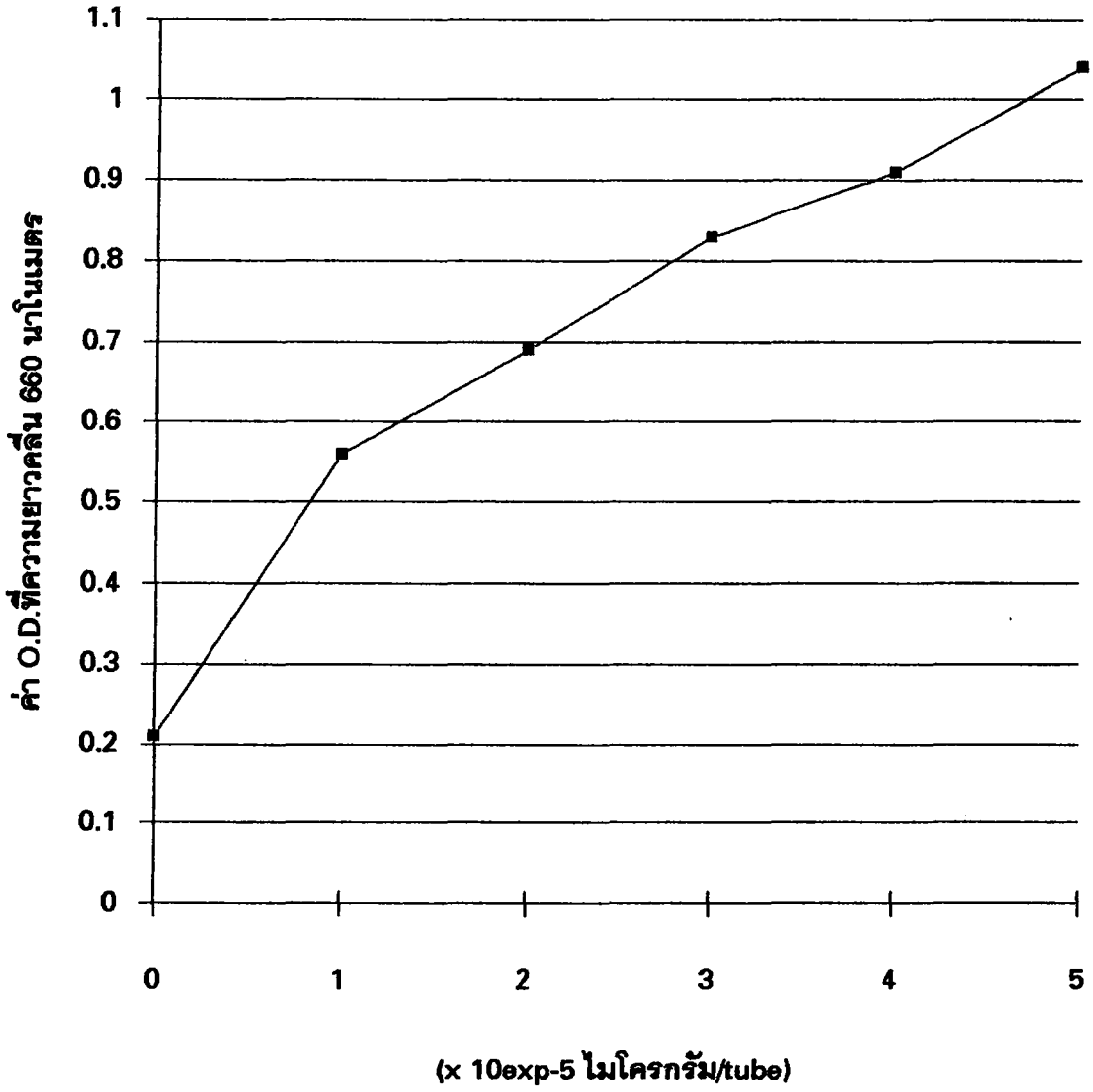
รูปที่ 4.23 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 48



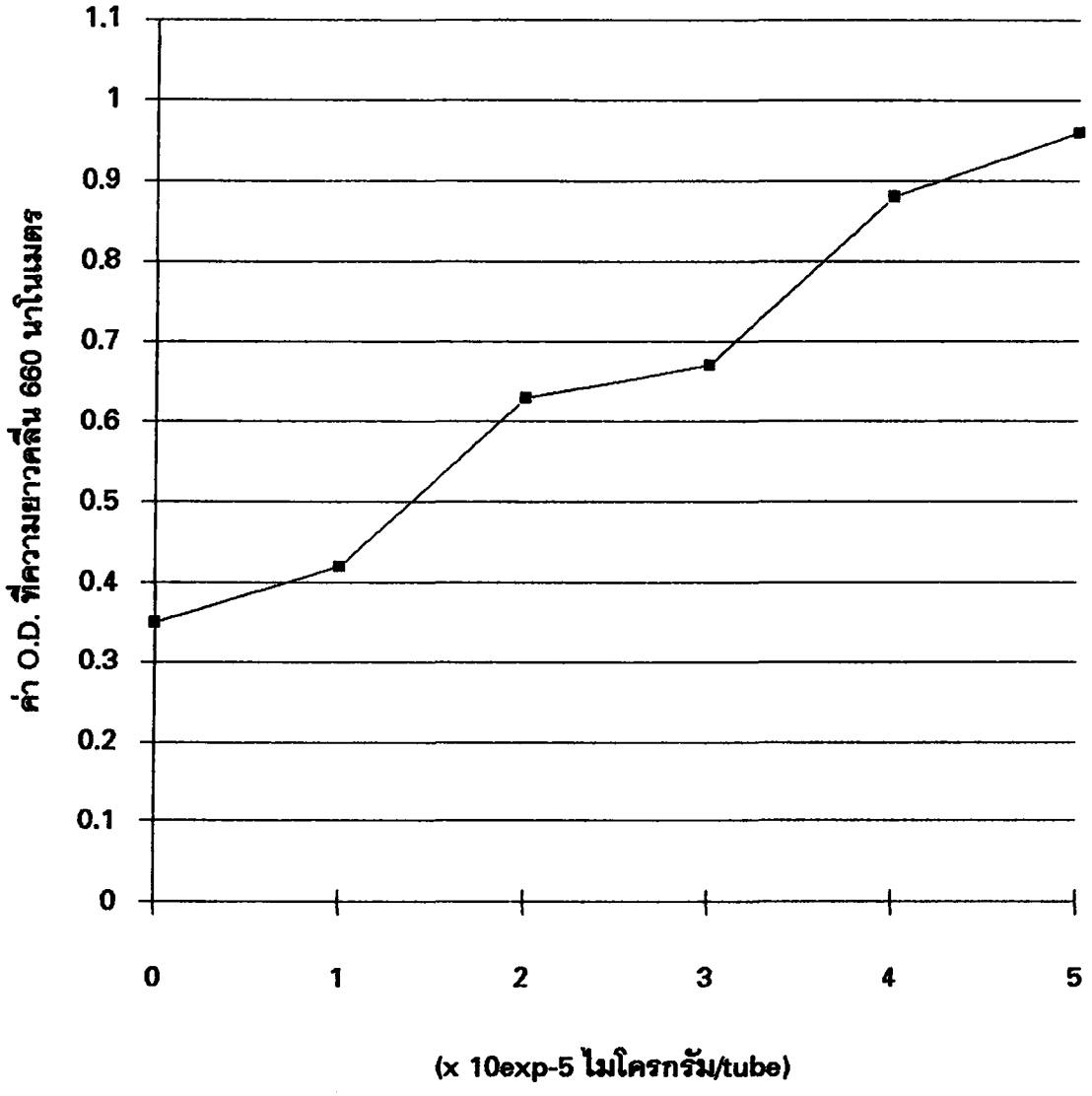
รูปที่ 4.24 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 72



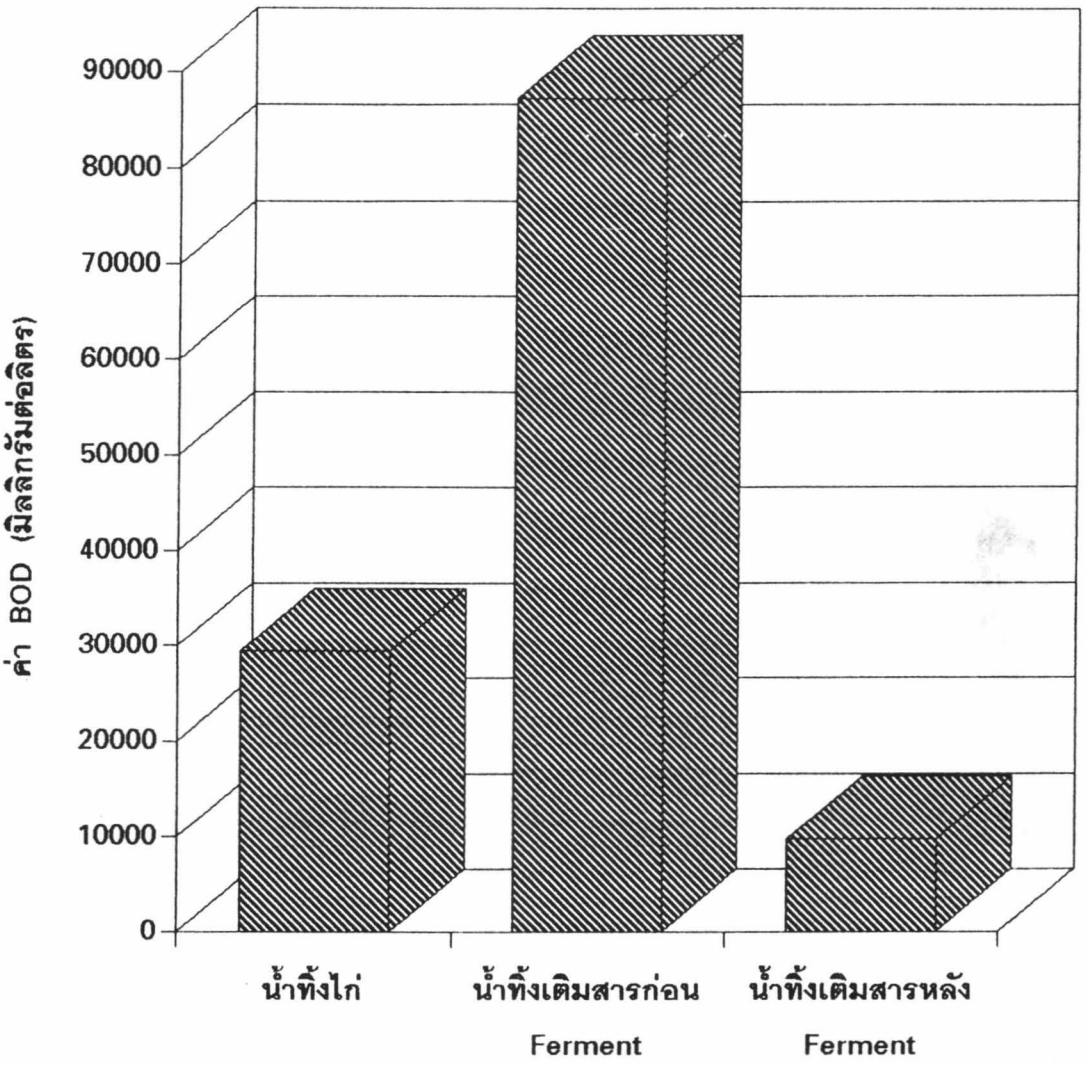
รูปที่ 4.25 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 96



รูปที่ 4.26 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 120



รูปที่ 4.27 แสดง calibration curve of working standard ของน้ำทิ้งไก่ ชั่วโมงที่ 144



รูปที่ 4.28 เปรียบเทียบปริมาณ BOD ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ น้ำทิ้งไก่เติมสารอาหารต่าง ๆ และน้ำทิ้งเติมสารอาหารต่าง ๆ หลังการหมัก

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ เปรียบเทียบกับ complete medium พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Prop. freudenreichii ใน complete medium คือ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0, อุณหภูมิ 30.0 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 0.55 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร(O.D. 660 = 0.5) ในสภาวะ stationary เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ Prop. freudenreichii เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ เติมกลูโคส 15.0 กรัม, ยีสต์สกัด 20.0 กรัม, $CoSO_4.7H_2O$ 0.6 กรัม, เมไธโอนีน 0.02 กรัมและไรโบฟลาวิน 0.001 กรัม พบว่ามีการเจริญของ Prop. freudenreichii สูงกว่าใน complete medium

เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 พบว่าเมื่อเลี้ยง Prop. freudenreichii ใน complete medium สภาวะ stationary ได้ปริมาณวิตามินบี 12 39.78 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีการกวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ได้ปริมาณวิตามินบี 12 54.69 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อนำ Prop. freudenreichii มาเลี้ยงในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมแหล่งอาหารต่าง ๆ ตามที่ได้ศึกษาไว้ข้างต้นในสภาวะ stationary พบว่าได้ปริมาณวิตามินบี 12 238.44 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และเมื่อนำมาเลี้ยงในถังหมักเช่นเดียวกับ complete medium ได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงถึง 245.73 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง complete medium กับน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมแหล่งอาหารที่ได้ศึกษา พบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่าใน complete medium ทั้งในสภาวะ stationary และในถังหมัก โดยในสภาวะ stationary น้ำทิ้งไก่ให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่า complete medium ถึง 83.32 เปอร์เซ็นต์ และในถังหมักให้ปริมาณ

วิตามินบี 12 สูงกว่า complete medium ถึง 77.74 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสภาวะ stationary กับถังหมักที่มีการกวนแต่ไม่มีการให้อากาศ พบว่าถังหมักที่มีการกวนแต่ไม่มีการให้อากาศ ให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงกว่า ดังนั้นน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมแหล่งอาหารตามที่ได้ทำการศึกษา ในสภาวะการหมักที่มีการกวนโดยไม่มีการให้อากาศจะให้ผลผลิตวิตามินบี 12 สูงกว่าและเหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12

จากการวิเคราะห์ค่า BOD ของน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ และน้ำทิ้งเติมคาร์บอน ไนโตรเจน และวิตามินด้วยปริมาณที่เหมาะสม ค่า BOD ก่อนเลี้ยงเชื้อได้ 29.40 กรัมต่อลิตร หลังจากเติมสารอาหารต่าง ๆ ได้ค่า BOD 87.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำทิ้งเติมสารที่ได้หลังจากการหมักชั่วโมงที่ 144 มีค่า BOD เท่ากับ 9.764 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่าสามารถลดค่า BOD ได้ 66.79 เปอร์เซ็นต์ และลดค่า BOD เมื่อเทียบจากน้ำทิ้งเติมคาร์บอน ไนโตรเจน โคบอลท์ และวิตามินในปริมาณที่เหมาะสม ได้ 88.52 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่า BOD ของน้ำทิ้งที่เหลือจากการหมักยังมีค่าสูง ดังนั้นจึงควรใช้การผลิตวิตามินบี 12 ร่วมกับกรรมวิธีการกำจัดน้ำเสีย

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก : อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทำ Stock Culture

1.1 อาหาร MRS medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii มีส่วนประกอบดังนี้

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

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

1.2 อาหาร MRS agar ส่วนประกอบเช่นเดียวกับ MRS medium แต่ต้องเติมวุ้น (agar) 1.5 %

1.3 อาหาร Tomato Juice Agar สำหรับเลี้ยงเชื้อ L. leichmannii มีส่วนประกอบดังนี้

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

ปรับ pH ให้ได้ 7.2

หมายเหตุ : การเตรียม Filtrate tomato juice มีวิธีการดังนี้

ชั่งมะเขือเทศ 200.0 กรัม บดให้ละเอียด ต้มในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ประมาณ 15 นาที กรองเอามะเขือเทศออกเหลือแต่น้ำใส เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตวิตามินบี 12

2.1 อาหาร Complete medium มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysis of casein	1.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	1.5	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม
K_3PO_4	1.6	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4$	10.0	มิลลิกรัม
$CoSO_4$	12.0	มิลลิกรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Pancreatic acid	4.0	มิลลิกรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.6

ภาคผนวก ข : สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตด้วย Phenolic method

1.1 conc.H_2SO_4

1.2 สารละลายฟีนอล 5 %

ชั่งสารละลายฟีนอล 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ Crude protein ด้วย Semi-micro Kieldehl method

2.1 สารละลาย H_2SO_4 0.1 N

ปิเปตกรด H_2SO_4 2.78 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

2.2 สารละลาย Na_2CO_3

ชั่ง Na_2CO_3 6.7 กรัม ใส่ขวดนำไปอบที่อุณหภูมิ 200-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง ตั้งทิ้งให้เย็นใน desicator ชั่ง Na_2CO_3 ที่เย็นแล้วให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ใส่ใน Erlenmeyer flask นำไปไตเตรตกับ H_2SO_4 ในข้อ 2.1 เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดในข้อ 2.1

2.3 สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 %

ชั่ง NaOH 40.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.4 สารละลาย H_2BO_4 เข้มข้น 4 %

ชั่ง H_2BO_4 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือดปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.5 Screened methyl red indicator

ชั่ง methyl red 0.2 กรัม ละลายใน 95 % ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นสารละลาย A ชั่ง bromocresol green 0.2 กรัม ละลายใน 95 % ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตรเป็นสารละลาย B ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ในอัตราส่วน A:B = 1:2

3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ BOD ด้วย American Public Health Association method

3.1 สารละลาย H_2SO_4 1.0 N.

นำกรด H_2SO_4 เข้มข้นที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.8 ปริมาตร 27.8 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2 สารละลาย NaOH 1.0 N.

ชั่ง NaOH 40.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.3 สารละลาย Phosphate buffer

ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4)	8.5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate(K_2PO_4)	21.75	กรัม
Disodium hydrogen phosphate(Na_2KPO_4)	33.4	กรัม
Ammonium chloride(NH_4Cl)	1.7	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.4 สารละลาย Magnesium sulphate

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

3.5 สารละลาย Calcium chloride

ชั่ง Anhydrous $CaCl_2$ 13.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

3.6 สารละลาย Ferric chloride

ชั่ง $FeCl_3.6H_2O$ 0.125 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.7 สารละลาย Manganese sulfate

ชั่ง $MnSO_4.4H_2O$ 480.0 กรัม หรือ $MnSO_4.2H_2O$ 400.0 กรัม หรือ $MnSO_4.H_2O$ 364.0 กรัมละลายในน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วกรองก่อนนำไปใช้

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

3.8.1 ละลาย KOH 700.0 กรัม หรือ NaOH 500.0 กรัม และ KI 150.0 กรัม หรือ NaI 175.0 กรัม เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

3.8.2 ละลาย NaN_3 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 3.8.1 ทิ้งไว้ค้างคืนจึงนำมาใช้

3.9 สารละลาย Sodium thiosulfate 0.025 N.

ชั่ง $Na_2S_2O_3$ 6.205 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ ที่ทำให้เย็นแล้วปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้ Volumetric flask ผสมให้เข้ากันแล้วถ่ายใส่ขวดสีชาที่สะอาดถ้าต้องการจะเก็บไว้นาน โดยความเข้มข้นของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง ให้เติม NaOH ลงไป 0.4 กรัม

การทำให้ Sodium thiosulfate ได้มาตราฐานทำตามขั้นตอนดังนี้

3.9.1 ละลาย KI 2.0 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.9.2 เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 10 มิลลิลิตร

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

3.9.4 เก็บไว้ในที่มืดนาน 5 นาที

3.9.5 ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนปริมาตรทั้งหมดเป็น 400 มิลลิลิตร

3.9.6 นำมาไตเตรตกับ Sodium thiosulfate solution จนสารละลายมีสีเหลือง

3.9.7 เติมน้ำแป้ง(ข้อ 3.11) 3-4 หยด จะได้สารละลายสีน้ำเงินไตเตรตต่อจนใสจะถึงจุดยุติ จดปริมาตรของ Sodium thiosulfate solution ที่ใช้ไป นำมาคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ความสัมพันธ์ดังนี้

สารละลาย Sodium thiosulfate 0.025 N. ทำปฏิกริยาพอดีกับ สารละลาย Potassium dicromate 0.025 N. จำนวน 20 มิลลิลิตร

3.10 สารละลาย Potassium dicromate 0.025 N.

ชั่ง $K_2Cr_2O_7$ นำไปอบให้แห้งที่ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง นำเข้า desicator รอให้เย็นแล้วชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1.226 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร โดยใช้ Volumetric flask

3.11 สารละลายแป้ง

ชั่งแป้งมัน 5-6 กรัม ละลายน้ำเล็กน้อยเทลงในน้ำกลั่นที่เดือด ปล่อยให้เดือดนาน 2-3 นาที แล้วรินเอาแต่ส่วนใสไว้ใช้ ถ้าต้องการเก็บไว้นาน ๆ เติม Salicylic acid 1.25 กรัมต่อน้ำแป้ง 1 ลิตร

4. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 ด้วย Turbidimetric Method of Microbiological Assay

4.1 Acetate buffer 0.1 M. pH 4.6

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B

สารละลาย A : 0.1 M. CH_3COOH

acetic acid 5.8 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย B : 0.1 M. CH_3CooNa

sodium acetate 8.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

นำสารละลาย A 25.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย B 24.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.2 Buffer cyanide solution

ชั่ง KCN 1.0 กรัม ละลายใน Acetate buffer 0.1 M. pH 4.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย KCN 0.05 %

ละลาย KCN 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

4.4 วิตามินบี 12 ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายผลึกวิตามินบี 12 (Cyanocobalamin) ของ Merck & Co;Inc. 1.0 มิลลิกรัมในสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2 100 มิลลิลิตร ดูดใส่ ampule (เตรียมจากหลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร โดยหลอมปลายปิดไว้ด้านหนึ่งก่อน) 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมปลาย ampule อีกด้านหนึ่ง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บไว้เป็น Stock solution โดยแช่ไว้ในตู้เย็น

4.5 Micro-inoculum broth ของเชื้อ L. leichmannii มีส่วนประกอบดังนี้

Bacto-Yeast extract	20.0	กรัม
Proteose-Pentose (Difco)	5.0	กรัม
Bacto-Dextrose	10.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.0	กรัม
Sorbitan monocleate complex(Span 80)	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1.0	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4.6 สารละลาย Single strength assay medium

ชั่ง Vitamin B_{12} assay medium ของ Merck & Co;Inc. 4.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Tween 80 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส (239 องศาฟาเรนไฮต์)นาน 10 นาที สารละลายนี้ใช้สำหรับล้างเซล L. leichmannii

4.7 สารละลาย Double strength assay medium

ชั่ง Vitamin B_{12} assay medium ของ Merck & Co;Inc. 8.30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติม Tween 80 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด 2-3 นาที แบ่งใส่หลอดละ 9.0 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส (239 องศาฟาเรนไฮต์)นาน 10 นาที สารละลายนี้ใช้สำหรับทำ Dilution ของเชื้อ L. leichmannii และใช้สำหรับวิเคราะห์วิตามินบี 12

สารละลาย Vitamin B_{12} assay medium ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการ assay วิตามินบี 12

ภาคผนวก ค : แผนภาพแสดงวิธีการวิเคราะห์ผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณ Crude protein โดยวิธี Semi-micro Kjiedahl Method

ปิเปตน้ำทิ้ง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด digest tube

↓

เติม K_2PO_4 5 กรัมและ $CuSo_4$ 0.1 กรัม

↓

เติม H_2SO_4 เข้มข้น 10 มิลลิลิตร

ใส่ Glass bead เพื่อป้องกันการเดือดอย่างรุนแรง

↓

ย่อยโปรตีนนานประมาณ 1 ชั่วโมง

จนได้สารละลายสีเขียว

↓

ทิ้งให้เย็น

↓

เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร

↓

เติม NaOH เข้มข้น 40 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

↓

ทำการกลั่นโดยเก็บก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในกรดบอริค 4 %

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่หยด Screened methyl red indicator

2-3 หยด เป็นเวลา 5 นาที

↓

ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรด H_2SO_4 0.1 N.

หมายเหตุ : ทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง (Blank)

2. การวิเคราะห์ปริมาณ Total carbohydrate ด้วยวิธี Phenolic method

เจือจางน้ำทิ้ง 10^0,10^{-1} และ 10^{-2}

↓

ปิเปตน้ำทิ้งใส่หลอดทดลองความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร

↓

เติม Phenol 5 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

↓

เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ขณะเติมกรดระวังไม่ให้สัมผัสข้างหลอด

↓

แช่ในน้ำแข็ง

↓

นำไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสง 488 นาโนเมตร

↓

นำค่า O.D. ที่ได้ไปอ่านค่า Total carbohydrate

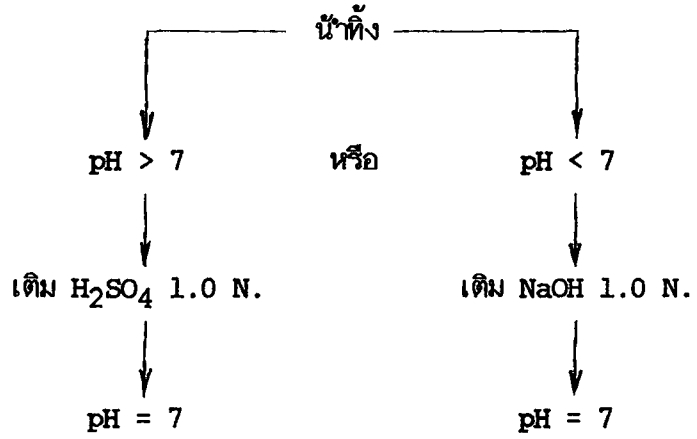
จากกราฟมาตราฐานกลูโคส

หมายเหตุ : การเขียนกราฟมาตราฐานกลูโคส

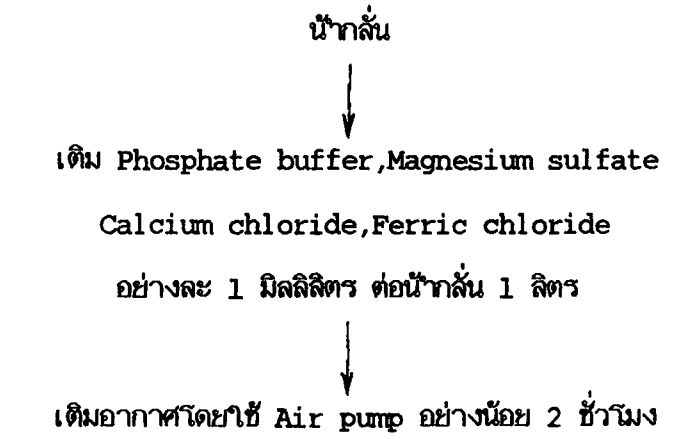
นำสารละลายมาตราฐานกลูโคสที่เตรียมตามวิธีใน ภาคผนวก ข มาวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธี Phenolic method นำค่า O.D.ที่ได้ไปเขียนกราฟ โดยให้ค่า O.D. เป็นแกนตั้ง และค่าความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสเป็นแกนนอน

3. การวิเคราะห์ปริมาณ Biochemical Oxigen Demand (BOD) ด้วยวิธี American Public Health Association method

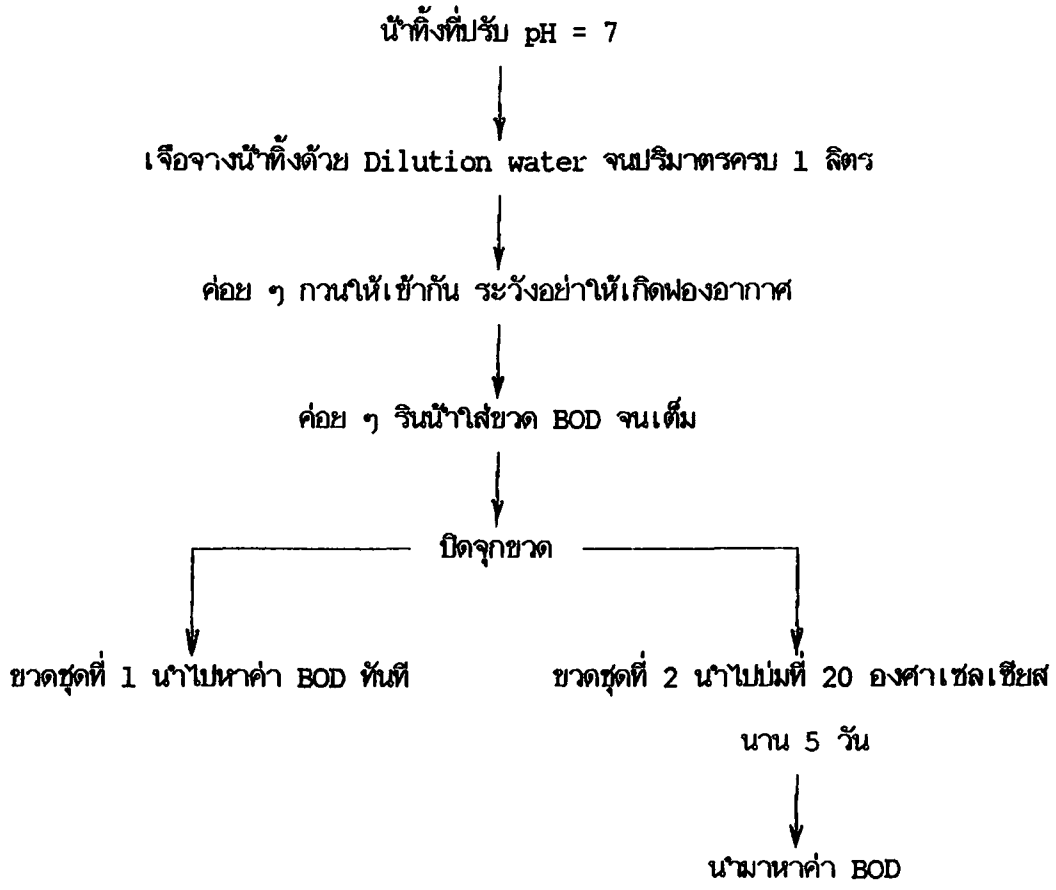
3.1 ปรับ pH ของน้ำทิ้ง



3.2 การเตรียม dilution water



3.3 การเตรียม Diluted sample



หมายเหตุ : การเตรียม Diluted sample ควรเตรียมอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น โดยเลือกเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างจากการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่า BOD อยู่ในช่วงที่กำหนด และเลือกความเข้มข้นที่สูงกว่าและต่ำกว่าซึ่งอยู่ติดกันอีก 2 ขั้นของตาราง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรู้ค่า BOD โดยประมาณก่อน ซึ่งอาจประมาณได้จากค่า COD

3.4 การหา Dissolved Oxygen

ตัวอย่างน้ำในขวด BOD ที่เตรียมไว้

↓

เติม $MnSO_4$ 2.0 มิลลิลิตร ขณะเติมให้ปลายปิเปตจมอยู่ในตัวอย่างน้ำ

↓

เติม A-I-A 2.0 มิลลิลิตร ขณะเติมให้ปลายปิเปตจมอยู่ในตัวอย่างน้ำ

↓

ปิดจุกขวด BOD

↓

คว่ำและหงายขวดสลับกันประมาณ 15 ครั้ง

↓

ตั้งทิ้งไว้จนได้น้ำใสส่วนบนประมาณ 100 มิลลิลิตร

↓

เติมกรด H_2SO_4 เข้มข้น 2.0 มิลลิลิตร ให้กรดไหลตามคอขวด

↓

ปิดจุกขวด BOD เขย่าจนตะกอนละลายหมด

↓

ตวงสารละลายที่ได้จากขวด BOD ปริมาตร 203 มิลลิลิตร

↓

ไตเตรตด้วยสารละลาย $Na_2S_2O_3$ 0.025 N. จนได้สีเหลืองอ่อน

↓

เติมน้ำแป้ง 3-4 หยด

↓

ไตเตรตด้วยสารละลาย $Na_2S_2O_3$ จนสีน้ำเงินหายไป ได้สารละลายใส

↓

จดปริมาตรสารละลาย $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ทั้งหมด

4. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี12 ใน Stationary flask liqour และ Stationary liqour ใช้วิธี Turbidimetric Method of Microbiological Assay โดยเชื้อ Lactobacillus leichmannii เป็น Test organism ใน Vitamin B_{12} assay medium ของ merck & Co;Ltd. ซึ่งมีเฉพาะสารที่จำเป็นต่อการเจริญแต่ไม่มีวิตามินบี 12

4.1 การเตรียม Sample assay tube

ปิเปตตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ลงใน Test tube

↓

เติม Buffer cyanide solution 1.0 มิลลิลิตร เขย่าด้วย Cyclo mixer

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

↓

Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

เก็บ Supernatant ไว้

↓

เจือจาง Supernatant ด้วย

น้ำกลั่น duuble distillation 10^0,10^{-1},10^{-2} และ 10^{-3}

↓

ปิเปต supernatant ที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้น

ปริมาตร 0.2, 0.5 และ 1.0 ใส่หลอด assay tube ปริมาตรละ 3 หลอด

↓

เติมน้ำกลั่น Double distillation ให้มีปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตรทุกหลอด

↓

เติม Double strength assay medium หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร

เติม Double strength assay medium หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร

(ปริมาตรรวมเป็น 3 มิลลิลิตรทุกหลอด)

↓

เขย่าด้วย cyclo mixer

↓

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส

ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

(ทำการฆ่าเชื้อพร้อมกับ Working vitamin B_{12} assay tube)

↓

ทิ้งให้เย็น

↓

หยด Suspension ของเชื้อ L. leichmannii

ด้วย Micropipette

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

↓

วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

หมายเหตุ :

1. การหยด Suspension เชื้อ L. leichmannii ให้หยดเพียง 2 หลอด อีก 1 หลอดที่เหลือใช้เป็น Blank สำหรับวัดค่าความขุ่นของเชื้อ

2. เนื่องจากวิตามินบี 12 ที่เชื้อสร้างขึ้นอยู่ภายในเซล จึงต้องทำการ Break cell ด้วยการนำไปนึ่งที่ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที cobalamin ที่เซลปล่อยออกมาจะทำปฏิกิริยากับ Buffer cyanide solution กลายเป็น cyanocobalamin อยู่ใน Supernatant

4.2 การเตรียม Working vitamin B_{12} assay tube

ปิเปต Standard stock solution vitamin B_{12}

ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

↓

เจือจางเป็น 100 เท่าด้วยน้ำกลั่น Double distillation

โดยใช้ volumetric flask 50 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร เติม KCN 0.05 % ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

↓

เจือจางด้วยน้ำกลั่น Double distillation จนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

จะได้ Standard solution vitamin B_{12} เข้มข้น $5 * 10^{-5}$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

↓

ปิเปต Standard solution vitamin B_{12}

0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด assay tube

ปริมาตรละ 3 หลอด

↓

เติมน้ำกลั่น Double distilltion ให้มีปริมาตรครบ 1.5 มิลลิลิตรทุกหลอด

↓

เติม Double strength assay medium 1.5 มิลลิลิตร

(ปริมาตรรวมเป็น 3 มิลลิลิตรทุกหลอด)

↓

เขย่าโดยใช้ cyclo-mixer

↓

นำไปนึ่งเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

(ทำการฆ่าเชื้อพร้อมกับ Sample assay tube)

↓

ทิ้งให้เย็น

ทิ้งให้เย็น

↓

หยด suspension ของเชื้อ L. leichmannii ด้วย Micropipette

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง

↓

วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

หมายเหตุ : ในการ assay หาวิตามินบี 12 ต้องทำ working vitamin B_{12} ทุกครั้ง เพราะสภาพการนึ่งฆ่าเชื้อ และอุหณภูมิที่บ่มมีอิทธิพลต่อการอ่านค่าจาก calibration curve

4.3 การเตรียม suspension ของเชื้อ L. liechmannii

ถ่ายเชื้อ L. liechmannii จาก stock culture

ลงใน tomato-juice agar แบบ stab

(โดยต้องทำการต่อเชื้อทุกวัน เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพ active)

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อ L. leichmannii ที่อยู่ในสภาพ active แล้ว

ลงใน micro-inoculum broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

วัดค่าความขุ่นของเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ให้ได้ O.D. = 0.5 เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำ suspension

(ถ้าค่า O.D. เกิน 0.5 ให้เจือจางด้วย micro-inoculum broth)

วัดค่าความขุ่นของเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

ให้ได้ O.D. = 0.5

↓

ปิเปตใส่หลอด centrifuge 5 มิลลิลิตร

นำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

↓

ปิเปตเอาส่วนที่เป็นน้ำออก เก็บตะกอนเซลไว้

↓

ล้างตะกอนเซลเพื่อไม่ให้มีวิตามินบี 12 เหลืออยู่

โดยใช้ single strength assay midium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

↓

ทำการเขย่าด้วย cyclo-mixer

↓

นำไปเหวี่ยงปั่นที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

ทำเช่นเดิม 3-4 ครั้ง

↓

ครั้งสุดท้ายถ่ายเซลลงใน single strength assay midium

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเขย่าด้วย cyclo-mixer

↓

เจือจาง suspension ที่ได้ ให้เป็น 1:1000

ด้วย doudle strength assay midium ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

↓

Inoculum cell suspension

(suspension ที่จะใช้หยดใน sample assay tube

กับ working vitamin B_{12} assay tube)

หมายเหตุ : การเตรียม suspension ของเชื้อ L. leichmannii ทุกขั้นตอน ต้องทำแบบ aceptic technics

ภาคผนวก ง : การวิเคราะห์ผล

1. การคำนวณผล Total carbohydrate ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ ซี.พี.

X = ความเข้มข้นกลูโคสจาก Standard curve (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

น้ำทิ้ง 1.0 มิลลิลิตร มีปริมาณกลูโคส $X * 10^{-6}$ กรัม

น้ำทิ้ง 100.0 มิลลิลิตร มีปริมาณกลูโคส $X * 10^{-4}$ * dilution factor กรัม

ดังนั้น % Total carbohydrate = $X * 10^{-4}$ * dilution factor

2. การคำนวณหาปริมาณ Crude protein ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ ซี.พี.

2.1 การคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของ H_2SO_4 0.1 N.

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

ความเข้มข้นของ H_2SO_4 * ปริมาณ H_2SO_4 ที่ใช้ไป = $\frac{\text{น้ำหนักของ } Na_2CO_3 * 50 * 50}{\text{น้ำหนักสมมูล } Na_2CO_3 * 1000}$

2.2 การหาปริมาณโปรตีน

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

$$\% \text{ Protein} = \% N * 6.25$$

A = ปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรตสารตัวอย่าง

B = ปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรต Blank

C = ความเข้มข้นของ H_2SO_4 (N.)

3. การคำนวณค่า Suspended solid

$$\text{suspended solid(mg/l)} = \frac{(B-A) * 1000}{V}$$

A = น้ำหนักกระดาษกรอง

B = น้ำหนักกระดาษกรองและตะกอน

V = ปริมาตรน้ำตัวอย่าง

4. การคำนวณหาค่า BOD ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

4.1 กรณีไม่เติมเชื้อ

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

4.2 กรณีเติมเชื้อ

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

เมื่อ D_1 = D_O ของตัวอย่างที่ทำการเจือจาง ของวันที่ 0

D_2 = D_O ของตัวอย่างที่ทำการเจือจางและบ่มที่ 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

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

การพิจารณาผลเพื่อใช้ในการคำนวณค่า BOD

ผลที่น่าเชื่อถือ และจะใช้ในการคำนวณต่อไปนั้น จะต้องมีค่าปริมาณ DO เหลืออยู่อย่างน้อย 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และจะต้องมีการลดปริมาณ DO ลงไปอย่างน้อย 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้ค่า BOD ที่คำนวณออกมาได้นั้นถูกต้องที่สุด

ในกรณีที่มีค่าปริมาณ DO อยู่ในเกณฑ์ดังกล่าวมากกว่า 1 ค่า ให้เลือกค่า DO ที่อยู่ในช่วง % mixture ที่สูงที่สุด

5. การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12

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

ปริมาณวิตามินบี12 = ค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินบี12(10^{-5}ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) * ความเจือจาง (10^{-5}ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) / ปริมาตรของตัวอย่าง

ภาคผนวก จ : ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii เมื่อใช้Inoculum size 2.0 % และ 5.0 % ใน Complete medium pH = 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ Stationary flask (Inicial cell O.D.=0.490)

ชั่วโมงที่	Inoculum size 2.0 %				Inoculum size 5.0 %			
	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย	ครั้งที่1	ครั้งที่2	ครั้งที่3	เฉลี่ย
12	0.030	0.032	0.027	0.030	0.076	0.070	0.077	0.074
24	0.286	0.299	0.295	0.293	0.305	0.304	0.303	0.304
36	0.467	0.510	0.520	0.499	0.483	0.519	0.521	0.508
48	0.647	0.642	0.664	0.651	0.617	0.603	0.622	0.614
60	0.652	0.644	0.661	0.653	0.636	0.620	0.647	0.634
72	0.680	0.691	0.711	0.694	0.668	0.663	0.622	0.664
84	0.714	0.715	0.714	0.714	0.702	0.693	0.697	0.697
96	0.722	0.743	0.732	0.732	0.712	0.704	0.710	0.709
108	0.722	0.736	0.719	0.726	0.695	0.704	0.677	0.692
120	0.720	0.745	0.715	0.727	0.704	0.710	0.691	0.701
132	0.720	0.722	0.724	0.722	0.727	0.706	0.730	0.721
144	0.707	0.720	0.694	0.707	0.725	0.714	0.729	0.722
156	0.701	0.706	0.690	0.699	0.725	0.693	0.718	0.712
168	0.704	0.696	0.661	0.687	0.697	0.621	0.714	0.677

ตารางที่ จ.2 แสดงผลระหว่างค่าความขุ่น (O.D.) และน้ำหนักแห้ง (dry weight cell) ของเชื้อ Prop. fruedenreichii ใน Complete medium pH = 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะ stationary flask ชั่วโมงที่ 96 (Inicial cell O.D.=0.485)

ความเจือจาง	น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)			ค่า O.D. ที่ 660 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1 : 5	0.210	0.150	0.180	0.177	0.168	0.173
1 : 3	0.370	0.310	0.340	0.308	0.318	0.313
1 : 1	0.520	0.730	0.630	0.600	0.642	0.621
1 : 0	1.290	0.990	1.140	1.014	0.993	1.004

ตารางที่ จ.3 แสดงผลค่า pH ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

ครั้งที่	pH
1	7.364
2	7.300
3	7.298
เฉลี่ย	7.321

ตารางที่ จ.4 แสดงผลน้ำหนักของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ (กรัมต่อมิลลิลิตร)

ครั้งที่	ก่อนต้ม	หลังต้ม
1	1.0714	1.0113
2	1.0600	1.0052
3	1.0355	1.0069
4	1.0643	1.0060
5	1.0355	1.0080
เฉลี่ย	1.0533	1.0075

ตารางที่ จ.5 แสดงผลค่า Suspended solid ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

ครั้งที่	น้ำหนักกระดาษกรองและตะกอน(กรัม)	น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)	น้ำหนักตะกอน (กรัม)	suspension solid(mg/l)
1	0.190	0.090	0.100	4000.00
2	0.235	0.090	0.145	5800.00
3	0.213	0.087	0.126	5040.00
เฉลี่ย				4946.67

ตารางที่ จ.6 แสดงผลการวิเคราะห์ Total carbohydrate ของสารละลายมาตราฐานกลูโคส โดย Phenolic method

ความเข้มข้นสารละลายกลูโคส (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ค่า O.D.ที่ 488 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
0.0	0.000	0.000	0.000
20.0	0.077	0.088	0.083
40.0	0.274	0.233	0.254
60.0	0.332	0.264	0.298
80.0	0.535	0.512	0.524
100.0	0.590	0.583	0.587

ตารางที่ จ.7 แสดงผลการวิเคราะห์ Total carbohydrate ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ โดย Phenolic method

ความเจือจาง	ค่า O.D. ที่ 488 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
1 : 100	0.019	0.007	0.013
1 : 10	0.128	0.114	0.121
1 : 0	1.272	1.084	1.178

ตารางที่ จ.8 แสดงผลปริมาณกรด H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรด เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ crude protein ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ โดยวิธี Semi-Micro Kjiedahl Method

ชุดที่	ปริมาตรกรด H_2SO_4 ที่ใช้ไตเตรด(มิลลิลิตร)				Crude Protein (%)
	Blank	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย	
1	0.00	0.40	0.50	0.45	0.39
2	0.00	0.40	0.40	0.40	0.35
เฉลี่ย					0.37

ตารางที่ จ.9 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Glucose และ Yeast extract ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฟาไก่ เปรียบเทียบกับ Complete medium สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Initial cell O.D.=0.494)

ชั่วโมงที่	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	Complete medium	น้ำทิ้งไก่	น้ำทิ้งไก่ + Glu. 1.0%	น้ำทิ้งไก่ + Yeast. 0.5%	น้ำทิ้งไก่ + Glu. 1.0% + Yeast. 0.5%
24	0.205	0.188	1.652	0.295	2.016
48	0.272	0.255	1.845	0.411	2.144
72	0.365	0.310	1.921	0.539	2.155
96	0.410	0.481	1.933	0.679	2.166
120	0.405	0.472	1.929	0.675	2.162
144	0.399	0.470	1.626	0.664	2.159

หมายเหตุ : Glu. หมายถึง Glucose

Yeast. หมายถึง Yeast extract

ตารางที่ จ.10 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Glucose ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฟ่าไก่ที่เติม Yeast extract 0.5 % ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Initial cell O.D.=0.486)

ชั่วโมงที่	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร							
	Glu. 0.5%	Glu. 1.0%	Glu. 1.5%	Glu. 2.0%	Glu. 2.5%	Glu. 3.0%	Glu. 3.5%	Glu. 4.0%
48	1.793	1.835	1.928	1.943	1.921	1.711	1.709	1.725
72	1.798	1.841	1.933	1.945	1.923	1.724	1.726	1.731
96	1.821	1.842	1.941	1.950	1.929	1.725	1.725	1.733
120	1.821	1.834	1.941	1.938	1.919	1.714	1.711	1.720
144	1.775	1.782	1.914	1.891	1.908	1.703	1.697	1.680

หมายเหตุ : Glu. หมายถึง Glucose

ตารางที่ จ.11 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Yeast extract ในปริมาณต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Glucose 1.0 % ในสภาวะ sationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (initial cell O.D.=0.494)

ชั่วโมงที่	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร							
	Yeast. 0.5%	Yeast. 1.0%	Yeast. 1.5%	Yeast. 2.0%	Yeast. 2.5%	Yeast. 3.0%	Yeast. 3.5%	Yeast. 4.0%
48	1.893	1.895	2.023	2.075	2.040	2.038	1.899	1.995
72	1.919	1.936	2.070	2.109	2.096	2.084	1.991	2.104
96	1.937	1.945	2.091	2.125	2.115	2.113	2.017	2.116
120	1.916	1.949	2.094	2.124	2.118	2.115	2.021	2.119
144	1.909	1.944	2.087	2.118	2.113	2.110	2.010	2.111

หมายเหตุ : Yeast. หมายถึง Yeast extract

ตารางที่ จ.12 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในแต่ละสภาวะที่ทำการศึกษา ในสภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Initial cell O.D.=0.497)

ชั่วโมงที่	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร			
	Complete medium	น้ำทิ้งไก่	น้ำทิ้งไก่ + Glu. 1.0% + Yeast. 0.5%	น้ำทิ้งไก่ + Glu. 1.5% + Yeast. 2.0%
48	0.792	0.782	1.292	1.687
72	0.871	0.902	1.549	1.802
96	0.890	0.950	1.669	1.907
120	0.890	0.923	1.670	1.894
144	0.888	0.908	1.666	1.843

หมายเหตุ : Glu. หมายถึง Glucose

Yeast. หมายถึง Yeast extract

ตารางที่ จ.13 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Cobalt ในปริมาณต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Glucose 1.5 % และ Yeast extract 2.0 % ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Initial cell O.D.=0.494)

ชั่วโมงที่	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร							
	Cobalt 4 mg/l	Cobalt 6 mg/l	Cobalt 8 mg/l	Cobalt 10mg/l	Cobalt 12mg/l	Cobalt 14mg/l	Cobalt 16mg/l	Cobalt 20mg/l
48	1.545	1.705	1.539	1.473	1.515	1.632	1.650	1.439
72	1.693	1.780	1.695	1.632	1.696	1.737	1.745	1.672
96	1.804	1.872	1.781	1.764	1.815	1.830	1.850	1.747
120	1.820	1.885	1.813	1.810	1.810	1.861	1.843	1.784
144	1.814	1.869	1.811	1.801	1.807	1.858	1.845	1.782

ตารางที่ จ.14 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของ Methionine และ Riboflavin ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii และปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติม Glucose 1.5 % ,Yeast extract 2.0 % และ Cobalt 6 mg/l ในสภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส(Initial cell O.D.=0.502)

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	น้ำทิ้ง	น้ำทิ้ง + Glu.+Yeast. +Co.	น้ำทิ้ง + Glu.+Yeast. +Co.+Met.	น้ำทิ้ง + Glu.+Yeast. +Co.+Ribo.	น้ำทิ้ง+Glu. +Yeast.+Co. +Met.+Ribo.
48	1.150	1.481	1.461	1.487	1.525
72	1.296	1.606	1.613	1.608	1.623
96	1.310	1.652	1.665	1.638	1.659
120	1.252	1.664	1.680	1.643	1.655

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

Glu. หมายถึง Glucose

Yeast. หมายถึง Yeast extract

Co. หมายถึง Cobalt

Met. หมายถึง Methionine

Ribo. หมายถึง Riboflavin

ตารางที่ จ.15 แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของ vitamin B_{12} working standard ของสภาวะที่ทำการศึกษาเมื่อเติม Methionine และ Riboflavin ณ ชั่วโมงต่าง ๆ

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ($\times 10^{-5}$ ไมโครกรัม/tube)	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 144
0.0	0.18	0.17	0.22	0.37	-
0.5	0.35	0.31	0.33	0.41	-
1.0	0.43	0.51	0.52	0.51	-
2.0	0.69	0.62	0.69	0.74	-
3.0	0.77	0.78	0.73	0.80	-
4.0	0.89	0.87	0.87	0.93	-
5.0	0.93	1.10	0.96	1.09	-

หมายเหตุ : ชั่วโมงที่ 144 ไม่ได้ทำการ assay vitamin B_{12}

ตารางที่ จ.16 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามิน บี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารกับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 48

อาหารที่ใช้	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
น้ำทิ้ง	1.52	1.59	1.70	1.56	1.71	1.75	1.65	1.98	2.03	1.99	2.10	2.35
น้ำทิ้ง+สารอาหาร	1.65	1.72	1.73	1.63	1.77	1.76	1.75	1.75	2.13	2.22	2.18	2.37
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Met.	1.54	1.65	1.72	1.60	1.84	1.88	1.70	1.92	1.99	2.03	2.03	2.20
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Ri.	1.75	1.78	1.84	1.68	1.67	1.78	1.77	1.84	1.98	1.97	2.14	2.26
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ Met.+Ri.	1.74	1.76	1.81	1.72	1.72	1.75	1.73	1.73	1.96	2.13	2.16	2.15

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l

Met. หมายถึง Methionine 2 mg/100 ml

Ri. หมายถึง Riboflavin 0.01 mg/100 ml

ตารางที่ จ.17 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามิน บี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารกับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 °C ณ ชั่วโมงที่ 72

อาหารที่ใช้	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
น้ำทิ้ง	1.55	1.59	1.65	1.58	1.61	1.68	1.63	1.70	1.70	1.63	1.78	1.84
น้ำทิ้ง+สารอาหาร	1.70	1.72	1.80	1.79	1.88	1.98	2.04	2.15	2.20	2.54	2.93	2.96
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Met.	1.52	1.62	1.65	1.49	1.58	1.74	1.65	2.06	2.14	2.15	2.43	2.56
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Ri.	1.50	1.51	1.63	1.50	1.55	1.68	1.51	1.70	1.90	2.19	2.61	2.66
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ Met.+Ri.	1.53	1.54	1.60	1.52	1.67	1.68	1.68	1.72	1.92	2.23	3.00	3.00

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l

Met. หมายถึง Methionine 2 mg/100 ml

Ri. หมายถึง Riboflavin 0.01 mg/100 ml

ตารางที่ จ.18 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามิน บี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารกับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 96

อาหารที่ใช้	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
น้ำทิ้ง	1.42	1.45	1.49	1.93	2.09	2.01	1.72	1.82	1.91	2.18	2.32	2.52
น้ำทิ้ง+สารอาหาร	1.59	1.77	2.14	1.89	1.86	2.03	1.78	2.18	2.40	2.53	3.02	2.74
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Met.	1.94	1.87	1.87	1.77	1.87	1.86	1.75	1.83	2.16	2.54	2.72	3.09
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Ri.	1.42	1.45	1.49	1.93	2.09	2.01	1.72	1.82	1.91	2.18	2.32	2.52
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ Met.+Ri.	1.74	1.71	2.03	1.90	2.00	2.04	1.92	2.04	2.37	2.59	2.93	3.41

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l

Met. หมายถึง Methionine 2 mg/100 ml

Ri. หมายถึง Riboflavin 0.01 mg/100 ml

ตารางที่ จ.19 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามิน บี 12 ในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารกับ Methionine และ Riboflavin สภาวะ Stationary flask อุณหภูมิ 30 ^{o}C ณ ชั่วโมงที่ 120

อาหารที่ใช้	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
น้ำทิ้ง	0.82	1.03	1.09	0.88	1.05	1.05	1.16	1.37	1.40	1.48	1.80	2.12
น้ำทิ้ง+สารอาหาร	0.89	0.95	1.26	1.38	1.67	1.87	1.89	2.10	2.56	2.27	2.60	2.58
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Met.	0.98	1.01	1.00	1.15	1.25	1.40	1.19	1.58	1.63	2.50	2.70	2.90
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ +Ri.	0.81	0.76	0.89	0.96	0.93	1.17	1.51	1.79	1.78	2.79	2.69	2.81
น้ำทิ้ง+สารอาหาร+ Met.+Ri.	0.85	0.83	0.92	1.16	1.41	1.56	1.28	1.65	2.17	2.70	3.17	2.91

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l

Met. หมายถึง Methionine 2 mg/100 ml

Ri. หมายถึง Riboflavin 0.01 mg/100 ml

ตารางที่ จ.20 แสดงผลการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ Prop. freudenreichii ใน Complete medium กับ น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Initial cell O.D.=0.494)

ชั่วโมงที่	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร			
	Complete medium (Stationary)	Complete medium (Fermentation)	น้ำทิ้ง + สารอาหารต่าง ๆ (Stationary)	น้ำทิ้ง + สารอาหารต่าง ๆ (Fermentation)
48	0.958	0.921	2.200	2.150
72	0.978	0.928	2.350	2.300
96	0.984	0.932	2.500	2.400
120	0.940	0.918	2.400	2.250
144	0.912	0.910	2.300	2.200

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง + สารอาหารต่าง ๆ หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5 % + Yeast extract 2.0 % + Cobalt 6 mg/l + Methionine 2 mg/100 ml + Riboflavin 0.01 mg/100 ml

ตารางที่ จ.21 แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของ vitamin B_{12} working standard ของ Complete medium ณ ชั่วโมงต่าง ๆ

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ($x\ 10^{-5}$ ไมโครกรัม/tube)	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 144
0.0	0.25	0.28	0.20	0.31	0.34
0.5	0.42	0.50	0.41	0.48	0.52
1.0	0.55	0.65	0.47	0.58	0.59
2.0	0.66	0.81	0.60	0.64	0.65
3.0	0.75	0.87	0.68	0.72	0.78
4.0	0.93	0.95	0.81	0.81	0.87
5.0	1.01	1.04	0.88	0.90	0.93

ตารางที่ จ.22 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 48

Complete medium	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.42	0.48	0.59	0.49	0.64	0.63	0.55	0.67	0.74	0.70	0.88	1.01
Ferment.	0.35	0.44	0.56	0.42	0.52	0.58	0.46	0.55	0.57	0.69	0.84	1.05

หมายเหตุ : Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.23 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 72

Complete medium	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.50	0.69	0.71	0.56	0.62	0.77	0.66	0.76	0.81	0.88	0.96	1.09
Ferment.	0.49	0.64	0.72	0.48	0.59	0.72	0.54	0.66	0.75	0.89	1.00	1.04

หมายเหตุ : Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.24 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 96

Complete medium	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.44	0.51	0.62	0.55	0.61	0.68	0.64	0.76	0.83	0.87	1.06	1.20
Ferment.	0.49	0.65	0.68	0.58	0.64	0.69	0.67	0.79	0.82	0.94	1.07	1.17

หมายเหตุ : Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.25 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 120

Complete medium	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.29	0.39	0.46	0.35	0.42	0.47	0.42	0.46	0.50	0.46	0.51	0.62
Ferment.	0.24	0.29	0.31	0.29	0.38	0.44	0.34	0.44	0.48	0.43	0.51	0.62

หมายเหตุ : Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.26 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามิน บี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 144

Complete medium	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.24	0.28	0.29	0.28	0.30	0.34	0.34	0.39	0.44	0.53	0.60	0.66
Ferment.	0.24	0.25	0.29	0.30	0.30	0.36	0.35	0.41	0.42	0.50	0.55	0.63

หมายเหตุ : Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.27 แสดงผลค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรของ vitamin B_{12} working standard ของน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ณ ชั่วโมงต่าง ๆ

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ($\times 10^{-5}$ ไมโครกรัม/tube)	ค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร				
	ชั่วโมงที่ 48	ชั่วโมงที่ 72	ชั่วโมงที่ 96	ชั่วโมงที่ 120	ชั่วโมงที่ 144
0.0	0.28	0.36	0.26	0.21	0.35
0.5	0.44	0.55	0.37	0.36	0.38
1.0	0.49	0.69	0.47	0.56	0.42
2.0	0.68	0.79	0.64	0.69	0.63
3.0	0.84	0.82	0.83	0.83	0.67
4.0	0.89	0.93	1.01	0.91	0.85
5.0	1.03	0.98	1.07	1.04	0.96

ตารางที่ จ.28 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามิน บี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 48

น้ำทิ้ง+สารอาหาร	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.58	0.60	0.62	0.66	0.68	0.81	0.89	1.07	1.15	1.21	1.30	1.34
Ferment.	0.50	0.52	0.66	0.57	0.64	0.72	0.85	1.09	1.14	1.17	1.26	1.34

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l + Methionine 2 mg/100 ml + Riboflavin 0.01 mg/100 ml

Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.29 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 72

น้ำทิ้ง+สารอาหาร	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.50	0.53	0.68	0.50	0.64	0.74	0.86	1.04	1.14	1.24	1.33	1.35
Ferment.	0.37	0.48	0.49	0.54	0.61	0.74	0.84	1.01	1.12	1.21	1.30	1.32

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l + Methionine 2 mg/100 ml + Riboflavin 0.01 mg/100 ml

Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.30 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 96

น้ำทิ้ง+สารอาหาร	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.62	0.65	0.67	0.68	0.75	0.79	0.90	1.03	1.11	1.23	1.31	1.33
Ferment.	0.62	0.62	0.68	0.68	0.74	0.80	0.93	0.98	1.08	1.18	1.33	1.35

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l + Methionine 2 mg/100 ml + Riboflavin 0.01 mg/100 ml

Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.31 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 120

น้ำทิ้ง+สารอาหาร	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.68	0.68	0.72	0.73	0.79	0.86	0.92	1.07	1.13	1.22	1.31	1.34
Ferment.	0.66	0.71	0.73	0.74	0.82	0.85	0.92	1.06	1.11	1.18	1.28	1.30

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l + Methionine 2 mg/100 ml + Riboflavin 0.01 mg/100 ml

Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.32 แสดงผลค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ตามปริมาณที่ได้ศึกษา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 144

น้ำทิ้ง+สารอาหาร	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร											
	Dilution 10^{-3}			Dilution 10^{-2}			Dilution 10^{-1}			Dilution 10^{0}		
	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0	0.2	0.5	1.0
Station.	0.62	0.66	0.67	0.65	0.74	0.77	0.90	0.99	1.17	1.15	1.20	1.28
Ferment.	0.62	0.63	0.67	0.65	0.71	0.76	0.87	1.00	1.06	1.17	1.21	1.29

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง+สารอาหาร หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ + Glucose 1.5% + Yeast extract 2.0% + Cobalt 6 mg/l + Methionine 2 mg/100 ml + Riboflavin 0.01 mg/100 ml

Station. หมายถึง Stationary flask

Ferment. หมายถึง Fermentation

ตารางที่ จ.33 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตโดยเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารกับ Methionine และ Riboflavin

ชั่วโมงที่	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)				
	น้ำทิ้ง	น้ำทิ้ง + Glu.+Yeast. +Co.	น้ำทิ้ง + Glu.+Yeast. +Co.+Met.	น้ำทิ้ง + Glu.+Yeast. +Co.+Ribo.	น้ำทิ้ง+Glu. +Yeast.+Co. +Met.+Ribo.
48	157.28	130.67	126.09	141.90	136.90
72	137.54	117.44	110.56	106.78	113.48
96	120.63	228.02	124.04	133.72	297.25
120	75.87	55.19	58.76	43.48	46.87

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

Glu. หมายถึง Glucose

Yeast. หมายถึง Yeast extract

Co. หมายถึง Cobalt

Met. หมายถึง Methionine

Ribo. หมายถึง Riboflavin

ตารางที่ จ.34 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ใน Complete medium ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation

Hr.	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)							
	Stationary flask				Fermentation			
	ค่า O.D. ที่ 660 nm	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/g)	ค่า O.D. ที่ 660 nm	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/g)
48	0.958	1.053	31.90	30.29	0.921	1.012	23.20	22.93
72	0.978	1.073	33.30	31.03	0.928	1.020	27.10	26.57
96	0.984	1.081	43.00	39.78	0.932	1.024	56.00	54.69
120	0.940	1.033	21.20	20.52	0.918	1.009	18.60	18.43
144	0.912	1.002	10.10	10.08	0.910	1.000	8.20	8.20

หมายเหตุ : Vit.B_{12} หมายถึง วิตามินบี 12

ตารางที่จ.35 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ในน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่างๆ ที่ได้ทำการศึกษามา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation

Hr.	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อลิตร)							
	Stationary flask				Fermentation			
	ค่า O.D. ที่ 660 nm	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/g)	ค่า O.D. ที่ 660 nm	น้ำหนักแห้ง (g/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/l)	ปริมาณ Vit.B_{12} (μg/g)
48	2.200	2.418	225.0	93.05	2.150	2.363	77.0	32.59
72	2.350	2.582	618.0	239.35	2.300	2.527	612.0	242.18
96	2.500	2.747	655.0	238.44	2.400	2.637	648.0	245.73
120	2.400	2.637	555.0	210.45	2.250	2.473	524.0	219.17
144	2.300	2.527	493.0	195.09	2.200	2.418	334.0	138.13

หมายเหตุ : Vit.B_{12} หมายถึง วิตามินบี 12

ตารางที่ จ.36 แสดงผลการเปรียบเทียบ ปริมาณวิตามินบี 12 ที่ผลิตโดยเชื้อ Prop. freudenreichii ใน Complete medium และ น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษามา ระหว่างสภาวะ Stationary flask กับ Fermentation

ชั่วโมงที่	ปริมาณวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			
	Complete medium		น้ำทิ้ง+สารอาหาร+Co.+Met.+Ribo.	
	Stationary	Fermentation	Stationary	Fermentation
48	30.29	22.93	93.05	32.59
72	31.03	26.57	239.35	242.18
96	39.78	54.69	238.44	245.73
120	20.52	18.43	210.45	219.17
144	10.08	8.20	195.09	138.13

หมายเหตุ : น้ำทิ้ง หมายถึง น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่

สารอาหาร หมายถึง Glucose + Yeast extract

Co. หมายถึง Cobalt

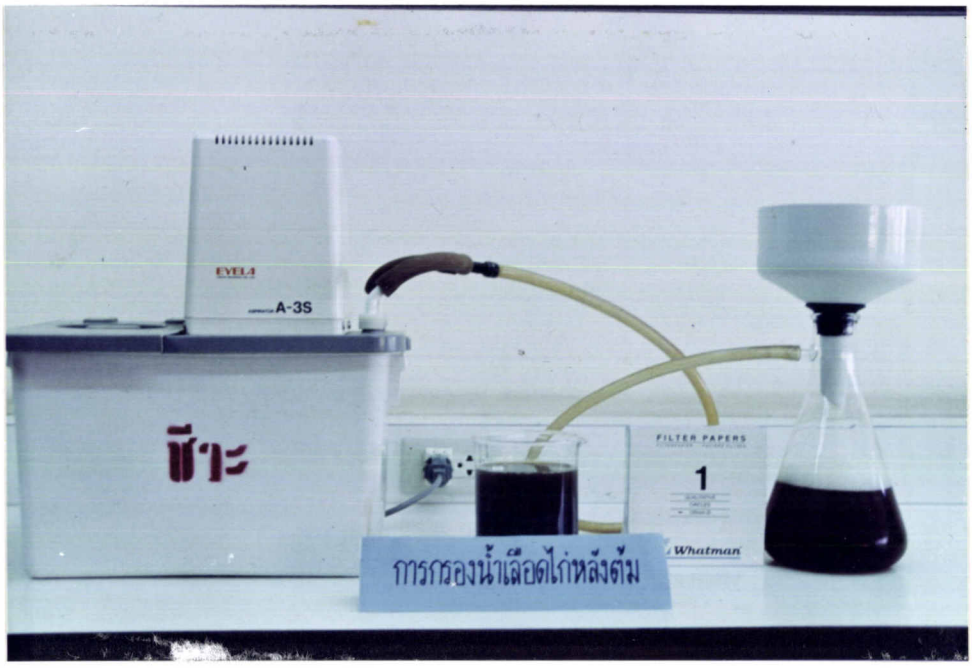
Met. หมายถึง Methionine

Ribo. หมายถึง Riboflavin

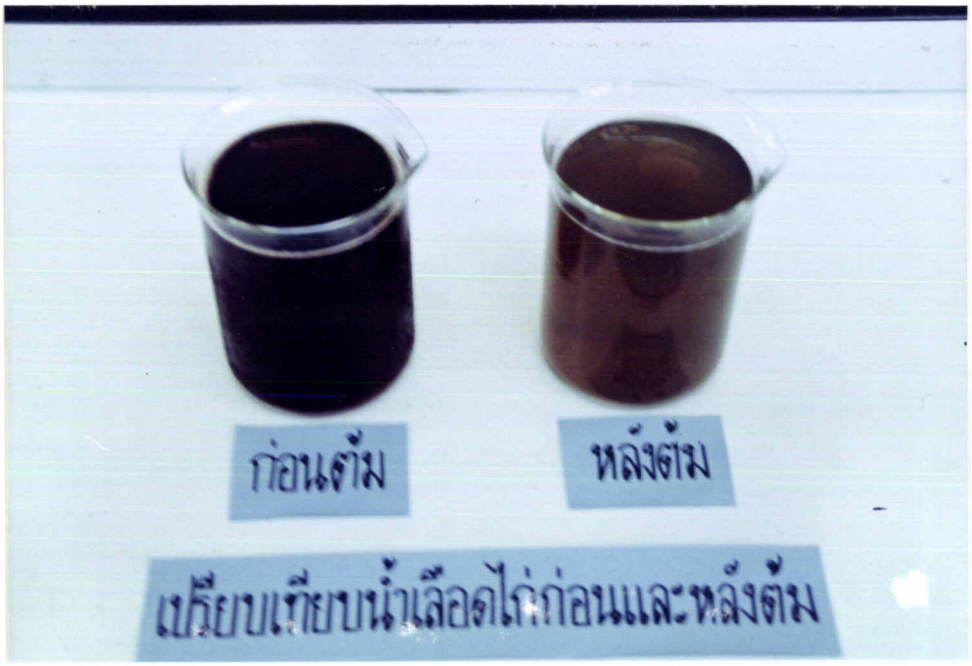
ตารางที่ จ.37 แสดงผลค่า BOD น้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ ในสภาวะต่าง ๆ ที่ทำการศึกษา

ชนิดของน้ำทิ้ง	BOD (มิลลิกรัม/ลิตร)
น้ำทิ้งไก่	29,400
น้ำทิ้งเติมสารอาหารต่างๆ ก่อนการ Ferment	87,300
น้ำทิ้งเติมสารอาหารต่างๆ หลังการ Ferment	9,764

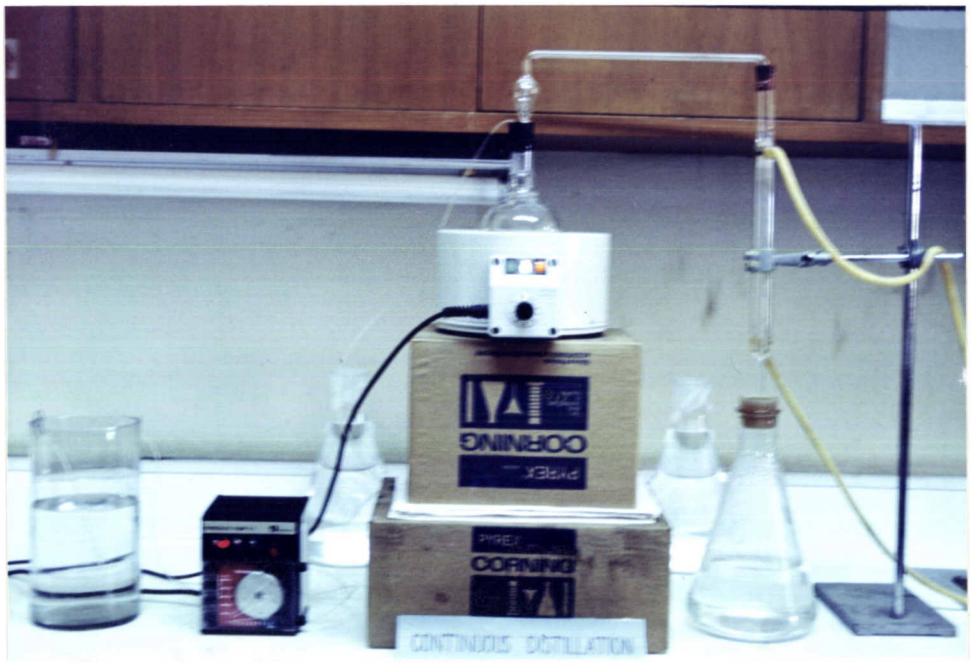
ภาคผนวก ฉ : รูปประกอบการทดลอง



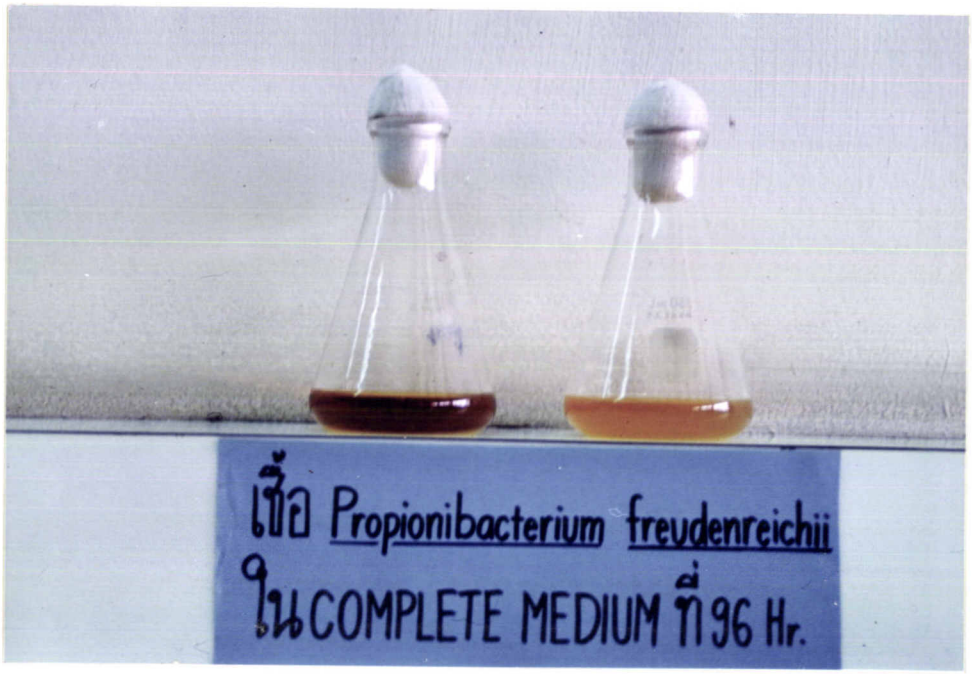
รูปที่ ฉ.1 แสดงการกรองน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่หลังการต้ม



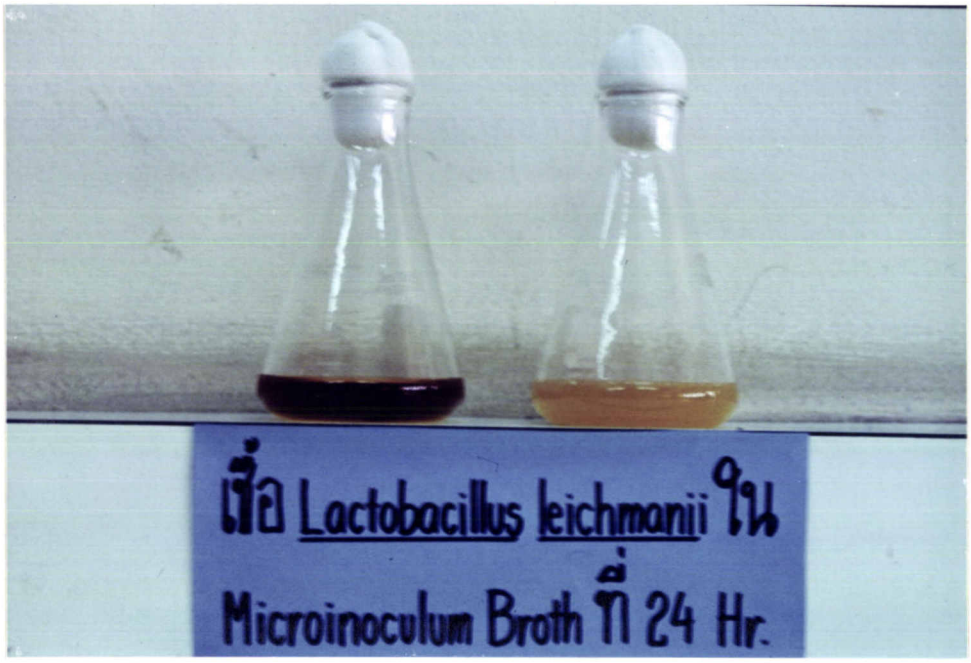
รูปที่ ฉ.2 เปรียบเทียบน้ำเลือดไก่ก่อนต้มและหลังต้ม



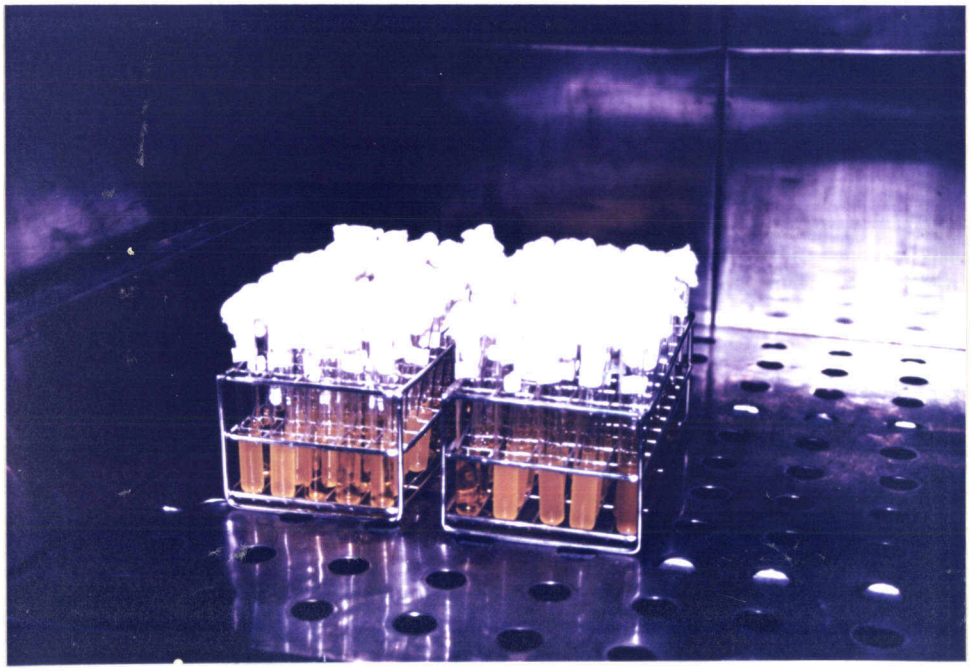
รูปที่ ฉ.3 แสดงการกลั่นน้ำกลั่น 2 ครั้งสำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12



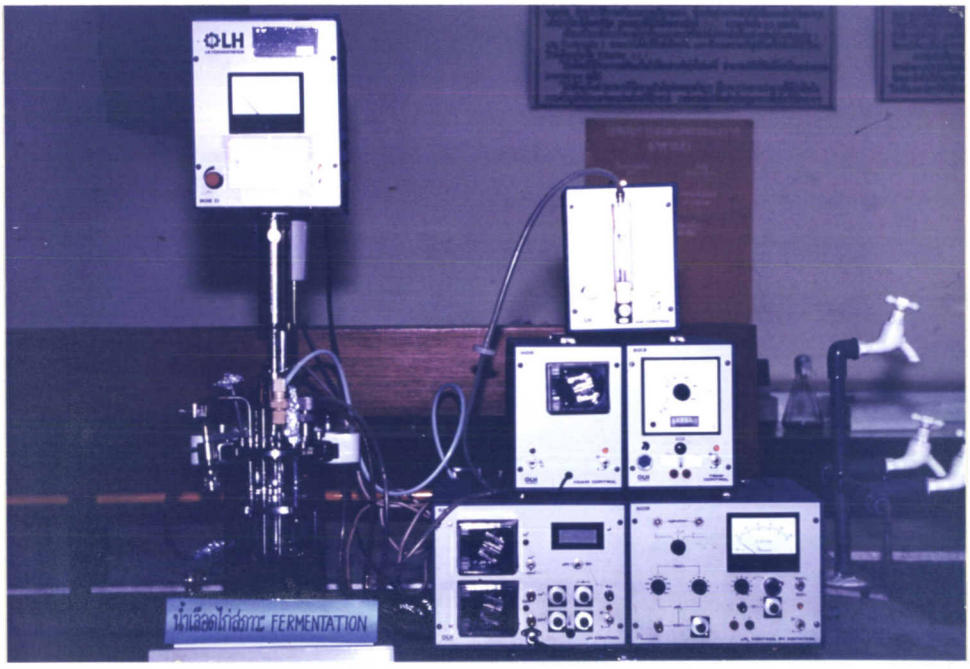
รูปที่ ฉ.4 แสดงเชื้อ Propionibacterium freudenreichii ใน complete medium สภาวะ stationary flask อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ 96 ชั่วโมง



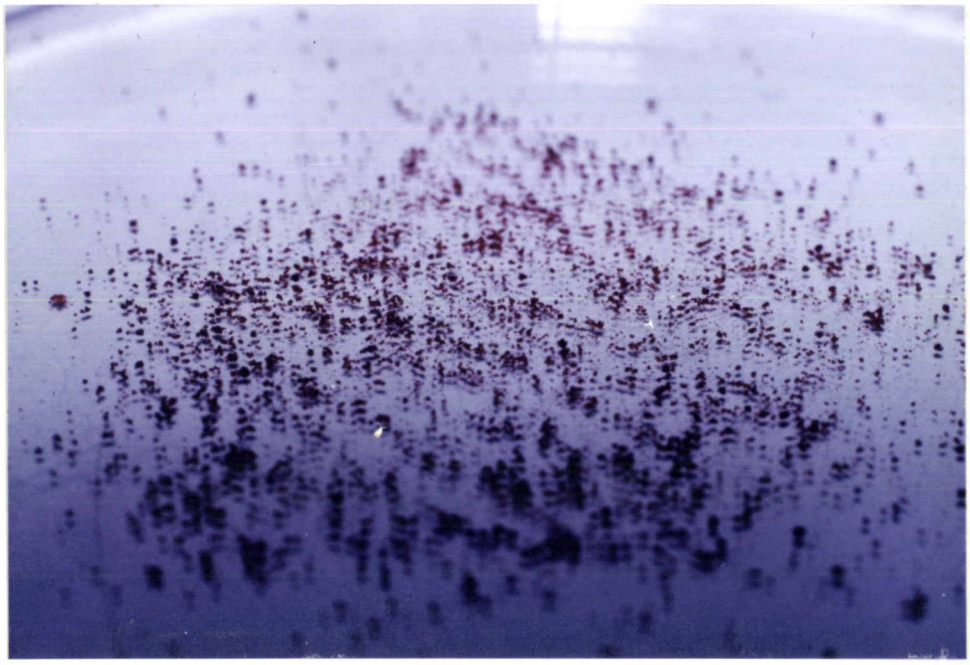
รูปที่ ฉ.5 แสดงเชื้อ Lactobacillus leichmannii ในอาหาร Microinoculum broth อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ ฉ.6 แสดง Sample assay tube เพื่อวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง



รูปที่ ฉ.7 แสดงการเลี้ยงเชื้อ Prop. freudenreichii ในน้ำทิ้งจากโรงงานฆ่าไก่ที่เติมสารตามที่ศึกษา ในสภาวะ Fermentation



รูปที่ ฉ.8 แสดงผลึกวิตามินบี 12

เอกสารอ้างอิง

1. ชลลวิชช์ ศิริชันธ์ วันวิสา ทวีแสง และเสาวนีย์ จิรธารานนท์. การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ Propionibacterium freudenreichii" โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2535.

2. พรพรรณ อภิรักษ์ติวงศ์. "การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii (ATCC 13673) โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2518.

3. พิณทิพย์ พุลนิกคา. "การคัดเลือกสายพันธุ์ Pseudomonas ssp. และการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12" วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยาบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2523.

4. บุษบา ยงสมิทธ์ ทอราชา เฟซูโอะ และยามาเน ทซูเนโอะ. "การผลิตวิตามินบี 12 โดยแบคทีเรียที่ใช้เมทธานอลเป็นวัตถุดิบ" รวบรวมเรื่องย่อสาขาพืช การประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยา ครั้งที่14 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2518.

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

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

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

8. โสภณ กิติสิน วุฒิศักดิ์ บุตรธน มณฑา นันทพันธ์ และประเทือง สง่าวงศ์. "การศึกษาพันธุ์ถั่วที่ต้านทานโรครัสต์" รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่13 โรงพิมพ์การศาสนา, 2518.

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

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

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

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

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

14. American Type Culture Collection. 1972, "The American Type Culture Collection Cattalogue of Strains", American type Culture Collection, Maryland.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

25. Committee of Rivision and Published by the Board of trustus. 1965, The Pharmacopeia of the United States of America, The United State Pharcopeial Convention, Inc. Washington D.C.

26. 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.

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

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

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

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

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

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

33. Hall, H.H.; R.G. Benedict; C.F. Wieson; C.E. Smith and R.W.Jacksons.1953."Vitamin B_{12} production by fermentation with Steptomyces olivaceus" Appl. Microbiol. 1: 124-129.

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

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

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

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

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

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

40. Hoogerheide, J.C. 1954, "Production of vitamin B_{12} by Agrobacterium radiobacter" U.S. Patent 2,798,840. July 9, 1957.

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

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

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

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

45. Lewis, J.C.; K. Ijichi; N.S. Snell and J.A. Garibaldi. 1949, "Fermentation process for production of vitamin B_{12}" U.S. Dept. Agr., Bur. Agr. and Ind. Chem., Mineographed 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.

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

47. Manothirawat, N. 1973,"Factor affecting vitamin B_{12} Production by Bacillus megaterium (ATCC 13639) in waste water" Bangkok; M.S. Thesis, Kasetsart University.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60. Osman, H.G. and M.S. Chhenouda. 68, "Biosynthesis of vitamin B_{12} by Propionibacterium shermanii II. The suitability of differrent carbon and nitrogen sources as wel as the effect of vitamins, purines and pyrimidines on the growth and vitamin B_{12} synthesis. J. chem. UAR. 11, 353-361. Abstract in Microbial. Abstracts section A Industrial Microbiology.

61. Osman H.G. and M.S. Cheneuda. 1968, "Biosynthesis of vitamin B_{12} by Propionibacterium shermanii III. Effect of some minerals, surface active agents and biochemical inhibitors on the biosynthesis of vitamin B_{12}" J. Chem. URA, 11, 363-371 (Nat. Res. centre cairo,URA) Abstract in Microbial. Abstract Secstion A Industrial Microbiology.

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

63. Peppler, H.J. 1967, Microbial Technology, Reinhold Publishing cororation.

64. 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.

65. Perlman, D. 1964, Metal organic compounds. Adv. Appl. Microbial. 4 : 108-112.

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

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

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

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

70. Renz, P. 1970, Riboflavin as precursor in the biosynthesis of the 5,6-dimethylbenzimidazole-moiety of vitamin B_{12} FEBS Letters. 6(3) : 187-189.

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

72. Rudy, H.; J. Rauch; K.R. Dietrich and C. Constabel. 1963, Citric acid mycelium. U.S. Patent 3,085,049 ; April 9, 1964. In : Noyes, R., 969, Vitamin B_{12} manufacture, Noyes Development Corp, New Jersey.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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