การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท

THE UTILIZATION OF WASTEWATER FROM SEAFOOD INDUSTRY FOR VITAMIN B_{12} PRODUCTION BY *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ENTRAPPED WITH CALCIUM ALGINATE

สุรีย์ ทองวณิชนิยม

SUREE THONGWANITNIYOM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-969-9

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท

THE UTILIZATION OF WASTEWATER FROM SEAFOOD INDUSTRY FOR VITAMIN B_{12} PRODUCTION BY *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ENTRAPPED WITH CALCIUM ALGINATE

T038537

สุรีย์ ทองวณิชนิยม

SUREE THONGWANITNIYOM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2543

ISBN 974-622-969-9

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 38537
วัน, เดือน, ปี- 5 ม.ค. 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE UTILIZATION OF WASTEWATER FROM SEAFOOD INDUSTRY FOR VITAMIN B_{12} PRODUCTION BY *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ENTRAPPED WITH CALCIUM ALGINATE

SUREE THONGWANITNIYOM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2000

ISBN 974-622-969-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2000

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท

THE UTILIZATION OF WASTEWATER FROM SEAFOOD INDUSTRY FOR VITAMIN B_{12} PRODUCTION BY *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ENTRAPPED WITH CALCIUM ALGINATE

ชื่อนักศึกษา นางสาวสุรีย์ ทองวณิชนิยม

รหัสประจำตัว 40065200

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชิต	
ผศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
ผศ.ดร.สุนีย์	นิธิสินประเสริฐ	
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 19 กันยายน 2543 **เวลา** 10.00 น. **เป็นต้นไป**

สถานที่สอบ ณ ห้อง 424 ห้องประชุม-สัมมนา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 30 **เดือน** กันยายน **พ.ศ.** 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ค่าบีโอดีของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลและน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมก่อนทำการหมักมีค่า 5,700 และ 37,250 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ หลังจากเสร็จสิ้นการหมักแล้วค่าบีโอดีลดลงเหลือ 3,440 และ 26,763 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนทสามารถลดค่าบีโอดีของน้ำทิ้งและน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมได้ถึง 39 และ 28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เพราะได้รับความเมตตากรุณาจาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ เป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษาและแนะนำแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง และ ผศ.ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย

ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอบพระคุณ คุณสมพร พุ่มจันทร์ สำหรับความช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอบคุณ คุณอนุรักษ์ ฟูเกษม และเพื่อนๆ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุก ๆ คนในครอบครัวที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ ปัจจัย กำลังใจ และความเสียสละแก่ผู้วิจัยตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุรีย์ ทองวณิชนิยม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.8 การผลิตวิตามินบี 12 โดยระบบตรึงเซลล์.....16

2.8.1 ความหมายและประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง.....16

2.8.2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของวิธีการตรึงเซลล์กับวิธีอื่น ๆ.....17

2.8.3 การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์.....18

2.8.4 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง.....18

2.8.5 วิธีการตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ.....19

2.8.6 แอลจิเนท.....21

2.8.7 การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในการอุตสาหกรรม.....22

2.9 วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12.....23

2.9.1 การวัดผลการทดสอบ.....24

2.9.2 ข้อแตกต่างบางประการของจุลินทรีย์ที่เป็นตัวทดสอบหาวิตามินบี 12.....24

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....26

3.1 จุลินทรีย์.....26

3.2 วัสดุเหลือใช้.....26

3.3 สารสำหรับตรึงเซลล์.....26

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์.....26

3.5 สารสำหรับเตรียมอาหารและเคมีภัณฑ์.....27

3.6 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....30

3.6.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....30

3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้ง.....30

3.6.3 การศึกษาหาอัตราการเจริญและประมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium.....36

3.6.4 การศึกษาหาแหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446.....37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6.5 การหาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเชื้อกับน้ำหนักเซลล์แห้ง.....40

3.6.6 การศึกษาวิธีการตรึง *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนท.....41

3.6.7 การเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่ากับระดับถังหมักแบบแบช.....42

3.6.8 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12.....43

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....47

4.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้ง.....47

4.2 ผลการศึกษาอัตราการเจริญและปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....47

4.2.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium เพื่อใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อ.....47

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในอาหาร complete medium.....50

4.3 ผลการศึกษาแหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....50

4.3.1 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารระหว่าง complete medium กับน้ำทิ้ง.....50

4.3.2 ผลการศึกษาหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม.....50

4.3.3 ผลการศึกษาหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม.....50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.4 ผลการศึกษาหาปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสม.....54
4.3.5 ผลการศึกษาหาปริมาณของแพนโททีนิกและไบโอตินที่เหมาะสม.....58
4.3.6 ผลการศึกษาหาปริมาณของวิตามินบี 2 ที่เหมาะสม.....58
4.3.7 ผลการศึกษาหาปริมาณของเมทธิโอนินที่เหมาะสม.....58
4.3.8 ผลการศึกษาหาปริมาณของไกลซีนที่เหมาะสม.....63
4.4 ผลการศึกษาหาอัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....63
4.5 ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่ากับระดับถังหมักแบบแบช.....66
4.5.1 ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 และการเจริญของเซลล์อิสระในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมัก.....66
4.5.2 ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมัก.....66
4.5.3 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสมในถังหมักแบบแบช.....70
4.6 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเหลือทิ้งที่ได้จากการวิจัย.....74

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม.....78

ภาคผนวก.....83

ภาคผนวก ก. 84

ภาคผนวก ข. 86

ภาคผนวก ค. 89

ภาคผนวก ง. 90

ภาคผนวก จ. 93

ประวัติผู้เขียน.....94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ปฏิกิริยาที่ต้องการเมทธิลโคบาลามินเป็นโคเอนไซม์.....6

2.2 ปฏิกิริยาที่ต้องการอะดีโนซิลโคบาลามินเป็นโคเอนไซม์.....7

2.3 การผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ.....9

2.4 วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12.....24

4.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้ง.....48

4.2 ผลการวิเคราะห์หาค่าบีโอดีของน้ำทิ้งที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ.....75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ส่วนประกอบหลักของโครงสร้างโคบาลามิน.....5
2.2 วิถีทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์วิตามินบี 12.....14
2.3 โครงสร้างสารสำคัญในเส้นทางการสร้างวิตามินบี 12.....15
2.4 รูปแบบการตรึงเซลล์จุลินทรีย์.....22
3.1 การผลิตวิตามินบี 12 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบแบช.....46
4.1 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium เพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อ ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....49
4.2 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium ที่มีปริมาณหัวเชื้อต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....51
4.3 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium , น้ำทิ้ง , น้ำทิ้งเติมแหล่งคาร์บอน และน้ำทิ้งเติมแหล่งไนโตรเจน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....52
4.4 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....53
4.5 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....55
4.6 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....56
4.7 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีชนิดของแหล่งแร่ธาตุต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....57
4.8 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีแหล่งแร่ธาตุครบ 5 ชนิด ความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....59
4.9 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีแพนโททีนิกและไบโอตินต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.10 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีแพนโททีนิกและไบโอตินความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....61

4.11 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณวิตามินบี 2 ความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....62

4.12 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณเมทธิโอนินความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า..... 64

4.13 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณไกลซีนความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....65

4.14 อัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า.....67

4.15 การผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า และถังหมักแบบแบช 68

4.16 อัตราการเจริญของเซลล์อิสระ เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่าและถังหมักแบบแบช.....69

4.17 การผลิตวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท (intracellular vitamin B_{12}) เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า และถังหมักแบบแบช.....71

4.18 การผลิตวิตามินบี 12 ออกภายนอกเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท (extracellular vitamin B_{12}) เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า และถังหมักแบบแบช.....72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.19 การเพิ่มปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะถังหมักแบบแบช.....73

4.20 ลักษณะเม็ดเจลของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท.....74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

วิตามินบี 12 (cobalamin) เป็นวิตามินที่มีความสำคัญทางโภชนาการของมนุษย์และสัตว์ ใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนในสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีกและสุกร ส่วนมนุษย์ใช้ในกรณีบริโภคโปรตีนจากพืชเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้เพราะโปรตีนจากพืชมีวิตามินบี 12 ในปริมาณที่ต่ำมาก ตัวอย่างเช่น ถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่ใช้กันมากพบว่าประกอบด้วยวิตามินบี 12 ในปริมาณที่ต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อกรัม (Liem และคณะ , 1972) ในทางการแพทย์วิตามินบี 12 เป็นสารสำคัญที่ใช้ในการรักษาโรคโลหิตจางชนิด megaloblastic anemia , macrocytic anemia และ pernicious anemia (Sebrell และ Harris , 1968) ส่วนทางด้านเภสัชกรรม ในสหรัฐอเมริกามีการนำมาใช้ด้านเภสัชกรรมหลายทาง เช่นฉีดวิตามินบี 12 เมื่อมีอาการเหนื่อยอ่อน หรือรักษาอาการเจ็บปวดที่ไม่ทราบสาเหตุในยุโรป

ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์มีการใช้วิตามินบี 12 ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เช่น คลอเตตระซัยคลิน และคลอแรมเฟนิคอล เป็นอาหารเสริมในสัตว์เพื่อเพิ่มความต้านทานโรค ประสิทธิภาพการใช้อาหาร ป้องกันโรคโลหิตจางและลดอัตราการตายในสัตว์ปีกและสุกร (Fredcrick และ Brisson , 1961) การเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยได้เปลี่ยนจากธุรกิจขนาดเล็กมาเป็นแบบอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มผลผลิตสัตว์สูงขึ้น ดังนั้นความต้องการวิตามินบี 12 ในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปในด้านเป็นอาหารเสริมของสัตว์ นอกเหนือจากใช้ในการแพทย์ (Hester และ Ward , 1954) มีรายงานว่าการเติมวิตามินบี 12 ในปริมาณ 10 - 15 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 ตัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารจากพืชได้ (Mervyn และ Smith , 1964)

เนื่องด้วยวิตามินบี 12 มีโครงสร้างทางเคมีที่สลับซับซ้อนยากต่อการสังเคราะห์ทางเคมี ดังนั้นอุตสาหกรรมการผลิตวิตามินบี 12 ในปัจจุบันจึงอาศัยกิจกรรมจากจุลินทรีย์เท่านั้น (Friedman และ Cagen , 1970) จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ปริมาณสูงเพียงพอสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมคือกลุ่มแบคทีเรีย ตัวอย่าง พวก Propionibacteria เช่น *Propionibacterium freudenreichii* และ *Propionibacterium shermanii* (Leviton และ Hargrove , 1952)

นอกจากนี้ ได้มีการนำน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมบางชนิดมาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ ในการผลิตวิตามินบี 12 เช่น น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะ น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิต butanol และ acetone (Becher และคณะ , 1962)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันความต้องการวิตามินบี 12 มีปริมาณสูงขึ้น ดังนั้นการปรับปรุงการผลิตวิตามินบี 12 ให้มีศักยภาพในการผลิตมากขึ้นจึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่จะนำเทคโนโลยีชีวภาพทางการผลิตวิตามินบี 12 โดยระบบตรึงเซลล์มาใช้ในการศึกษา และเป็นการใช้ประโยชน์จากน้ำทิ้ง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล

1.2.2 เพื่อศึกษาแหล่งธาตุอาหาร ที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลภายใต้สภาวะฟลาสก์ไม่มีการเขย่า

1.2.3 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

1.2.4 เพื่อศึกษาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนทในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่ากับระดับถังหมักแบบแบช

1.2.5 เพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำเหลือทิ้งที่ได้จากการวิจัย

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อศึกษาแหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ทำการเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่ากับระดับถังหมักแบบแบช จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเหลือทิ้งที่ได้จากการวิจัย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาและพัฒนา การผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรม

1.4.2 เพื่อเป็นการนำน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติและความสำคัญของวิตามินบี 12

วิตามินบี 12 ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดย Minot และ Murphy พบว่าโรค pernicious anemia ซึ่งเป็นโรคที่ร้ายแรงมากในสมัยนั้น สามารถรักษาให้อาการดีขึ้นโดยการให้ผู้ป่วยบริโภคตับดิบ และเรียกชื่อสารในตับที่มีผลในการรักษาโรคนี้ว่า Antipernicious Anemia Factor หรือ APF (Clastle , 1975)

Rickes และคณะ สกัดวิตามินบี 12 เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1948 เช่นเดียวกับ Smith (1948) โดยสกัดจากตับ พบว่าวิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่ละลายน้ำ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มหรือปริซึมสีแดงคล้ำ สูตรโมเลกุล คือ $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ มีชื่อทางเคมีว่า 5 , 6 - dimethyl benzimidazole cobamide cyanide หรือ ไซยาโนโคบาลามิน (cyanocobalamin) (Harris , 1968) วิตามินบี 12 ที่สกัดได้จากตับมีปริมาณน้อยมากไม่เพียงพอสำหรับใช้เป็นแหล่งวิตามินบี 12 ได้ แหล่งผลิตวิตามินบี 12 ที่สำคัญได้จากแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีส ดังนั้นวิตามินบี 12 ในธรรมชาติได้จากเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์เท่านั้น สัตว์และพืชชั้นสูงไม่สามารถสังเคราะห์ได้ วิตามินบี 12 ที่พบทั่วไปในเนื้อเยื่อของสัตว์เกิดจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร หรือจากเนื้อสัตว์ในอาหารที่กินเข้าไป สัตว์กินพืชเป็นอาหารหรือสัตว์เคี้ยวเอื้องจะได้รับวิตามินบี 12 ที่จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสังเคราะห์ขึ้นมา (Perlman , 1959)

วิตามินบี 12 มีความสำคัญต่อสัตว์ที่กำลังเจริญเติบโตมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มที่แล้ว ถ้าขาดวิตามินบี 12 ในระยะนี้ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตช้า อัตราการตายสูง ในพวก เป็ด ไก่ ทำให้มีขนน้อย เปอร์เซ็นต์การฟักต่ำ ส่วนในลูกสุกรทำให้ขาหลังเสีย ผิวหนังหยาบ (Mcdonald และคณะ , 1973 ; Maynard และคณะ , 1979) ในสัตว์พวกเคี้ยวเอื้องวิตามินบี 12 มีความสำคัญต่อเมแทบอลิซึมของกรดโพรพิโอนิก คือ โคเอนไซม์วิตามินบี 12 มีความสำคัญในการเปลี่ยน methyl-malonyl CoA ไปเป็น succinyl CoA โดยกรดโพรพิโอนิก ซึ่งเป็นผลผลิตหลักจากการหมักในกระเพาะส่วนรูเมน คือ จะเปลี่ยนเป็น propionyl CoA และ methylmalonyl CoA ตามลำดับ ถ้าขาดวิตามินบี 12 ทำให้เกิดการสะสมของ methylmalonyl CoA และกรดโพรพิโอนิกในร่างกายและขับออกมาทางปัสสาวะ ทำให้สัตว์มีอาการเบื่ออาหาร อัตราการเจริญลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแอ (Maynard และคณะ , 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สมบัติของวิตามินบี 12

2.2.1 สมบัติทางกายภาพของวิตามินบี 12

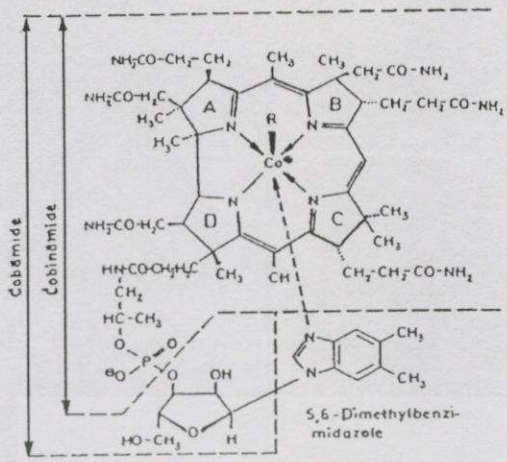
วิตามินบี 12 ที่พบโดยทั่วไปในรูปไซยาโนโคบาลามินเป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีกลิ่น รส สามารถละลายได้ในน้ำ (1.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) แอลกอฮอล์และฟีนอล แต่ไม่ละลายในอะซีโตน คลอโรฟอร์มและอีเธอร์ ผลึกของวิตามินบี 12 จะกลายเป็นสีดำที่อุณหภูมิ 210 - 220 องศาเซลเซียส และหลอมที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส (Ellenbogen และ Cooper , 1991)

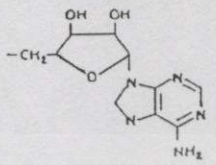
2.2.2 สมบัติทางเคมีของวิตามินบี 12

Hodgkin และคณะ (1955) ศึกษาโครงสร้างของวิตามินบี 12 โดยวิธี X-ray diffraction พบว่า วิตามินบี 12 เป็นโมเลกุลซับซ้อน แกนกลางมีโคบอลท์เป็นศูนย์กลางล้อมรอบด้วย tetrapyrrol ring (porphyrin) ที่ต่างมี N-atoms เชื่อมกับ Co-atom และมี 6 side chains (acetamide 3 กลุ่ม และ propionamide 3 กลุ่ม) ส่วนที่เรียกนิวเคลียสคอริน (corrin nucleus) เป็นส่วนสำคัญของวิตามินนี้ บางครั้งเราอาจเรียก วิตามินบี 12 ว่าคอรีนอยด์ (corrinoids) และมีโคบอลท์เป็นนิวเคลียส จึงเรียกกันโดยทั่วไปว่าเป็นโคบอลท์คอรีนอยด์ (cobalt corrinoids)

จากแกนกลางจะมีแขนยื่นขึ้นข้างบน เรียกว่า upper ligand ส่วนล่างที่มีแขนยื่นลงไปจากศูนย์กลางโคบอลท์ เรียกว่า lower ligand ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไรโบสฟอสเฟต และ organic base ทั้งหมดของ lower ligand นี้เรียกว่า nucleotide moiety ถ้าวิตามินบี 12 มีส่วนประกอบ nucleotide moiety ครบดังข้างต้นเรียกว่า วิตามินบี 12 สมบูรณ์แบบ (vitamin B_{12} complete type) ส่วน upper ligand อาจแทนที่ด้วยสารต่าง ๆ กัน เช่น หมู่ CN , OH , CH_3 หรือ 5′ - deoxyadenosyl มีการเรียกชื่อต่าง ๆ กันไป โมเลกุลคอรีนอยด์ที่ปราศจาก nucleotide residues เรียกว่า โคบินาหมีด (cobinamide) หรือ แฟคเตอร์บี (factor B) แต่หากโมเลกุลคอรีนอยด์ดังกล่าวขาดเฉพาะส่วน base เรียกว่า โคบาหมีด (cobamide) แต่ถ้าโมเลกุลดังกล่าวมีทุกกลุ่มรวมทั้งกลุ่ม 5 , 6-dimethylbenzimidazole เรียกว่า โคบาลามิน (cobalamin) แสดงดังภาพที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



R	Designation
- CN	Vitamin B_{12} (Cyanocobalamin)
- OH	Vitamin B_{12} (Hydroxocobalamin)
$-CH_3$	Methylcobalamin
	Coenzyme B_{12} (5' – Deoxyadenosylcobalamin)

ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบหลักของโครงสร้างโคบาลามิน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Florent และ Ninet (1979)

วิตามินบี 12 ที่พบในธรรมชาติจะรวมอยู่กับโปรตีน หรือกรดอะมิโนได้ถึง 40 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในรูป active form ที่เรียกว่า cobamide coenzyme ซึ่งมี 2 ชนิดที่สำคัญและจำเป็นต่อร่างกาย คือ เมทธิลโคบาลามิน (methylcobalamin) มีหมู่เมทธิลมาแทนที่หมู่ไซยาไนด์ และดีออกซีอะดีโนซิลโคบาลามิน (deoxyadenosylcobalamin) มีหมู่ดีออกซีอะดีโนซิลมาแทนที่หมู่ไซยาไนด์ ในการศึกษาเกี่ยวกับวิตามินบี 12 นิยมใช้ไซยาโนโคบาลามิน เพราะเป็นโมเลกุลที่เสถียรและหาง่าย จากการศึกษาพบว่าดีออกซีอะดีโนซิลโคบาลามิน และเมทธิลโคบาลามิน มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับไซยาโนโคบาลามิน (Friedman และ Cagen , 1970)

2.3 หน้าที่ของวิตามินบี 12

วิตามินบี 12 ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาทางเคมีหลายชนิด โดยอยู่ในรูปของโคบาหมีดโคเอนไซม์ (cobamide coenzyme) คือ ดีออกซีอะดีโนซิลโคบาลามิน และเมทธิล-โคบาลามิน ซึ่งการเปลี่ยนไซยาโนโคบาลามินให้เป็นโคเอนไซม์ จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยระบบของเอนไซม์วิตามินบี 12โคเอนไซม์ซินทีเทส (vitamin B_{12} coenzyme synthetase) พบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดและในเนื้อเยื่อสัตว์ ปฏิกิริยาที่ต้องการเมทธิลโคบาลามิน และอะดีโนซิล-โคบาลามิน เป็นโคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต่าง ๆ (Ellenbogen และ Cooper , 1991) แสดงตามตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ปฏิกิริยาที่ต้องการเมทธิลโคบาลามินเป็นโคเอนไซม์

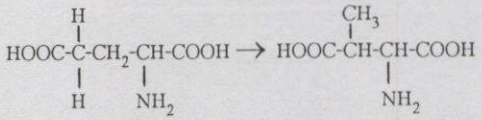
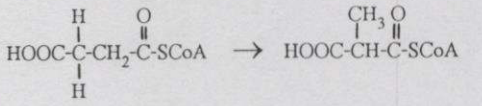
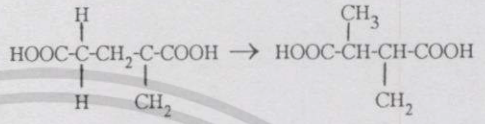
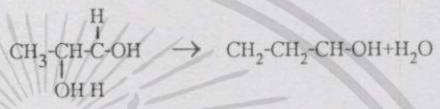
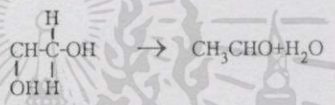
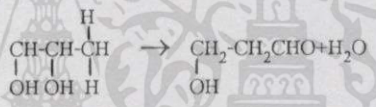
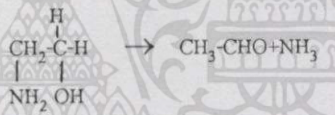
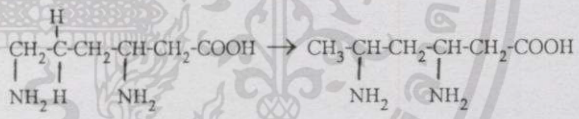
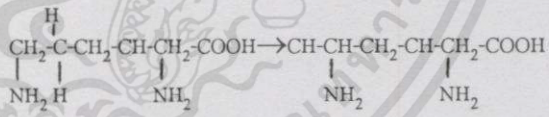
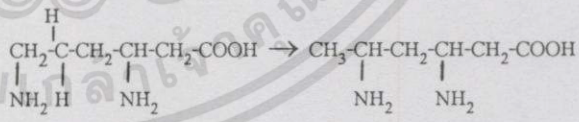
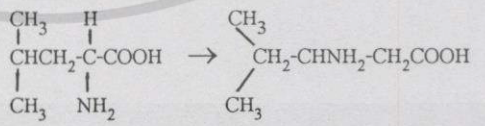
เอนไซม์	ปฏิกิริยา
1. N^5-Methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase (methionine synthetase)	CH_3-THFA + $HSCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$ → $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$+THFA
2. Methane synthetase	$2CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
3. Acetate synthetase	$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$

THFA = Tetrahydrofolic acid

ที่มา : Ellenbogen และ Cooper (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ปฏิกิริยาที่ต้องการอะดีโนซิลโคบาลามินเป็นโคเอนไซม์

เอนไซม์	ปฏิกิริยา
1. Glutamate mutase	
2. Methylmalonyl - CoA mutase	
3. ∝ - Methylene glutarate mutase	
4. a. Dioldehydase	
b. Dioldehydase	
5. Glyceroldehydase	
6. Ethanolamine ammonia lyase	
7. L - β - Lysine mutase	
8. D - ∝ - Lysine mutase	
9. Ornithine mutase	
10. L - β - Leucine aminomutase	

ที่มา : Ellenbogen และ Cooper (1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การผลิตวิตามินบี 12

การผลิตวิตามินบี 12 ระดับอุตสาหกรรมในระยะแรกเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น สเตรปโตมัยซินและคลอเตตระซัยคลินจากเชื้อสเตรปโตมัยซีส แต่วิตามินที่ผลิตได้ปริมาณค่อนข้างต่ำอีกทั้งยังมีสารปฏิชีวนะเจือปน ทำให้ยุ่งยากในการทำให้วิตามินบริสุทธิ์ และยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต (Noyes , 1969) ต่อมามีผู้รายงานว่าน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตต่างๆเมื่อผ่านกระบวนการกำจัดแล้วยังมีปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นในส่วนตะกอน (sludge) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเติมเกลือโคบอลท์ในระหว่างกระบวนการกำจัดน้ำเสีย (Casida, 1968)

Hoover และคณะ (1951) พบว่าวิตามินบี 12 ที่ได้จากกระบวนการกำจัดน้ำเสีย ส่วนใหญ่อยู่ในรูปสารประกอบที่คล้ายวิตามินบี 12 ซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์แต่ไม่สามารถใช้ได้ในคนหรือสัตว์ (Mervyen และ Smith , 1964) การแยกสารประกอบที่คล้ายวิตามินบี 12 ให้ได้เฉพาะไซยาโนโคบาลามินนั้นใช้ต้นทุนสูงทำให้วิตามินบี 12 มีราคาแพง (Hoover และคณะ , 1951) ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ปริมาณสูง โดยการคัดเลือกโดยตรงหรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Propionibacterium* พบว่า *Propionibacterium* บางสายพันธุ์สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในปริมาณสูงถึง 25,000 ไมโครกรัม/ลิตร (Hastings , 1971) จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 และสารที่มีคุณสมบัติคล้ายวิตามินบี 12 ได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส ยีสต์ รา และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Darken , 1953) จุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงเพียงพอในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 การผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

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

ที่มา : Florent และ Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตวิตามินบี 12 เป็นอุตสาหกรรม ในปัจจุบันได้จากการหมักโดยเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium* และ *Pseudomonas* เท่านั้น (Perlman , 1978) วิตามินบี 12 ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium freudenreichii* เมื่อวิเคราะห์ด้วยเปเปอร์โครมาโตกราฟฟี พบว่า 80 เปอร์เซ็นต์อยู่ในรูปของไฮดร็อกโซโคบาลามิน ส่วนอีก 20 เปอร์เซ็นต์อยู่ในรูปไซยาโน-โคบาลามิน (Leviton และ Hargroe , 1952) และเชื้อชนิดนี้สามารถใช้น้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้เป็นแหล่งไบโอตินและกรดแพนโททีนิก เพื่อผลิตวิตามินบี 12 ได้ (Yongsmith และ Apiraktivonge , 1983)

ในสภาพธรรมชาติวิตามินบี 12 ที่สังเคราะห์ได้ภายในเซลล์ของ *Propionibacterium* อยู่ในรูปของโคเอนไซม์บี 12 ซึ่ง Barker และคณะ (1960) สรุปว่า วิตามินบี 12 ที่แยกได้จากเซลล์ของ *Propionibacterium* จะอยู่ในรูปของไฮดร็อกไซด์หรืออนุพันธ์ของไซยาไนด์ ขึ้นอยู่กับการแตกตัวของโคเอนไซม์ระหว่างกระบวนการแยกสารออกจากเซลล์ Yongsmith และคณะ (1982) ได้รายงานการใช้ระบบการตรึงเซลล์แบคทีเรียโพรพิโอนิก เพื่อผลิตวิตามินบี 12 ในรูปของไฮดร็อกโซโคบาลามิน

2.5 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*

Propionibacterium freudenreichii เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่มีรูปร่างหลายแบบ ได้แก่ เชื้อที่เจริญในสภาวะไร้อากาศจะมีรูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน เรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้น ๆ ส่วนเชื้อที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อยจะมีรูปร่างเป็นท่อนเหมือนไม้กระบอง (club shape) หรือเป็นท่อนยาว สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไพรูเวท หรือแลกติก เป็นกรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ มักพบเชื้อกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์นม ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (Buchaman และคณะ , 1974) คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ปริมาณสูงพอที่จะใช้ผลิตเป็นการค้าได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic) หรือมีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) (Noyes , 1969 ; Rudy และคณะ , 1963) ดังนั้นจึงไม่ต้องมีการพ่นอากาศลงในถังหมัก (อรพิน , 2526)

แบคทีเรียโพรพิโอนิกได้รับการเลือกเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากการเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้สามารถป้องกันการปนเปื้อน (contamination) จากจุลินทรีย์อื่นได้ โดยเกลือโพรพิโอเนทที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักในสภาพไม่มีอากาศจะทำหน้าที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และราอื่น ๆ แต่ไม่เป็นพิษกับแบคทีเรียโพรพิโอนิก (Noyes , 1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*

2.6.1 อุณหภูมิบ่ม

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 15 - 40 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิในการหมักประมาณ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่แบคทีเรียนี้เจริญได้ดี และเหมาะสมในการผลิตวิตามินบี 12 ด้วย (Prescott และ Dunn , 1959 ; Noyes , 1969)

2.6.2 ค่าพีเอชของอาหาร (pH)

ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 6.8 - 7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 7.0 (Prescott และ Dunn , 1959) จึงควรรักษาค่าพีเอชของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4 - 9 เพราะถ้าค่าพีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้ จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจากโคบาลามิน ไม่คงตัวหรือถูกทำลายไป (Noyes , 1969)

Perlman และคณะ (1960) ศึกษาการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิกหลายสายพันธุ์ พบว่าถ้ามีการเติมกลูโคสและปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 7.0 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) อย่างสม่ำเสมอจะทำให้เซลล์มีการเจริญสูง และมีวิตามินบี 12 สะสมอยู่ในเซลล์ปริมาณสูงด้วย

2.6.3 แหล่งธาตุอาหาร

2.6.3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

ประเภทที่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น เด็กซ์โตส กลูโคส มอลโตส ไซโลส น้ำตาลอินเวอร์ท คอร์นไซรัป แลกโตส ซูโครส กากน้ำตาล และแป้ง ประเภทที่เป็นสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น กรดแลกติก กรดกลูโคนิก กรดซิตริก และกลีเซอรอล (Baron , 1962)

Field และ Lichsteine (1955 , 1957 , 1958) ศึกษาผลของการนึ่งฆ่าเชื้อกลูโคสที่ใช้เติมลงในอาหารด้วยวิธีการต่างกันต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรพิโอนิก พบว่าการผสมกลูโคสลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนแล้วจึงนึ่งฆ่าเชื้อ จะทำให้แบคทีเรียโพรพิโอนิกเจริญได้ดีกว่าการใช้กลูโคสที่นึ่งฆ่าเชื้อโดยแยกจากอาหารส่วนอื่น ๆ แล้วจึงเติมลงในอาหารภายหลังโดยใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ

Speedie และ Hull (1960) ศึกษากระบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิก โดยใช้วิธีการแบบไม่ต่อเนื่อง (batch process) พบว่าแหล่งธาตุคาร์บอนที่เหมาะสมที่ใช้คือ น้ำตาลกลูโคส หรือแลกโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.2 แหล่งธาตุไนโตรเจน (nitrogen source)

เช่นกรดอะมิโนหรือโปรตีนจากถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวโพด เนื้อสัตว์ เปปโตน ปลาป่น ถั่วป่น กากเมล็ดฝ้าย , yeast extract , tryptic digest of casein , pancreatic digest of casein , meat extract , blood meal protein , corn steep liquor และ lactalbumin (Baron , 1962) สำหรับแหล่งธาตุไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ yeast extract (Prescott และ Dunn , 1958)

Kucheras (1972) ศึกษาอิทธิพลของกรดอะมิโนต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ *P. shermanii* พบว่า กรดอะมิโนบางอย่าง เช่น ไกลซีน เมทธิโอนิน ซีรีน กลูทามีน อาร์จินีน และอะลานีน จะช่วยเร่งการผลิตวิตามินบี 12 แต่ซีสทีอีนจะยับยั้งขบวนการนี้

Bukin และ Pronyakova (1960) พบว่า เมทธิโอนินช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 โดยเป็นตัวเติมอนุมูลเมทธิลให้โมเลกุลวิตามินบี 12 ในระหว่างขบวนการสังเคราะห์ด้วย

Promageot และ Chaix (1937) พบว่า กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นส่วนประกอบจะช่วยเร่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโพรพิโอนิก

2.6.3.3 แหล่งเกลือแร่

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ โคบอลท์ (Co) ไซยาไนด์ (CN) เหล็ก (Fe) แมกนีเซียม (Mg) และฟอสเฟต (PO_4)

โคบอลท์ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อต้องเติมในปริมาณไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้ามีโคบอลท์ในปริมาณสูงเกินไปจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์และมีผลไปถึงการสร้างวิตามินบี 12 อาจใช้โคบอลท์ในรูปของเกลือที่ละลายน้ำได้ เช่น คลอไรด์ ซัลเฟต ไนเตรท หรือเกลือโคบอลท์ อื่น ๆ (Baron , 1962)

ไซยาไนด์ ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารจะต้องเติมในปริมาณไม่เกิน 0.1–100 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และมักเติมในรูปเกลือของแอมโมเนียม โซเดียม โพแทสเซียม (Baron , 1962)

Osman และ Chenouda (1968) พบว่าเหล็กมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของ *P. shermanii* ส่วนแมกนีเซียมมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์

Barker และ Lipman (1949) พบว่า ฟอสเฟตมีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียโพรพิโอนิกในปฏิกิริยาเอนไซม์ต่าง ๆ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์ ATP ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) RNA และ DNA

2.6.3.4 แหล่งอาหารเสริม

แหล่งอาหารเสริมที่ช่วยเร่งการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ กรดแพนโททีนิก (pantothenic) ไบโอติน (biotin) และวิตามินบี 2 (riboflavin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thomson (1943) และ Delwiche (1949) พบว่ากรดโพรพิโอนิก และไบโอติน เป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรพิโอนิก

Zodrow และคณะ (1963) พบว่า แคลเซียมแพนโททีเนท และไบโอตินจะมีปฏิกิริยาในทางเสริมกัน (synergistic action) ต่อการเจริญและการผลิตคอร์รินอยด์ (corrinoid) ซึ่งเป็นสารเริ่มต้น (precursor) ในการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิก

Renz (1970) พบว่าวิตามินบี 2 ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 โดยสามารถใช้วิตามินบี 2 แทน 5 , 6-dimethylbenzimidazole ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นที่สำคัญของวิตามินบี 12

2.6.4 การให้อากาศ

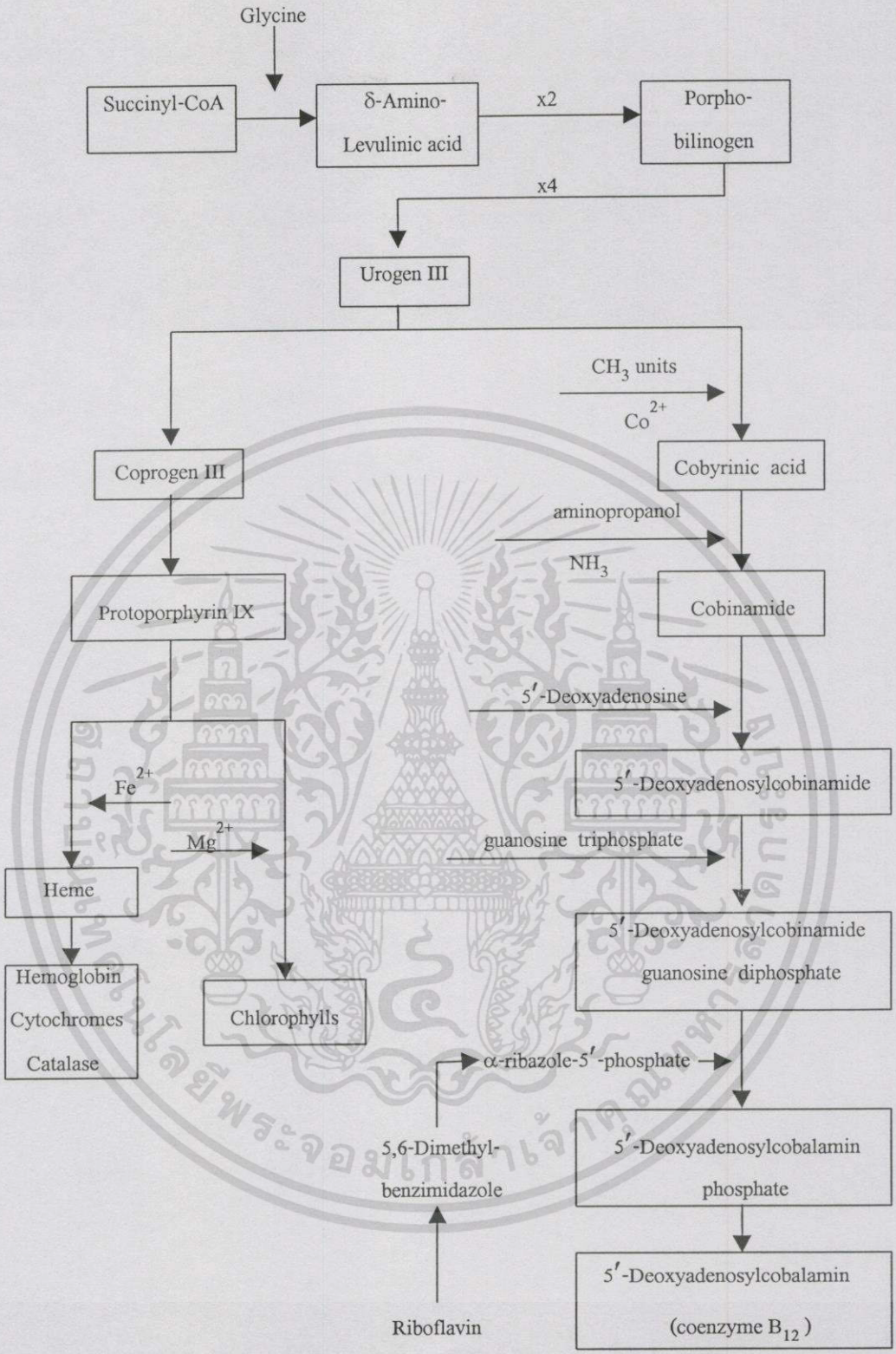
Speedie และ Hull (1960) ศึกษาขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิก พบว่า มีอยู่ 2 ช่วง ช่วงแรกปรับให้อยู่ในสภาพไม่มีอากาศ ทำได้โดยการผ่านก๊าซไนโตรเจนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ลงในอาหาร หรือรักษาระดับก๊าซเหนืออาหารโดยไม่ต้องกวนเพราะจะเป็นการนำออกซิเจนละลายในอาหาร ต่อมาคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดขึ้นจากการหมักจะช่วยรักษาสภาพไม่มีอากาศของอาหาร ในช่วงนี้เป็นการหมักธรรมดาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลามากกว่า 120 ชั่วโมง ส่วนช่วงหลังปรับให้อาหารสัมผัสกับอากาศ ในสภาพ microaerophilic โดยจะให้ออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นเวลา 70 - 80 ชั่วโมง จะเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 ได้มาก แต่การให้ออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ผลผลิตวิตามินบี 12 น้อยลง

Riley และคณะ (1961) พบว่าสภาพการหมักมีผลต่อชนิดของวิตามินบี 12 ที่สังเคราะห์ ได้จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียโพรพิโอนิกที่เจริญในสภาพไม่มีอากาศจะสังเคราะห์ cobinamide (incomplete cobinamide) สะสมในเซลล์ เมื่อให้อากาศแก่เซลล์จะมีผลเปลี่ยน cobinamide เป็น 5 , 6-dimethylbenzimidazole cobamide

2.7 กระบวนการสังเคราะห์วิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์

การสังเคราะห์วิตามินบี 12 เสนอโดย Boretti และคณะ (1960) ขั้นตอนแรกเริ่มคือขั้นการสร้างวงแหวนคอร์ริน (corrin ring) จากสารเริ่มต้นซักซินิลโคเอ (succinyl CoA) และไกลซีน (glycine) รวมกันได้กรดเดลตาอะมิโนลีวูลินิก (δ - aminolaevulinic acid) โดยมีการสร้างส่วนต่าง ๆ คือ A , B , C และ D โดยที่แต่ละส่วนเรียกว่า พอร์ฟอบิลิโนเจน (porphobilinogen) ซึ่งมาจับกันโดยเอนไซม์ดีอามิเนส (deaminase) และไอโซเมอเรส (isomerase) ได้สารยูโรไฟริโนเจน III (urophyrinogen III) และเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ

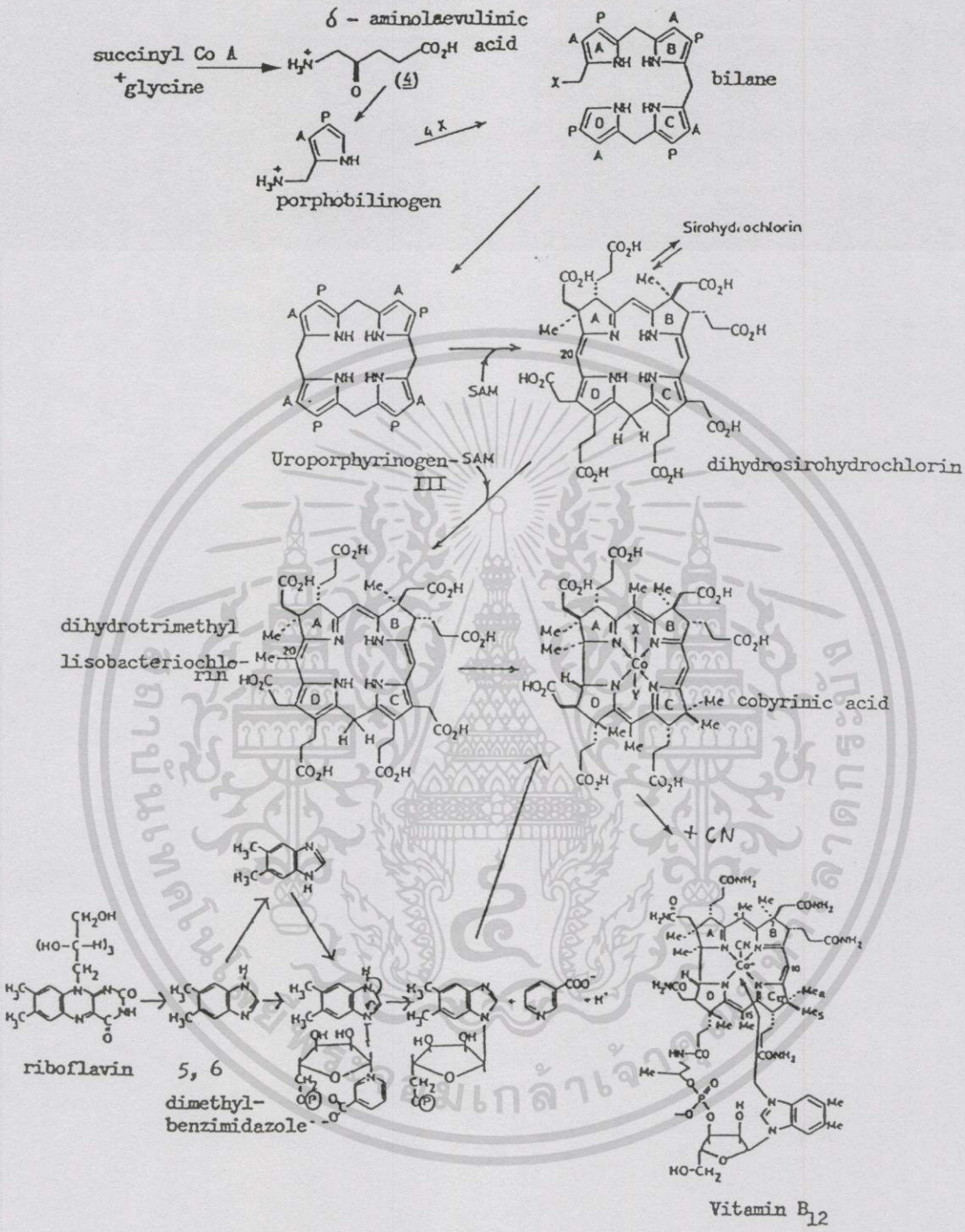
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงวิถีทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์วิตามินบี 12

ที่มา : Florent และ Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างสารสำคัญในเส้นทางการสร้างวิตามินบี 12

ที่มา : Florent และ Ninet (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปได้ดังนี้

2.7.1 มีการเชื่อมต่อระหว่างวงแหวน (ring) โดยตรง ระหว่าง A และ D โดยปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) และไอโซเมอไรเซชัน (isomerization)

2.7.2 เกิดเมทธิลเลชัน (methylation) โดยเมทธิโอนิน (methionine) ในอาหารจะเติมหมู่ (CH_3) กับนิวเครียสคอร์ริน 7 จุด สารที่ให้หมู่เมทธิล (methyl donor) ดังกล่าวอาจเป็นเมทธิโอนิน โคลีน (choline) หรือ เบทะอีน (betaine)

2.7.3 มีปฏิกิริยา decarboxylation ที่วงแหวน C เปลี่ยน A จาก CH_2-COOH เป็น CH_3 group

2.7.4 โคบอลท์จะเข้าไปรวมที่ศูนย์กลาง ถึงขั้นที่นิวเคลียสคอร์รินจะสมบูรณ์ ขั้นถัดไปเป็นการเชื่อมของส่วน upper ligand เช่น 5′-deoxyadenosyl จะเข้าไปเป็น upper ligand ของโมเลกุลโดยต่อกับโคบอลท์ ขั้นสุดท้ายเป็นการเชื่อม lower ligand เข้าไปต่อกับโคบอลท์ที่ส่วนล่างโดยผ่านกระบวนการที่มีการสร้างสิ่งต่างๆ ดังนี้ การเชื่อมของ nucleotide residue การสร้าง 5,6-dimethylbenzimidazole riboside (DMR riboside) และการสร้างพิวรีน ดังภาพที่ 2.2 และภาพที่ 2.3

Renz (1970) รายงานเป็นครั้งแรกว่าวิตามินบี 2 เป็นสารตั้งต้นของ DBI (5 , 6-dimethylbenzimidazole) ซึ่งเป็นส่วน lower ligand ของโมเลกุลวิตามินบี 12

2.8 การผลิตวิตามินบี 12 โดยระบบตรึงเซลล์

2.8.1 ความหมายและประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Chibata และคณะ, 1978)

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้มีการศึกษามานานแล้ว โดยในปี ค.ศ. 1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็ว โดยใช้ฟิล์มเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนเศษไม้เลื่อย หลังจากนั้นไม่มีผู้สนใจ จนกระทั่งประมาณปี ค.ศ. 1971 จึงได้เริ่มมีการสนใจอย่างจริงจังอีกครั้งหนึ่ง จนสามารถนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น การกำจัดน้ำเสียแบบ activated sludge และ trickling filter นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการกำจัดแร่ที่มีคุณภาพต่ำในเหมืองแร่ (Abbott , 1977)

ปี ค.ศ. 1973 Chibata และ Tosa ศึกษาและได้รับความสำเร็จในการผลิต กรดแอล-แอสปาร์ติกแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้เซลล์ *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารโพลีอะครีลาหมีด (polyacrylamide) นับเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึง (Chibata และ Tosa , 1977)

ในปัจจุบัน มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในการผลิตสารชนิดต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง และที่ประสพความสำเร็จใช้ในระดับอุตสาหกรรมแล้ว เช่น การผลิตกรดแอล-แอสปาร์ติก (Nishida และคณะ, 1979) การผลิตกรดแอล-มาลิก (Takata และคณะ, 1979) การผลิตฟรักโตส (Bucke , 1982) และการผลิต prednisolone (Ohlson และคณะ , 1980) เป็นต้น

2.8.2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์กับวิธีอื่น ๆ (Cheetham, 1980)

เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีข้อได้เปรียบหลายอย่างเมื่อเทียบกับตัวเร่งหรือวิธีอื่น ๆ คือ

2.8.2.1 การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมีเซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตัวเร่งทางเคมี คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการ คือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อน เช่น โคแฟคเตอร์ต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2.8.2.2 การเปรียบเทียบกับเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ คือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมาก ๆ ศึกษาในถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย สามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก และไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้

2.8.2.3 การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่ขบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟคเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่น ๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงไม่ต้องใช้ขบวนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น และเป็นการลดค่าใช้จ่ายด้วย แต่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมายับยั้งผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสับสเตรทและผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ (Abbott , 1977 ; Chibata และคณะ , 1978 ; Cheetham , 1980) นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานานหรือเซลล์รั่วไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวน (Cheetham และคณะ , 1979; White และ Portno , 1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
38537

2.8.3 การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นคุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีข้อแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ คุณสมบัติทางกลไก (mechanical properties) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมีและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ความชอบน้ำ (hydrophilicity) ความซึมซาบ (permeability) ราคาและการยอมรับ (วิเชียร , 2524)

สำหรับการคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มนั้น Takata และคณะ (1977) ได้สรุปหลักในการพิจารณาไว้ดังนี้ คือ

2.8.3.1 คุณสมบัติในการละลาย ควรจะทำการละลาย และผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายของสารโพลีเมอร์ได้ง่าย และสารผสมที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลว

2.8.3.2 คุณสมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเจลด้วยวิธีง่าย ๆ ภายใต้สภาวะปกติ และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ หรือเซลล์จุลินทรีย์

2.8.3.3 คุณสมบัติของเจล เจลที่ได้ควรจะมีความแข็งแรงและความคงตัวสูง ขนาดของรูที่อยู่ภายในเจลควรจะเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ แต่สับสเตรทและผลผลิตที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ

2.8.4 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

2.8.4.1 ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิต เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแตกต่างจากเซลล์อิสระ เนื่องจากสารตัวนำเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารและผลผลิต ในกรณีองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงมีโมเลกุลสูงความสามารถของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมักจะลดต่ำลงด้วย (Chibata และคณะ, 1978)

2.8.4.2 ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเปลี่ยนแปลงไปทางด้านความเป็นกรด ความเป็นด่าง หรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย

2.8.4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงมักมีความคงทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงมักมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ

2.8.4.4 ความคงตัวเซลล์ที่ถูกตรึง มีความคงทนในการใช้งานได้สูงกว่าเซลล์อิสระคือสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสามารถทนต่อสารเคมีและการเสื่อมสภาพทางฟิสิกส์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Cheetham และคณะ , 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.5 วิธีการตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ

วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีวิธีคล้ายกับวิธีการตรึงเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ ได้แก่ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method) ดังแสดงในภาพที่ 2.4 (Chibata และคณะ , 1978)

2.8.5.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำที่ไม่ละลายน้ำ (water-insoluble carriers) ซึ่งวิธีที่นิยมใช้แบ่งย่อยได้เป็น 2 วิธี คือ การดูดซับ (adsorption) และการยึดด้วยแรงโควาเลนท์ (covalent binding)

1) การดูดซับ เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำ ด้วย ionic bond หรือ hydrogen bond (Cheetham , 1980) โดยอาศัยหลักทางธรรมชาติเคมีเนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย หรือยีสต์ ประกอบด้วย diaminopimelic acid และ hexosamines ซึ่งสามารถเกิด ionic interaction กับตัวนำที่ใช้ได้ (Koshcheenko , 1981) โดยแรงดูดซับนี้จะขึ้นกับขนาดและอายุของเซลล์รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องด้วย การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อน และมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนพีเอช ionic strength การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นวิธีการนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากปนเปื้อนของเซลล์ แต่ก็อาจปรับปรุงแรงดูดซับให้สูงขึ้นโดยการทำ cross-linking หลังจากดูดซับเซลล์แล้ว (Cheetham , 1980) และในทางปฏิบัติอาจนำข้อเสียนี้มาใช้ประโยชน์ได้โดย desorption เซลล์ที่หมดความสามารถออกไปแล้วดูดซับเซลล์ใหม่เข้ามาแทนที่ นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ยังมีข้อเสียอีกประการหนึ่ง คือ อัตราการดูดซับเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยของตัวนำค่อนข้างต่ำ แต่อาจปรับปรุงแก้ไขได้โดยใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ (Koshcheenko , 1981) สำหรับสารที่ใช้เป็นตัวดูดซับเซลล์ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ modified cellulose , glass beads , anthracite , ion-exchange resin และ wood pulp เป็นต้น

2) การยึดด้วยแรงโควาเลนต์ เป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่เชื่อมเซลล์โดยตรงกับ activated support โดยสารที่ใช้เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ผิวเซลล์ ได้แก่ กลุ่มอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มซัลฟไฮดริล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดี คือ เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย (Cheetham , 1980) แต่ก็มีข้อเสียเนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้อาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียว และเอนไซม์ที่ต้องการนั้นเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการเตรียม สำหรับสารที่ใช้เป็นตัวยึดเซลล์ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ titanium , zirconium hydroxides , activated carboxymethyl cellulose , activated porous , glass beads (Navarro และ Durand , 1977) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.5.2 การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) หมายถึง การเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก bi- หรือ multifunctional reagents เช่น กลูทาร์รัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) , โทลูอีน (toluene) และไดไอโซไซยาเนท (diisocyanate) (Chibata และคณะ , 1970) เป็นต้น

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ต่างจากวิธีอื่น ๆ คือ เซลล์ไม่ได้ถูกตรึงอยู่กับสารที่เป็นตัวดูดซับหรือถูกห่อหุ้มอยู่ในเจล หรือใน semipermeable membrane แต่เป็นการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างจะรุนแรง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในปฏิกิริยาเชิงเดี่ยว (single reaction) เท่านั้น (Cheetham , 1980)

2.8.5.3 การห่อหุ้ม (entrapping method) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 แบบคือ การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (microencapsulation) และการห่อหุ้มแบบร่างแห (lattice type)

1) การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล หมายถึง การห่อหุ้มเซลล์ด้วยโพลีเมอร์เยื่อบางกึ่งซาบซึมได้ (semipermeable membrane) เช่น คอลลอเดียน (collodian) หรือซิลิโคน (silicone) ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้สับสเตรทและผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นวิธีง่าย แต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย ดังนั้นการใช้ประโยชน์จึงมีจำกัด นิยมใช้ในด้านการผลิตยารักษาโรคและงานวิเคราะห์ทั่วไป (Cheetham , 1980)

2) การห่อหุ้มแบบร่างแห หมายถึง การตรึงเซลล์โดยการห่อหุ้มเซลล์ไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารโพลีเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (matrix) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและประสพความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์เกือบทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมีความจำเพาะและข้อเสียเปรียบมากกว่า (Cheetham , 1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มนี้นิยมใช้สารพวก biochemically inert hydrogel เป็นตัวห่อหุ้มโดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงร่าง 3 มิติ ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกในการเกิดเจลนั้นมีหลายแบบคือ

2.1) covalent binding เช่น การโพลีเมอไรซ์ของโพลีอะคริลาหมีด (polyacrylamide)

2.2) ionic force เช่น แอลจิเนท (alginate)

2.3) precipitation โดยพีเอช อุณหภูมิ หรือการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลาย (solvent change) เช่น คอลลาเจน (collagen) คาร์ราจิแนน (carrageenan)และโพลีสไตรีน (polystyrene)

สำหรับสารที่นิยมใช้เป็นตัวห่อหุ้ม และประสพความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมมาแล้ว ได้แก่ โพลีอะคริลาหมีด คาร์ราจิแนน และแคลเซียมแอลจิเนท (Bucke , 1982)

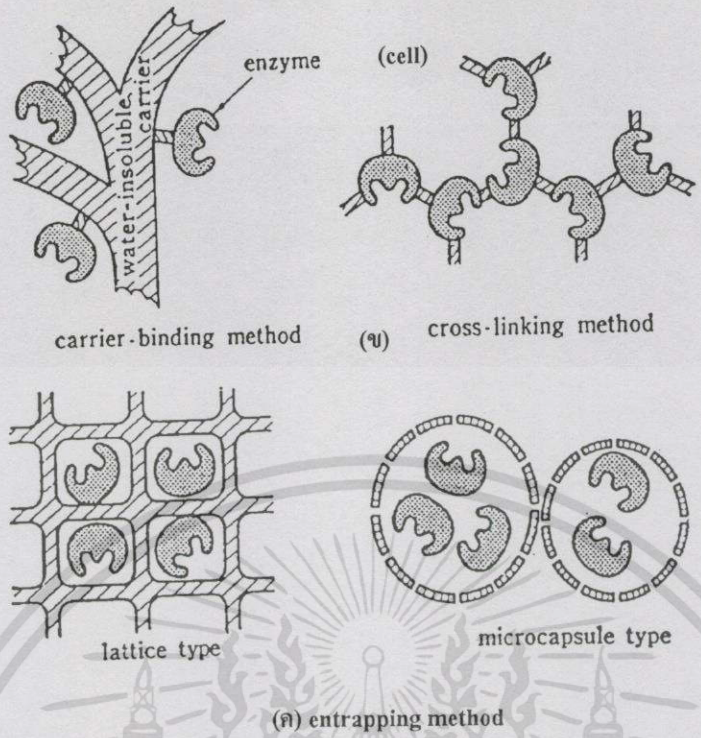
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.6 แอลจิเนท เป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นโพลีเมอร์ร่วมของ D-manuronate (M) และ L-guluronate (G) residues แอลจิเนทสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะโพลีวาเลนท์ เช่น อลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจิเนททำได้โดยผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมแอลจิเนท แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดเจลของแคลเซียมแอลจิเนทขึ้นทันที และหลังจากนั้นควรแช่เจลไว้ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อีก อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ (complete gelation) (Bucke , 1982) คุณสมบัติของเจลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของแอลจิเนทที่ใช้ โดยแอลจิเนทที่มี G residues สูงจะทำให้เกิดเจลที่มีความแข็งแรงสูงด้วย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของไอออนของโลหะและปริมาณเซลล์ที่ใช้ด้วย (Graham , 1977 ; Cheetham และคณะ , 1979)

การใช้แคลเซียมแอลจิเนทในการตรึงเซลล์มีข้อดีหลายประการ คือ ทำได้ง่ายภายใต้สภาวะปกติ สะดวก และรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจิเนทยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากแอลจิเนทเป็นสารที่ไม่เป็นพิษและยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร (food additive) มาเป็นเวลานานแล้ว และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนทสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวเร่งมีอยู่เป็นเวลานาน แต่เซลล์บางส่วนอาจหลุดรั่วออกนอกเจลได้ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลผลิตและในบางสภาวะการใช้แคลเซียมแอลจิเนทในการตรึงเซลล์อาจเกิดปัญหาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่สารคีเลทติ้ง (chelating agents) เช่น สารประกอบฟอสเฟต และ อีดีทีเอ (EDTA ; ethylenediamine-tetraacetic acid) ซึ่งสามารถดึง Ca^{2+} ออกจากเจลได้ และธาตุที่มีประจุบวก (cations) บางชนิด เช่น Mg^{2+} และ K^{+} ซึ่งสามารถเข้าไปแทนที่ Ca^{2+} ได้ ทำให้เจลไม่คงตัวเกิดการละลายได้ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติข้อนี้ของแอลจิเนทสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาตรวจนับการเจริญของเซลล์ภายในเจลได้ (Kierstan และ Bucke , 1977 , Cheetham และคณะ , 1979) สำหรับการแก้ไขปัญหาการละลายของเจลเมื่อมีสารคีเลทติ้งนั้นทำได้โดยใช้สตรอนเซียมหรือแบเรียม แทนแคลเซียม จะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวมากกว่า (Paul และ Vignais , 1980) แต่จะไม่เป็นที่ยอมรับในกรณีที่ผลผลิตที่ได้เกี่ยวข้องกับการใช้ในอาหาร

ปัจจุบันแคลเซียมแอลจิเนทถูกนำมาใช้เป็นสารตัวนำในการตรึงเอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ คลอโรพลาส ไมโตคอนเดรีย (Kierstan และ Bucke , 1977) และเนื้อเยื่อพืช (Brodelius และคณะ , 1979) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนทนิยมใช้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์กันมาก เช่น การย่อยสลายฟีนอล การผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ สเตอรอยด์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 รูปแบบการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

ที่มา : Chibata และคณะ (1978)

2.8.7 การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในการอุตสาหกรรม

2.8.7.1 การผลิตกรดแอล-แอสปาร์ติก (L-aspartic acid) กรดแอสปาร์ติกเป็นยารักษาโรคและอาหารเสริม ปี ค.ศ. 1973 บริษัท ทานาเบ้ ไซยาคุ ในประเทศญี่ปุ่น ได้ใช้เซลล์ *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงอยู่ในโพลีอะครีลาหมีดเจล เป็นแหล่งของเอนไซม์แอสปาร์เตส (aspartase) ในการผลิตกรดแอล-แอสปาร์ติก (Chibata และคณะ , 1974) จากการวิเคราะห์ต้นทุนในการผลิต พบว่าการใช้ระบบเซลล์ที่ถูกตรึงใช้ต้นทุนในการผลิตเพียง 60 เปอร์เซนต์ของวิธีเก่า เนื่องจากประหยัดค่าใช้จ่าย ค่าตัวเร่ง ค่าแรงงาน และการกำจัดของเสีย ต่อมาได้มีการปรับปรุงระบบการตรึงเซลล์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยใช้คัปปะคาร์ราจิแนน (kappa carrageenan) และเพิ่มความคงตัวโดยเชื่อมแบบไขว้กับกลูตาร์อัลดีไฮด์และเฮซะเมทธิลลีนไดอะมีน (hexamethylenediamine) ทำให้มีความสามารถและความคงตัวสูงขึ้น

2.8.7.2 การผลิตกรดแอล-มาลิก(L-malic acid) กรดมาลิกเป็นกรดอินทรีย์ ที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมในเซลล์สิ่งมีชีวิต ในปี ค.ศ. 1974 บริษัท ทานาเบ้ ไซยาคุ ได้ทำการผลิตกรดแอล-มาลิก โดยใช้ระบบเซลล์ที่ถูกตรึงเช่นเดียวกับการผลิตกรดแอล-แอสปาร์ติก จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งเอนไซม์ฟูมาเรส (fumarase) ได้แก่ *Brevibacterium ammoniagenes* ที่ถูกตรึงด้วยโพลีอะครีลาหมีด เนื่องจากเชื้อนี้สามารถผลิตสารอื่นที่ไม่ต้องการคือกรดซัคซินิกได้ด้วย ดังนั้นจึงต้องนำเซลล์ที่ถูกตรึงมาใส่ในสารสกัดน้ำดี (bile extract) เพื่อยับยั้งการสร้างกรดซัคซินิก และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพิ่มอัตราการผลิตกรดแอล-มาลิก ต่อมาในปี ค.ศ. 1977 ได้มีการปรับปรุงกระบวนการผลิตใหม่ โดยใช้เซลล์ *Brevibacterium flavum* ซึ่งถูกตรึงอยู่ใน เค-คาร์ราจิแนน แทน (Takata และคณะ , 1979) เนื่องจากมีข้อดีกว่าการใช้โพลีอะครีลาหมีด คือ วิธีการตรึงทำได้ง่ายในสภาวะปกติ ให้ผลผลิตสูง และสารที่ใช้ไม่เป็นพิษ

2.8.7.3 การผลิตสารเพรดนิโซโลน (prednisolone) เพรดนิโซโลนเป็นสารสเตอรอยด์ชนิดหนึ่งที่มีราคาแพง ใช้เป็นยาคุมกำเนิด และสารระงับการอักเสบ ประเทศสวีเดนสามารถผลิตสารนี้ในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1978 โดยใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงขบวนการผลิตอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ 2 ชนิด ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดถูกตรึงด้วยโพลีอะคริลาหมีด เซลล์ภายหลังการตรึงยังมีชีวิตอยู่ ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ผลิตอย่างต่อเนื่องได้ แต่ต่อมาภายหลังได้มีการปรับปรุงวิธีการตรึงเซลล์โดยใช้แคลเซียมแอลจิเนทแทน (Ohlson และคณะ, 1980) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ให้ผลผลิตสูง และสารที่ใช้ไม่เป็นพิษ

จะเห็นได้ว่าการผลิตสาร โดยใช้ระบบเซลล์ที่ถูกตรึงในระดับอุตสาหกรรม ในปัจจุบันใช้เซลล์ที่ถูกตรึงเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์เพียงชนิดเดียว ส่วนการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์หลายชนิดนั้น ยังไม่มีรายงานการใช้ในระดับอุตสาหกรรม แม้มีการทดลองกันอย่างกว้างขวาง เช่น การผลิตเอทธานอลจากยีสต์ที่ถูกตรึง (Wada และคณะ , 1979) การผลิตวิตามินบี 12 จากเซลล์แบคทีเรียโพรพิโอนิกที่ถูกตรึง (Yongsmith , 1982) และการผลิตกรดอินทรีย์จากเซลล์แบคทีเรียโพรพิโอนิกที่ถูกตรึง (Iordan และคณะ , 1980) เป็นต้น

2.9 วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12

วิตามินบี 12 วิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีทางเคมีและฟิสิกส์ (Spalla และคณะ , 1989) และทางชีวภาพที่วิเคราะห์ได้ละเอียดกว่า ดังแสดงในตารางที่ 2.4

Microbiological assay เป็นเทคนิคทางจุลชีววิทยาที่ใช้จุลินทรีย์เป็นตัวทดสอบหาสารต่าง ๆ โดยมีหลักเกณฑ์ว่า จุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นตัวทดสอบนั้นจะต้องมีความต้องการจำเพาะต่อสารนั้นในการเจริญจริง ๆ ถ้าหากไม่มีสารตัวนั้นแล้ว จุลินทรีย์นั้นจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลย หรือถึงได้ก็เจริญเติบโตได้น้อยมากจนเห็นความแตกต่างได้อย่างแน่ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 วิธีวิเคราะห์วิตามินบี 12

จุลินทรีย์ทดสอบ	สายพันธุ์	วิธีการ	รูปวิตามินบี 12 วิเคราะห์ได้	เอกสารอ้างอิง
แบคทีเรีย				
Lactobacillus lactis	(Dorner strain)	T,A	Cobamides	Shorb (1947,1948)
L.. leichmannii	ATCC 4797	T,A		Skeggs และคณะ(1948)
	ATCC 7830			
Escherichia coli	ATCC 9637		Cobinamides	Davis และ Mingiola
	มิวแตนท์สายพันธุ์ 113-3		Cobamides	
โปรโตซัว				
Euglena gracilis			Coenzyme B_{12}	Hutnerและคณะ (1949)
Ochromonas malhamensis			Coenzyme B_{12}	Ford (1953)

หมายเหตุ T = วัดความขุ่นของการเจริญ (turbidity)
A = วัดปริมาณกรดที่เกิด (acidity)

2.9.1 การวัดผลการทดสอบ

แบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ

2.9.1.1 Tube method ใช้เลี้ยงเชื้อในหลอดทดสอบ อ่านผลจาก

1) Turbidimetric method อ่านผลจากความขุ่นของเซลล์ หากตัวทดสอบเจริญดีเพราะมีสารมาก ความขุ่นก็มากตาม ถ้าสารนั้นน้อยการเจริญเติบโตลดต่ำลง ความขุ่นของเซลล์ก็ลดลงตามไปด้วย

2) Titration method อ่านผลจากปริมาณกรดที่จุลินทรีย์ทดสอบสร้างขึ้นมา ถ้ากรดมากก็แสดงว่ามีสารทดสอบมาก ถ้ากรดน้อยก็แสดงว่าจุลินทรีย์เจริญเติบโตต่ำสร้างกรดน้อย

2.9.1.2 Plate method หรือเรียกว่า cup-plate method เลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ ดูผลจาก growth zone

2.9.2 ข้อแตกต่างบางประการของจุลินทรีย์ที่เป็นตัวทดสอบหาวิตามินบี 12

2.9.2.1 *Lactobacillus*

เชื้อจุลินทรีย์ตัวแรกที่ใช้ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12 คือ *Lactobacillus lactis* Dornor (LLD) เนื่องจากพบว่าตอบสนองต่อสารที่สกัดได้จากตับ แต่ต่อมาได้นำ *L. leichmannii* (ATCC 4797) หรือ *L. leichmannii* (ATCC 7830) มาใช้วิเคราะห์หาวิตามินบี 12แทน เนื่องจากการใช้ *L. lactis* Dornor มีข้อยุ่งยากเพราะมีการแตกสลายของเซลล์ ทำให้เกิดข้อผิดพลาดใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ วิธีการวิเคราะห์ที่นิยมใช้สำหรับ *Lactobacillus* คือ turbidimetric method โดยอ่านผลจากความขุ่นของเซลล์หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 18-40 ชั่วโมง หรือโดยการไทเทรต (titration method) หาปริมาณกรดแลกติกจากเชื้อที่เจริญได้ 72 ชั่วโมง

2.9.2.2 *Escherichia coli* (mutant type)

โดยปกติจุลินทรีย์ชนิดนี้ไม่ต้องการวิตามินบี 12 สำหรับการเจริญ แต่ต่อมา Davis และ Mingioli (1950) ได้ใช้แสงยูวี ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สายพันธุ์ *E. coli* ที่ต้องการเมทธิโอนินและวิตามินบี 12 ในการเจริญ สามารถตอบสนองต่อ Factor B หรือสารที่คล้ายคลึงวิตามินบี 12 แต่ไม่ตอบสนองต่อดีออกซีไรโบไซด์ นิยมใช้กับการทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเทคนิคไม่ดีอาจเกิด back mutation ได้เสมอ

2.9.2.3 *Euglena gracilis*

เชื้อนี้ต้องการวิตามินบี 12 และไธอะมีน เป็นสารจำเป็นต่อการเจริญ ซึ่งใช้วิตามินบี 12 ได้ในรูปที่เป็นอิสระเท่านั้นส่วนวิตามินบี 12 ที่ติดกับโปรตีนใช้ไม่ได้ การตรวจหาปริมาณวิตามินบี 12 ทำได้โดยอ่านผลจากความขุ่นของเซลล์ แต่ต้องระวังเพราะว่ามักจะมีเชื้ออื่นปนเปื้อนง่าย เนื่องจากว่าเชื้อยูกลีนา โตช้า ต้องใช้เวลานาน 5 ถึง 8 วัน จึงจะอ่านผลได้

2.9.2.4 *Ochromonas malhamensis*

เชื้อนี้ไวต่อวิตามินบี 12 ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน และโคเอนไซม์ แต่ไม่นิยมเนื่องจากใช้เวลาในการบ่มเชื้อนาน 5-7 วัน และยังเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ได้ยากเพราะจะถูกปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย (Sebrell และ Harris , 1968)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์

3.1.1 *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นจัดเก็บในสภาพ stock culture อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน MRS agar โดยวิธี stab (ภาคผนวก ก.)

3.1.2 *Lactobacillus leichmannii* TISTR 785 ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในสภาพ Lyophilization จากนั้นจัดเก็บในสภาพ stock culture ใน Bacto B_{12} Culture Agar USP ของ Difco โดยวิธี stab

3.2 วัสดุเหลือใช้

น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ได้รับจาก บริษัททิพย์วันชัยซีฟู้ดจำกัด เลขที่ 696 ซอยเทศบาลสมมติ ถนนพิพิธ ตำบลบ้านโขด อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

3.3 สารสำหรับตรึงเซลล์

โซเดียมแอลจิเนท	ผลิตโดยบริษัท Sigma Chemical Co., Ltd.

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องหมุนเหวี่ยง	รุ่น ZK 380	ของ Hermle
เครื่องวัดพีเอช	รุ่น SA 520	ของ Orion
เครื่องชั่งแบบหยาบ	รุ่น B 3100S	ของ Sartorius
เครื่องชั่งแบบละเอียด	รุ่น A 200S	ของ Sartorius
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	รุ่น DR/4000V	ของ Hach
เครื่องเขย่าหลอดผสมสาร	รุ่น G-560E	ของ Scientific Industries, Ing.
เครื่องดูดอากาศ	รุ่น 5KH 36KN 193HT	ของ GE Mortors
หม้อนึ่งความดัน	รุ่น HA-3D	ของ Hirayama mfg. corp.
เครื่องย่อยโปรตีน	รุ่น TT	ของ Gerhardt

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องกลั่นโปรตีน	รุ่น Vapodest 30	ของ Gerhardt
ตู้อบไมโครเวฟ	รุ่น TRX-2601	ของ Turbora
ตู้บ่มเชื้อ	รุ่น B 60	ของ Memmert
ตู้ถ่ายเชื้อ	รุ่น BIO48M 359	ของ Faster
ถังหมัก	รุ่น 502 D	ของ LH Fermentation
โถดูดความชื้น	รุ่น GL 32	ของ Glaswerk Wertheim
ตู้อบความร้อนแห้ง	รุ่น ED 53	ของ WTC binder
เครื่องควบแน่น	รุ่น IME 6	ของ Electromantle ME
เตาไฟฟ้า	รุ่น SP 46920-26	ของ Barnstead/Thermolyne

กระทงอลูมิเนียม

เข็มเขี่ยเชื้อ

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 เซนติเมตร

กระดาษกรองใยแก้ว Whatman GF/C เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.7 เซนติเมตร

เครื่องแก้ว ได้แก่ ฟลาสก์รูปชมพู่ บีกเกอร์ บิวเรต ปิเปต กระบอกตวง ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลองฝาเกลียว แท่งแก้ว จานเพาะเลี้ยงเชื้อ ขวดก้นกลม ขวดบีโอดี หลอดสำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยง ลูกแก้ว กรวยกรอง กรวยแยก และจานระเหย

3.5 สารสำหรับเตรียมอาหารและเคมีภัณฑ์

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) (Ammonium chloride)	ของ Merck Co., Ltd.
แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) (Ammonium hydroxide)	ของ บริษัท วิทยาศรม จำกัด
Bacto B_{12} Assay Medium USP	ของ Difco
Bacto B_{12} Culture Agar USP	ของ Difco
ไบโอติน (Biotin)	ของ Fluka Chemical Co., Ltd.
กรดบอริก (H_3BO_3) (Borric acid)	ของ J.T. Baker Inc.
แคลเซียมคลอไรด์แอนไฮดรัส ($CaCl_2$) (Calcium chloriede (anhydrous))	ของ Merck Co., Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคบอลท์ซัลเฟต ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$) (Cobolt sulphate)	ของ Fluka Chemical Co., Ltd.
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) (Copper sulphate)	ของ J.T. Baker Inc.
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (Dipotassium hydrogen phosphate)	ของ Merck Co., Ltd.
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) (Disodium hydrogen phosphate)	ของ Mallinckrodt Co., Ltd.
เฟอริกอะลัม ($FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) (Feric alum)	ของ Merck Co., Ltd.
เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) (Ferrus ammonium sulphate)	ของ Fluka Chemical Co., Ltd.
กลูโคสแอนไฮดรัส ($C_6H_{12}O_6$) (Glucose (anhydrous))	ของ Merck Co., Ltd.
ไกลซีน (Glycine)	ของ Sigma Chemical Co., Ltd.
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Hydrochloric acid)	ของ J.T. Baker Inc.
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Magnesium sulphate)	ของ J.T. Baker Inc.
เมอร์คิวรีซัลเฟต ($HgSO_4$) ชนิดผง (Mercury sulphate)	ของ Merck Co., Ltd.
เมทธิโอนิน (Methionine)	ของ Fluka Chemical Co., Ltd.
MRS agar	ของ Difco
กรดไนตริก (HNO_3) (Nitric acid)	ของ J.T. Baker Inc.
กรดแพนโททีนิก (Pantothenic acid calcium salt)	ของ Fluka Chemical Co., Ltd.
ฟีนอล (C_6H_5OH) (Phenol)	ของ Merck Co., Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) (Potassium dichromate)	ของ Fluka Chemical Co., Ltd.
โพแทสเซียมไดไฮเดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Potasium dihydrogen phosphate)	ของ J.T. Baker Inc.
โพแทสเซียมไฮโดรเจนไบไอโอเดต ($KH(IO_3)_2$) (Potassium hydrogen biiodate)	ของ Merck Co., Ltd.
โพแทสเซียมฟอสเฟต (K_3PO_4) (Potassium phosphate)	ของ J.T. Baker Inc.
วิตามินบี 2 (Riboflavin)	ของ Fluka Chemical Co., Ltd.
ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNo_3$) (Silver nitrate)	ของ Farmitalia carlo erba
ซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) (Silver sulphate)	ของ Farmitalia carlo erba
โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) (Sodium azide)	ของ Merck Co., Ltd.
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Sodium chloride)	ของ Farmitalia carlo erba
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Sodium hydroxide)	ของ Merck Co., Ltd.
โซเดียมไอโอไดด์ (NaI) (Sodium Iodide)	ของ Serva Co., Ltd.
โซเดียมซัลไฟด์แอนไฮดรัส (Na_2SO_3) (Sodium sulphite (anhydrous))	ของ Merck Co., Ltd.
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) (Sodium thiosulphate)	ของ Merck Co., Ltd.
กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) (Sulfuric acid)	ของ Lab - Scan Asia Ltd.
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	ของ Difco

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.6.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.6.1.1 อาหาร MRS agar สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 เพื่อเป็น stock culture (ภาคผนวก ก. 1)

3.6.1.2 อาหาร Complete medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 เพื่อผลิตวิตามินบี 12 (ภาคผนวก ก. 2)

3.6.1.3 อาหาร Bacto B_{12} Culture Agar USP ของ Difco สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus leichmannii* TISTR 785 เพื่อเป็น stock culture

3.6.1.4 อาหาร Bacto B_{12} Inoculum Broth USP ของ Difco สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus leichmannii* TISTR 785 เพื่อเป็นหัวเชื้อ

3.6.1.5 อาหาร Bacto B_{12} Assay Medium USP ของ Difco สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12

3.6.1.6 เตรียมน้ำทิ้งเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตวิตามินบี 12

1) นำน้ำทิ้งปริมาตร 5 ลิตร มาแยกเอาตะกอนแขวนลอยออก

2) วางกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร ลงในกรวยที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ

3) ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวย

4) เทน้ำทิ้งผ่านกระดาษกรองโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ

5) เติมแหล่งธาตุอาหารที่ต้องทำการศึกษา

6) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 7.0 (ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์)

7) นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้ง

3.6.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธีเจลดาห์ล (kjeldahl method) ตามวิธีของ AOAC (1995)

1) ปิเปตต์น้ำทิ้ง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดย่อย (ใช้เป็นแบลงก์)

2) เติมโพแทสเซียมฟอสเฟต 5 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 0.1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้วเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง

4) ย่อยโปรตีนโดยใช้เครื่องย่อย ตั้งอุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

5) ทิ้งให้เย็น (แต่ไม่ควรทิ้งให้เย็นนานเกินไปเพราะอาจทำให้เกลือตกผลึกและไม่ควรร้อนเกินไปเพราะอาจทำให้เกิดปฏิกิริยารุนแรง) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 75 มิลลิลิตร

6) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7) นำไปกลั่นลงในสารละลายกรดบอริก ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้ screened methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด

8) สารละลายที่กลั่นได้จะมีสีเขียวใส ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปไทเทรตกับกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เมื่อถึงจุดยุติจะมีสีแดงใส จดปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรต

9) คำนวณหาค่าปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ข. 1)

3.6.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยการวัดปริมาณ reducing sugar ด้วย dinitrosalicylic acid (DNS) ตามวิธีของ Chaplin (1986)

1) ปิเปตต์น้ำทิ้งที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์เป็นแบลงก์)

2) เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3) ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ในระหว่างต้มควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดทดลอง เพื่อลดการระเหยของน้ำ

4) ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว โดยการนำหลอดทดลองมาแช่ในน้ำแข็งที่ละลายหรือใส่ในอ่างน้ำที่เปิดให้น้ำไหลตลอดเวลา

5) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density ; OD) ด้วยเครื่องสเปก-โทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (standard curve)

6.1) ละลายน้ำตาลที่บริสุทธิ์ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) น้ำตาลที่ใช้เป็นน้ำตาลมาตรฐาน ควรเป็นน้ำตาลชนิด monomer ซึ่งเป็นน้ำตาลชนิดเดียวกับที่ต้องการทราบปริมาณ

6.2) ทำให้น้ำตาลเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 50 ,75 , 100 , 200 , 400 และ 600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

6.3) นำสารละลายน้ำตาลในข้อ 6.2 ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธีการ เดียวกับการวิเคราะห์น้ำตาลในตัวอย่างน้ำทิ้ง และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

6.4) นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงแต่ละหลอดทดลองกับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ หรือปริมาณของน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ เส้นกราฟที่ได้จะใช้เป็นค่าเทียบมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างต่อไป

3.6.2.3 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (pH) ตามวิธีของ AOAC (1995)

1) ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างแท่งแก้วอีเล็คโทรดให้สะอาด ใช้กระดาษทิชชูซับน้ำให้แห้ง

2) ปรับเครื่องวัดพีเอชให้ได้ค่ามาตรฐาน ตามคำแนะนำในคู่มือของเครื่องวัดพีเอช โดยใช้สารละลายพีเอชมาตรฐานที่มีค่าพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชของตัวอย่างน้ำ

3) ล้างแท่งอีเล็คโทรดด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับน้ำให้แห้ง

4) นำแท่งอีเล็คโทรดจุ่มลงในตัวอย่างน้ำ วัดค่าพีเอชและจดบันทึกไว้

5) เมื่อวัดค่าเสร็จแล้ว ล้างหัวอีเล็คโทรดให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง

หมายเหตุ ในการทดลองนี้ปรับค่าพีเอช ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์

3.6.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแขวนลอย (suspended solid ; SS) ตามวิธีของ AOAC (1995)

1) อบกระดาษกรองใยแก้วในเตาอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 103 - 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักกระดาษกรอง

2) เลือกปริมาตรน้ำตัวอย่าง ที่ให้ค่าสารแขวนลอยอย่างน้อยที่สุดประมาณ 2.5 มิลลิกรัม (ไม่รวมน้ำหนักกระดาษกรองใยแก้ว)

3) วางกระดาษกรองลงในกรวยที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ

4) ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียก เพื่อให้ติดแน่นกับกรวย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) เทตัวอย่างน้ำปริมาตรตามต้องการผ่านกระดาษกรอง โดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ

6) ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างของแข็งที่ตกค้างอยู่ข้างกรวยกรองจนหมด รอจนเครื่องดูดน้ำหมด

7) ปิดเครื่องดูดอากาศ ใช้ปากคีบจับกระดาษกรองใส่ภาชนะทนไฟ (กระทงอลูมิเนียม) นำไปอบในเตาอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 - 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

8) ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาน้ำหนักกระดาษกรองที่เพิ่มขึ้น

9) คำนวณหาค่าปริมาณสารแขวนลอย (ภาคผนวก ข. 2)

3.6.2.5 การวิเคราะห์หาค่าความต้องการออกซิเจนของน้ำทิ้งหาได้โดยวิธีทางเคมี (chemical oxygen demand ; COD) โดยวิธี dichromate reflux method ตามวิธีของ AOAC (1995)

1) ชั่งเมอร์คิวรีซัลเฟต ปริมาณ 0.4 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม

2) เติมตัวอย่างน้ำทิ้งที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หรือส่วนของตัวอย่างน้ำทิ้งที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นที่มีซิลเวอร์ซัลเฟตเจือปนอยู่ลงไปปริมาตร 30 มิลลิลิตร

4) เขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันดี นำขวดต่อเข้าเครื่องควบแน่นกลั่นเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นล้างเครื่องควบแน่นด้วยน้ำกลั่นก่อนที่จะถอดเครื่องควบแน่นออกจากขวดแก้วก้นกลม

5) เติมน้ำกลั่นลงในขวดแก้วก้นกลมจนปริมาตร ประมาณ 140 - 150 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6) ไทเทรตสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือ ด้วยสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เฟอโรอินเป็นอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จนกระทั่งสีของส่วนผสมเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่าถึงจุดยุติ

7) ทำแบลงก์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ และดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่างน้ำทิ้งทุกประการ

8) คำนวนหาค่าซีโอดี (ภาคผนวก ข. 3)

3.6.2.6 การวิเคราะห์หาค่าความต้องการออกซิเจนของน้ำทิ้งที่หาได้ โดยกระบวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทางชีววิทยา (biochemical oxygen demand ; BOD) และวิเคราะห์หาค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำทิ้ง (dissolved oxygen ; DO) โดยวิธี iodometric method ตามวิธีของ AOAC (1995)

ก. การเตรียมน้ำสำหรับใช้เจือจาง

1) ตวงน้ำกลั่นให้มีปริมาตรมากกว่าที่ใช้ใส่ในขวดหรือภาชนะที่สะอาด

2) เป่าอากาศที่สะอาด เพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนในน้ำอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

3) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ , แมกนีเซียมซัลเฟต , แคลเซียม-คลอไรด์ และเฟอริกคลอไรด์ตามลำดับ ใช้สารละลายแต่ละชนิดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ข. การเตรียมตัวอย่างน้ำที่จะวิเคราะห์หาค่าบีโอดี

1) วัดพีเอชของน้ำทิ้ง และปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ถ้าน้ำทิ้งมีคลอรีนอยู่มากต้องกำจัด โดยใช้โซเดียมซัลไฟต์ โดยมีวิธีการคำนวณปริมาตรที่ต้องเติมดังนี้ นำน้ำทิ้ง (ปริมาตร 100 - 1,000 มิลลิลิตร) เติมกรดอะซิติก (1+1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.0125 โมลาร์ โดยใช้น้ำแป้งเป็นอินดิเคเตอร์ ก็จะทราบปริมาณโซเดียมซัลไฟต์ที่ใช้เติมลงในตัวอย่างน้ำ กวนให้เข้ากันทิ้งไว้นาน 10 - 20 นาที

2) ในกรณีที่น้ำทิ้งมีความสกปรกสูง จำเป็นต้องทำให้น้ำทิ้งเจือจางลง เลือกเปอร์เซ็นต์ในการเจือจางที่คาดว่าจะให้ค่าบีโอดีอยู่ในช่วงที่กำหนด และเลือกเปอร์เซ็นต์ที่เจือจางสูงกว่าและต่ำกว่าที่อยู่ติดกันอีก 2 ขั้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องรู้ค่าบีโอดีโดยประมาณ ซึ่งอาจจะหาได้จากค่าซีโอดี (ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ของซีโอดี) (ภาคผนวก ค.)

3) ค่อย ๆ รินน้ำเจือจาง ปริมาตร 300 - 500 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวงขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยพยายามอย่าให้มีฟองอากาศ เติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ในกรณีที่จำเป็นต้องเติม)

4) เติมน้ำทิ้งจำนวนที่ต้องการลงไป เติมน้ำเจือจางจนปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนค่อย ๆ จากนั้นนำน้ำไปใส่ขวดบีโอดี 3 ขวด จนเต็ม (อย่าให้มีฟองอากาศ) ปิดจุกขวด

5) นำขวดบีโอดี 1 ขวด ของแต่ละเปอร์เซ็นต์ความเจือจางไปหาค่าออกซิเจนละลาย (DO) เพื่อให้ทราบค่าออกซิเจนละลายที่เริ่มต้น (D_1)

6) นำขวดบีโอดีสองขวดที่เหลือของแต่ละเปอร์เซ็นต์ความเจือจาง ไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ20องศาเซลเซียสเป็นเวลา5วันจากนั้นนำออกมาหาค่าออกซิเจนละลายที่เหลือ (D_2)

ค. การหาค่าออกซิเจนที่ละลาย (DO)

1) จากน้ำทิ้งในขวดบีโอดี เติมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายอัลคาไล-ไอโอไดด์-เอไซด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลงไปทันทีโดยให้ปลายปิเปตอยู่ใต้ผิวของน้ำ

2) ปิดจุกขวดบีโอดีระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จับขวดคว่ำขึ้นลงอย่างน้อย 15 ครั้ง

3) ตั้งขวดบีโอดีไว้ให้ตะกอนที่เกิดขึ้นตกตะกอนจนได้ปริมาณน้ำใส ½ ของขวดเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยให้กรดค่อย ๆ ไหลลงไปตามคอขวดปิดจุกแล้วเขย่าขวดจนตะกอนละลายหมด

4) ตวงสารละลายที่ได้ปริมาตร 201 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร

5) ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายมีสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 2 - 3 หยด จะได้สีน้ำเงินเข้ม ไทเทรตจนกระทั่งสีน้ำเงินหายไป จดปริมาตรสารละลายมาตรฐานที่ใช้ทั้งหมด

6) คำนวณหาค่าบีโอดี (ภาคผนวก ข. 4)

หมายเหตุ ต้องทำการวิเคราะห์หาค่าซีโอดี และค่าบีโอดี ของตัวอย่างน้ำทิ้งก่อนและหลังการวิจัย

3.6.2.7 การวิเคราะห์หาค่าไขมันและน้ำมัน (fat oil and grease) โดยวิธีสกัดด้วยกรวยแยก (partition gravimetric method) ตามวิธีของ AOAC (1995)

1) เทตัวอย่างน้ำทิ้งปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้นจนพีเอชน้อยกว่า 2 (หรือประมาณ 2 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่างน้ำทิ้งปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

2) เทตัวอย่างน้ำทิ้งจากบีกเกอร์ใส่กรวยแยก เติมเฮกเซน ปริมาตร 10 – 15 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงประมาณ 2 นาที ตั้งทิ้งไว้สารผสมจะแยกชั้น ชั้นเฮกเซนจะอยู่ส่วนบน ส่วนตัวอย่างน้ำทิ้งจะอยู่ส่วนล่าง

3) ถ่ายชั้นตัวอย่างน้ำทิ้งไว้ในบีกเกอร์เดิม เพื่อนำมาสกัดอีก

4) ถ่ายชั้นของเฮกเซนซึ่งมีไขมันและน้ำมันละลายอยู่ ผ่านกรวยกรองที่มีโซเดียมซัลเฟตบนกระดาษกรองลงในจานระเหย ซึ่งทำให้แห้งโดยมีน้ำหนักคงที่และได้ชั่งน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไว้แล้ว สมมติเป็น A กรัม

5) ทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีเดียวกันนี้อีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งไขมันและน้ำมันถูกสกัดออกจากตัวอย่างหมด

6) นำจานระเหยซึ่งมีเฮกเซน , ไขมันและน้ำมันละลายอยู่ไประเหยเอาเฮกเซนออกบนเครื่องอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนแห้งปราศจากความชื้นแล้วปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ประมาณ 30 นาที นำไปชั่งน้ำหนักสมมติเป็น B กรัม

7) คำนวณหาค่าไขมันและน้ำมัน (ภาคผนวก ข. 5)

3.6.2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณเกลือ (NaCl) โดยวิธี back titration ตามวิธีของ AOAC (1995)

1) ปิเปตน้ำทิ้ง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสต์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2) เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3) เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ลงในฟลาสก์ให้มากเกินพอที่จะทำปฏิกิริยากับคลอไรด์ในน้ำทิ้ง

4) นำไปต้มบนเตาไฟฟ้า โดยเติมกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร

5) ต้มจนสารละลายในฟลาสก์เหลือปริมาตร 50 มิลลิลิตร

6) ทิ้งให้เย็น ล้างตะกอนของซิลเวอร์ไนเตรตข้าง ๆ ฟลาสก์ด้วยน้ำกลั่น

7) เติม Ferric alum เป็นอินดิเคเตอร์ 3-5 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตด้วยสารละลายแอมโมเนียมไธโอไซยาเนต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล เมื่อถึงจุดยุติจะมีสีส้มอ่อนจด ปริมาตรที่ใช้ในการไทเทรต

8) คำนวณหาค่าปริมาณเกลือ (ภาคผนวก ข. 6)

3.6.3 การศึกษาหาอัตราการเจริญ และ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium

3.6.3.1 เตรียมหัวเชื้อ (inoculum starter)

1) ใช้เข็มแตะเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 จาก MRS agar อายุ 4 วัน 1 – 2 needle มาใส่ลงใน complete medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ดูความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร

3.6.3.2 เปรียบเทียบระหว่างหัวเชื้อ 2 , 3 , 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เหมาะสมในการใช้เป็นหัวเชื้อ โดยมีค่า OD_{660} เริ่มต้น 0.4

1) เติมหัวเชื้อ จากข้อ 3.6.3.1 ปริมาณ 2 , 3 , 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี complete medium ปริมาตรฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร

2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า

3) วัดอัตราการเจริญของเชื้อทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับอาหารที่ไม่มีเชื้อ

4) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ เทียบกับเวลา

5) ใช้หัวเชื้อที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดเป็นหัวเชื้อ ในการทดลองต่อไป

3.6.4 การศึกษาหาแหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446

3.6.4.1 เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในอาหาร complete medium กับน้ำทิ้ง โดยกำหนดการทดลองเป็นดังนี้

การทดลองที่ 1 อาหาร complete medium

การทดลองที่ 2 น้ำทิ้ง

การทดลองที่ 3 น้ำทิ้งเติมแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณเท่ากับ complete medium)

การทดลองที่ 4 น้ำทิ้งเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ yeast extract ปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณเท่ากับ complete medium)

การทดลองที่ 5 น้ำทิ้งเติมน้ำตาลกลูโคส และ yeast extract ปริมาณ 1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการทดลองที่ 3 ถึง 5 นำมาเติมแหล่งธาตุอาหารอื่น ๆ เช่นเดียวกับ complete medium

1) เทอาหารที่เตรียมได้แต่ละการทดลองลงในฟลาสก์ ขนาด 250

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 50 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 7.0 ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

2) เติมหัวเชื้อที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.6.3.2 ลงไปในแต่ละฟลาสก์

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า

4) วัดอัตราการเจริญของเชื้อทุก ๆ 24 ชั่วโมง โดยวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เทียบกับอาหารที่ไม่เติมเชื้อ

5) นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต ของเชื้อเทียบกับเวลา

3.6.4.2 การศึกษาหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

1) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณกลูโคสต่างกัน คือ 0 , 0.5 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 4.0 , 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแหล่งธาตุอาหารอื่น ๆ ปริมาณเดียวกับในอาหาร complete medium

2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.4.1

3.6.4.3 การศึกษาหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

1) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มี yeast extract , acid hydrolysate of casein และ pancreatic digest of casein ปริมาณต่าง ๆ กัน ดังนี้

ปริมาณ (เท่า)	yeast extract (กรัม/ลิตร)	acid hydrolysate of casein (กรัม/ลิตร)	pancreatic digest of casein (กรัม/ลิตร)
0	0	0	0
0.5	2.5	0.5	0.75
1.0	5.0	1.0	1.5
2.0	10.0	2.0	3.0
3.0	15.0	3.0	4.5

โดยมีแหล่งคาร์บอนในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.6.4.2 และแหล่งธาตุอาหารอื่นๆ ปริมาณเดียวกับในอาหาร complete medium

2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.4.4 การศึกษาหาปริมาณของแร่ธาตุที่เหมาะสม

1) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีแร่ธาตุ NaH_2PO_4 , $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ และ $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณต่างกันดังนี้

ปริมาณ (เท่า)	NaH_2PO_4 (กรัม/ลิตร)	$K_3PO_4 \cdot 3H_2O$ (กรัม/ลิตร)	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (กรัม/ลิตร)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (มิลลิกรัม/ลิตร)	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ (มิลลิกรัม/ลิตร)
0	0	0	0	0	0
0.5	0.8	0.8	0.2	5.0	6.0
1.0	1.6	1.6	0.4	10.0	12.0
2.0	3.2	3.2	0.8	20.0	24.0
3.0	4.8	4.8	1.2	30.0	36.0

โดยมีแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในปริมาณเหมาะสม ที่ศึกษาได้จากเบื้องต้นและแหล่งธาตุอาหารอื่น ๆ ปริมาณเดียวกับในอาหาร complete medium

2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.4.1

3.6.4.5 การศึกษาหาปริมาณของแพนโททีนิกและไบโอตินที่เหมาะสม

1) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีแพนโททีนิกและไบโอติน ปริมาณต่างกัน ดังนี้

ปริมาณ (เท่า)	แพนโททีนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ไบโอติน (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	0	0
0.5	2.0	0.15
1.0	4.0	0.3
2.0	8.0	0.6
3.0	12.0	0.9

โดยมีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้จากเบื้องต้น

2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.4.6 การศึกษาหาปริมาณของวิตามินบี 2 ที่เหมาะสม

1) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีวิตามินบี 2 ปริมาณต่างกัน ดังนี้ 0 , 1 , 5 , 10 , 25 , 50 , 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ แพนโททีนิก และไบโอติน ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้จากเบื้องต้น

2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.4.1

3.6.4.7 การศึกษาหาปริมาณของเมทธิโอนินที่เหมาะสม

1) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีเมทธิโอนิน ปริมาณต่างกันดังนี้ 0 , 75 , 150 , 220 , 450 , 750 , 1500 และ 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ แพนโททีนิก ไบโอติน และวิตามินบี 2 ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้จากเบื้องต้น

2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.4.1

3.6.4.8 การศึกษาหาปริมาณของไกลซีนที่เหมาะสม

1) เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีไกลซีน ปริมาณต่างกันดังนี้ 0 , 0.3 , 0.5 , 1 ,2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ แพนโททีนิก ไบโอติน วิตามินบี 2 และเมทธิโอนิน ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้จากเบื้องต้น

2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.4.1

3.6.5 การหาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเชื้อ (ค่า OD) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry weight cell)

3.6.5.1 นำหัวเชื้อที่มีอัตราการเจริญและปริมาณเซลล์สูงสุดจากข้อ 3.6.3.2มาเลี้ยงในน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารที่ทำการศึกษา จนได้ปริมาณเซลล์สูงสุด โดยนำมาวัดค่า OD_{660}แล้วแบ่งใส่หลอด centrifuge จำนวน 2 หลอด ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนที่เหลือมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 1 , 1 : 3 , 1 : 5 , 1 : 7 และ 1 : 10 จากนั้นนำไปวัดค่า OD_{660} และแบ่งใส่หลอด centrifuge ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วนละ 2 หลอด) จึงนำหลอด centrifuge ทั้ง 12 หลอด ไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

3.6.5.2 รินน้ำออกให้เหลือแต่ตะกอน เติมน้ำกลั่นหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าหลอดผสมสาร(cyclo mixer) จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์อีก 3 ครั้ง เพื่อล้างเซลล์จุลินทรีย์

3.6.5.3 เมื่อได้ตะกอนเซลล์ครั้งสุดท้าย เติมน้ำกลั่นหลอดละ 5 มิลลิลิตร เขย่าทำเป็นสารแขวนลอย (suspension)

3.6.5.4 อบจานระเหย (evaporating dish) ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทำให้เย็นเท่ากับอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

3.6.5.5 เทสารแขวนลอยที่ได้ลงในจานระเหย หลอดละ 1 จาน

3.6.5.6 นำเข้าตู้อบความร้อนแห้ง อุณหภูมิ 103 - 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3.6.5.7 ปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

3.6.5.8 นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความขุ่นของเชื้อ (ค่า OD) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.6.6 การศึกษาวิธีการตรึง *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนท

3.6.6.1 ถ่ายหัวเชื้อที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.6.3.2 ลงใน complete medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นปิเปต suspension มา 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.6.6.2 วิธีการตรึงเซลล์

1) นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้ ใส่บีกเกอร์ เติมน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายโซเดียมแอลจิเนท ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

2) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายเจลฉีดผ่านรูเข็มขนาด 0.8 × 38 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อุณหภูมิประมาณ 10 - 15 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วค่อนข้างคงที่ 10 มิลลิลิตรต่อนาที เม็ดเจลของแคลเซียมแอลจิเนท จะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ขนาดของเม็ดเจลสามารถปรับให้มีขนาดความต้องการด้วยขนาดและความเร็วของการหยด นำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียม-คลอไรด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอด-เชื้อก่อนนำ ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ทุกขั้นตอนของวิธีการตรึงเซลล์ ข้อ3.6.6 ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

3.6.7 การเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า (stationary flask) กับระดับถังหมักแบบแบช (batch fermentation)

3.6.7.1 การเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี12 ของเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมัก ในอาหาร complete medium

1) ใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน เลี้ยงในอาหาร complete medium ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาสเซลเซียส

2) ใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน เลี้ยงในอาหาร complete medium ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยใบพัด 100 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศ

3) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12

3.6.7.2 การเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี12 ของเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมัก ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 3.6.4

1) ใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน เลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2) ใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน เลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยใบพัด 100 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศ

3) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12

3.6.7.3 การเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนทในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถังหมัก

1) ใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน เลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยใบพัด 100 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศ

2) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12

หมายเหตุ ทำการเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในชั่วโมง 48

3.6.8 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12

การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ในส่วนของ filtrate , ส่วนสกัดจากเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระ โดยวิธี turbidimetric method of microbiological assay (AOAC , 1995) ใช้เชื้อ *Lactobacillus leichmannii* TISTR 785 เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ และใช้ assay medium

3.6.8.1 การเตรียมเครื่องแก้วที่ใช้

เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12 ต้องแช่ใน cleaning solution นาน 6 - 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปาจนหมดกรด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทำให้แห้ง นำเข้าตู้อบความร้อนแห้ง ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

3.6.8.2 การเตรียมเชื้อ *Lactobacillus leichmannii* TISTR 785

ถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงในอาหาร Bacto B_{12} Culture Agar USP ของ Difco โดยวิธี stab บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อต่อเนื่องกัน 7 ครั้ง เพื่อให้อยู่ในสภาพ active

3.6.8.3 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum)

ถ่ายเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.8.2 ลงในอาหารเหลวสูตร Bacto B_{12} Inoculum Broth USP ของ Difco ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงให้เซลล์ตกที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 - 20 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร กระจายเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเวลาและความเร็วเท่าเดิม ล้างเซลล์ 3-4 ครั้ง แล้วนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น OD_{600} ประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.045 ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์

3.6.8.4 การเตรียมสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐาน

1) วิธีเตรียม stock solution ละลายผลึกของวิตามินบี 12 (cyanocobalamin) ของบริษัท Merck Co., Inc. 1 มิลลิกรัม และโพแทสเซียมไซยาไนด์ 1 กรัมในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดูดใส่แอมพูล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลอมปลายแอมพูลให้ติดกัน นำไปต้มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะได้วิตามินบี 12 ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

2) วิธีเตรียม working solution ของวิตามินบี 12 วิธีเตรียม solution A โดยเปิดแอมพูล ดูดสารละลายวิตามินบี 12 จากแอมพูลปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร จะได้วิตามินบี 12 ที่มีความเข้มข้น 5×10^{-2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนวิธีเตรียม solution B โดยปิเปตต์ solution A มาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร จะได้ working solution ที่มีวิตามินบี 12 ความเข้มข้น 5×10^{-5} ไมโคกรัมต่อมิลลิลิตร

3.6.8.5 การเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

สำหรับตัวอย่างวิเคราะห์ที่เป็น filtrate ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนตัวอย่างวิเคราะห์ที่ต้องสกัดออกจากเซลล์ ในกรณีของเซลล์ที่ถูกตรึง ชั่งตัวอย่างเจลหนัก 1 กรัม และตัวอย่างที่เซลล์อยู่ในสภาพอิสระ (วิเคราะห์ total vitamin B_{12}) ปิเปตต์ตัวอย่าง มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์อะซิเตทบัฟเฟอร์ (โพแทสเซียมไซยาไนด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.5) ให้ปริมาตรได้ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่องผสมสาร แล้วนำเข้าหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเศษเซลล์ออกจากสารละลายด้วยแรงเหวี่ยง 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 - 20 นาที นำส่วนสารละลายใสไปวิเคราะห์ โดยทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ปริมาณวิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่อ่านค่าได้

3.6.8.6 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินบี 12

การทำ standard calibration curve โดยปิเปตต์ working standard solution B ของวิตามินบี 12 ซึ่งมีวิตามินบี 12 เข้มข้น 5×10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ใช้ในการวิเคราะห์ ปริมาตร 0 , 0.1 , 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 และ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1.5 มิลลิลิตร เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

assay medium หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรรวมเป็น 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลอง แต่ละหลอดทำ 3 ซ้ำ

สำหรับตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ปิเปตต์ตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดที่วิเคราะห์ปริมาตร 0.2 , 0.5 , และ 1.0 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1.5 มิลลิลิตร เติม assay medium หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลอง แต่ละหลอด
ทำ 3 ซ้ำ

นำหลอดมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์และหลอดตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และทำให้เย็นทันที

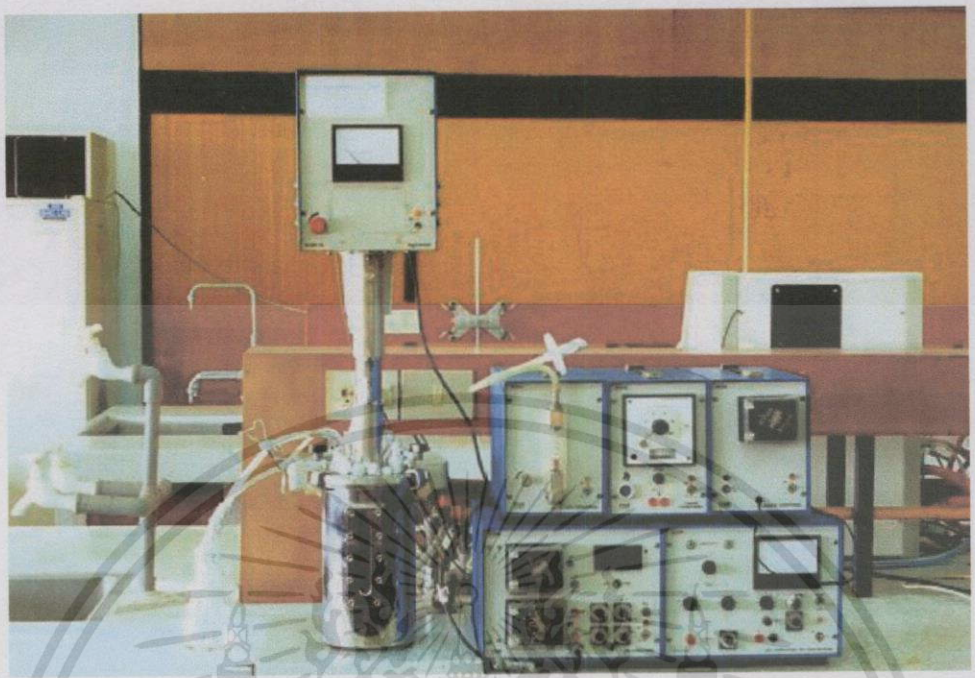
ในการวิเคราะห์วิตามินบี 12 จะต้องทำ standard calibration curve พร้อมกันไปทุกครั้ง เนื่องจากสภาพนึ่งฆ่าเชื้อและอุณหภูมิที่ใช้บ่ม มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ

3.6.8.7 การ inoculate เชื้อ *Lactobacillus leichmannii* TISTR 785

นำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.6.8.2 มาเพาะเลี้ยงในหลอดมาตรฐาน และหลอดตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ยกเว้นหลอดที่เป็นแบลงก์ ปิดฝาหลอดทดลอง นำหลอดทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร อ่านค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละหลอด

เขียนกราฟจากหลอดที่ใช้เป็นมาตรฐาน กำหนดให้แกนนอนเป็นปริมาณวิตามินบี 12 แกนตั้งเป็นค่า OD_{660} คำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12 ในหลอดตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข. 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 การผลิตวิตามินบี 12 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้ง

วิเคราะห์หาปริมาณสารในน้ำทิ้ง 3 แหล่ง ได้แก่

4.1.1 น้ำล้างหลังการตัดหัวปลา

4.1.2 น้ำล้างหลังการแล่เนื้อปลา

4.1.3 น้ำทิ้งรวม

พบว่าแหล่งน้ำทิ้งรวมมีปริมาณสารอาหารสูงที่สุด โดยมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 2.219 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 180.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณเกลือเท่ากับ 0.769 เปอร์เซ็นต์ และค่าพีเอช 6.78 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในน้ำทิ้งรวมมีแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน ที่เป็นอาหารของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในปริมาณสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำทิ้งรวมเป็นแหล่งอาหารสำหรับการทดลองต่อไป

4.2 ผลการศึกษาอัตราการเจริญและปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

4.2.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium เพื่อใช้สำหรับเตรียมหัวเชื้อ

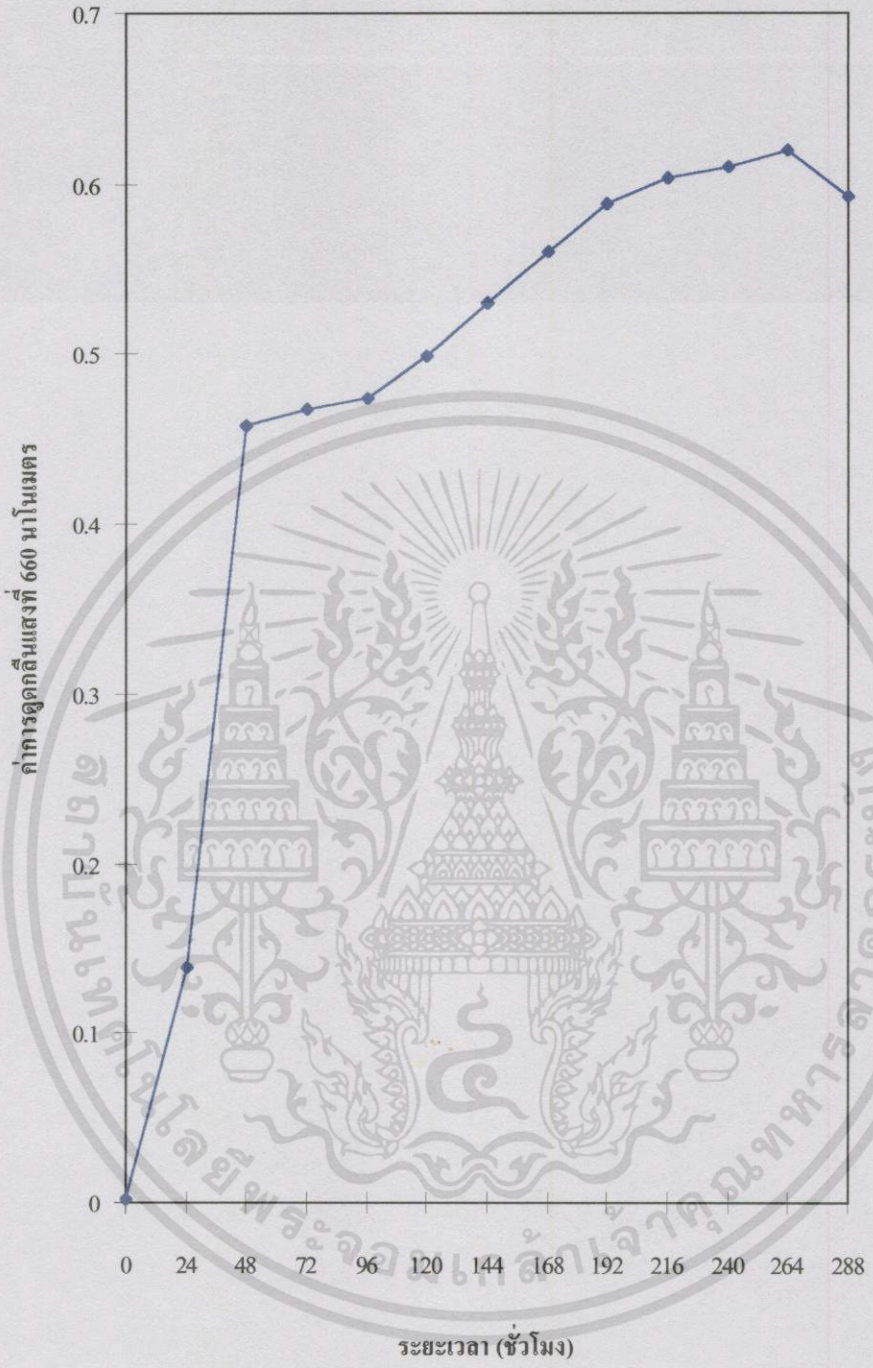
จากการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium สำหรับเตรียมหัวเชื้อพบว่า ต้องใช้เวลา 264 ชั่วโมง จึงถึงระยะที่เชื้อมีการเจริญสูงสุด (ภาพที่ 4.1) และให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.0041 ต่อชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วง Logarithmic phase เป็นช่วงที่มีกิจกรรมภายในเซลล์สูงสุด ดังนั้นจึงใช้เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่มีค่าความขุ่นของเชื้อประมาณ 0.4 อายุ 48 ชั่วโมง ในการเตรียมหัวเชื้อสำหรับการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำทิ้ง

ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้	แหล่งน้ำที่ทำการวิเคราะห์		
	น้ำล้างหลังการตัดหัวปลา	น้ำล้างหลังการแล่เนื้อปลา	น้ำทิ้งรวม
ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	1.499	1.387	2.219
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	39.14	3.78	180.47
ค่าพีเอช	6.76	6.88	6.78
ปริมาณสารแขวนลอย (มิลลิกรัม/ลิตร)	110	51	515
ค่าซีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)	2,070	121	7,120
ค่าบีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)	1,508	38	5,700
ปริมาณไขมันและน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)	116.82	4.87	383.54
ปริมาณเกลือ (เปอร์เซ็นต์)	1.042	0.688	0.769

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium เพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อ ภายใต้ภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในอาหาร complete medium

จากการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 2 , 3 , 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร complete medium พบว่า หัวเชื้อเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญสูงสุดเมื่อใช้เวลา 264 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.2) นอกจากนั้น ยังให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด ในช่วงชั่วโมงที่ 0 – 48 คือ 0.0034 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกหัวเชื้อ 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมและนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 ผลการศึกษาแหล่งธาตุอาหารที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

4.3.1 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในอาหารระหว่าง complete medium กับน้ำทิ้ง

จากการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อในอาหาร complete medium , น้ำทิ้ง , น้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส , น้ำทิ้งที่เติม yeast extract และ น้ำทิ้งที่เติมทั้งน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract ในปริมาณที่เท่ากับ complete medium พบว่า น้ำทิ้งที่เติมทั้งน้ำตาลกลูโคสและ yeast extract มีอัตราการเจริญที่สูงกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ ในช่วงชั่วโมงที่ 0 – 24 คือ 0.0143 ต่อชั่วโมง (ภาพที่ 4.3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้น้ำทิ้งเป็นอาหารจะต้องเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนให้เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ

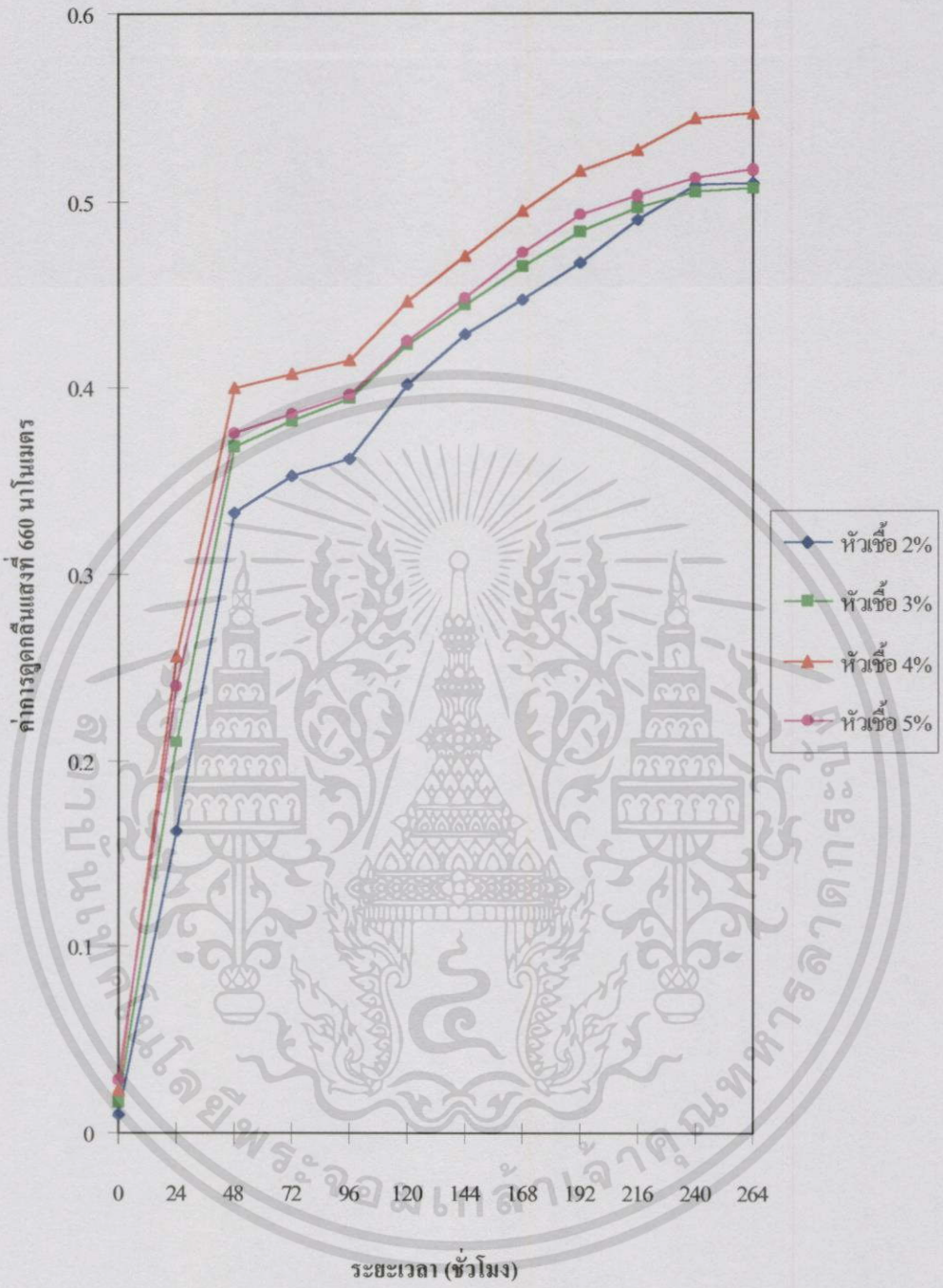
4.3.2 ผลการศึกษาหาปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารน้ำทิ้งที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เติมลงไปจาก 0.5 , 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารน้ำทิ้งที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส สามารถแสดงผลการทดลองได้ดังภาพที่ 4.4 ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญของเชื้อในอาหารน้ำทิ้งที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุดเพราะมีอัตราการเจริญสูงสุด และเมื่อนำมาวิเคราะห์จะได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในช่วงชั่วโมงที่ 0 – 24 คือ 0.0139 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ระดับนี้สำหรับการทดลองต่อไป

4.3.3 ผลการศึกษาหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

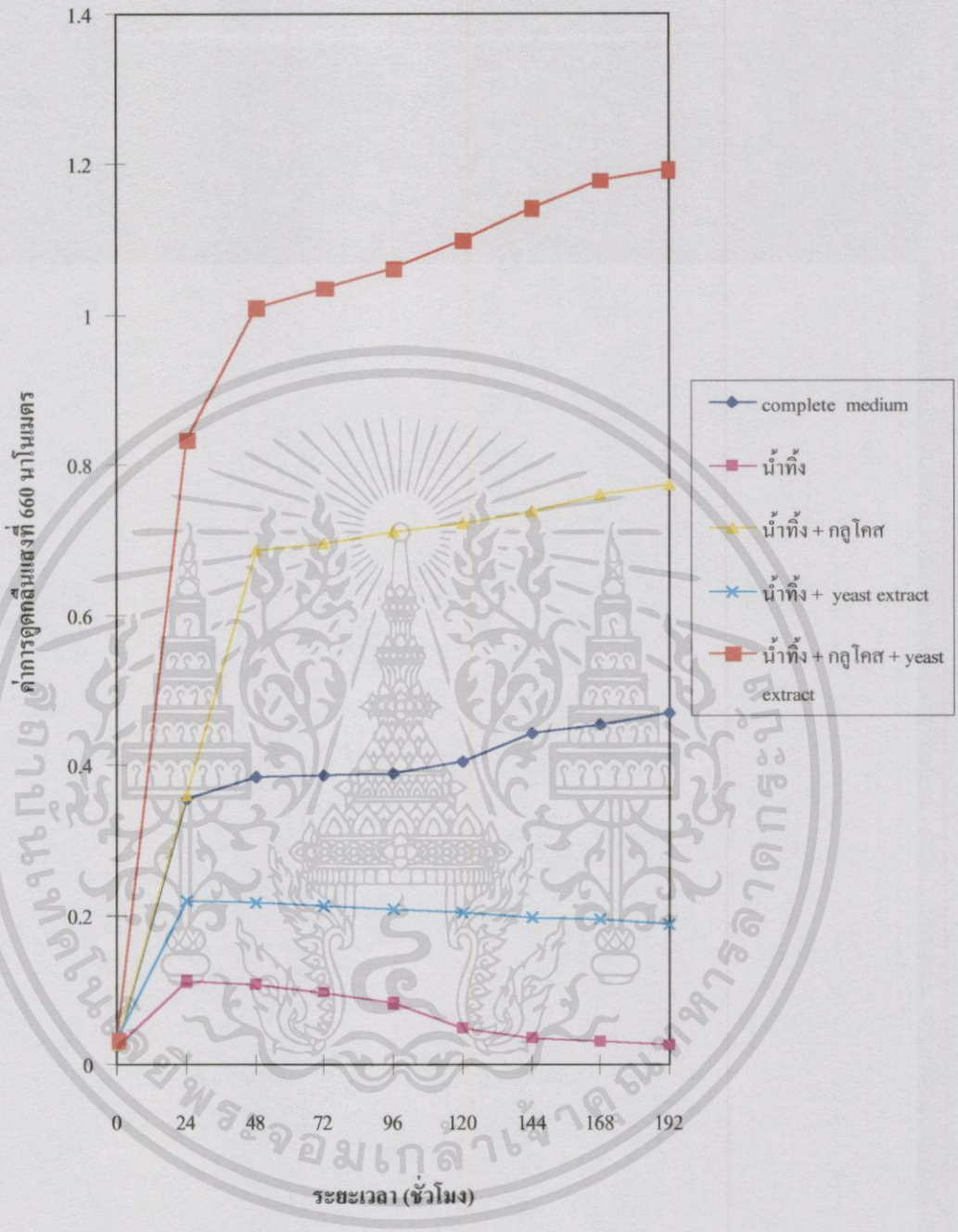
แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองนี้มี 3 ชนิด คือ yeast extract , acid hydrolysate of casein และ pancreatic digest of casein จึงทดลองเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งที่ขาดแหล่งธาตุไนโตรเจนชนิดใดชนิดหนึ่ง พบว่า yeast extract มีผลต่อการเจริญของเชื้อมากเพราะเมื่ออาหารขาด yeast extract อัตราการเจริญของเชื้อจะต่ำกว่าเมื่อขาด acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



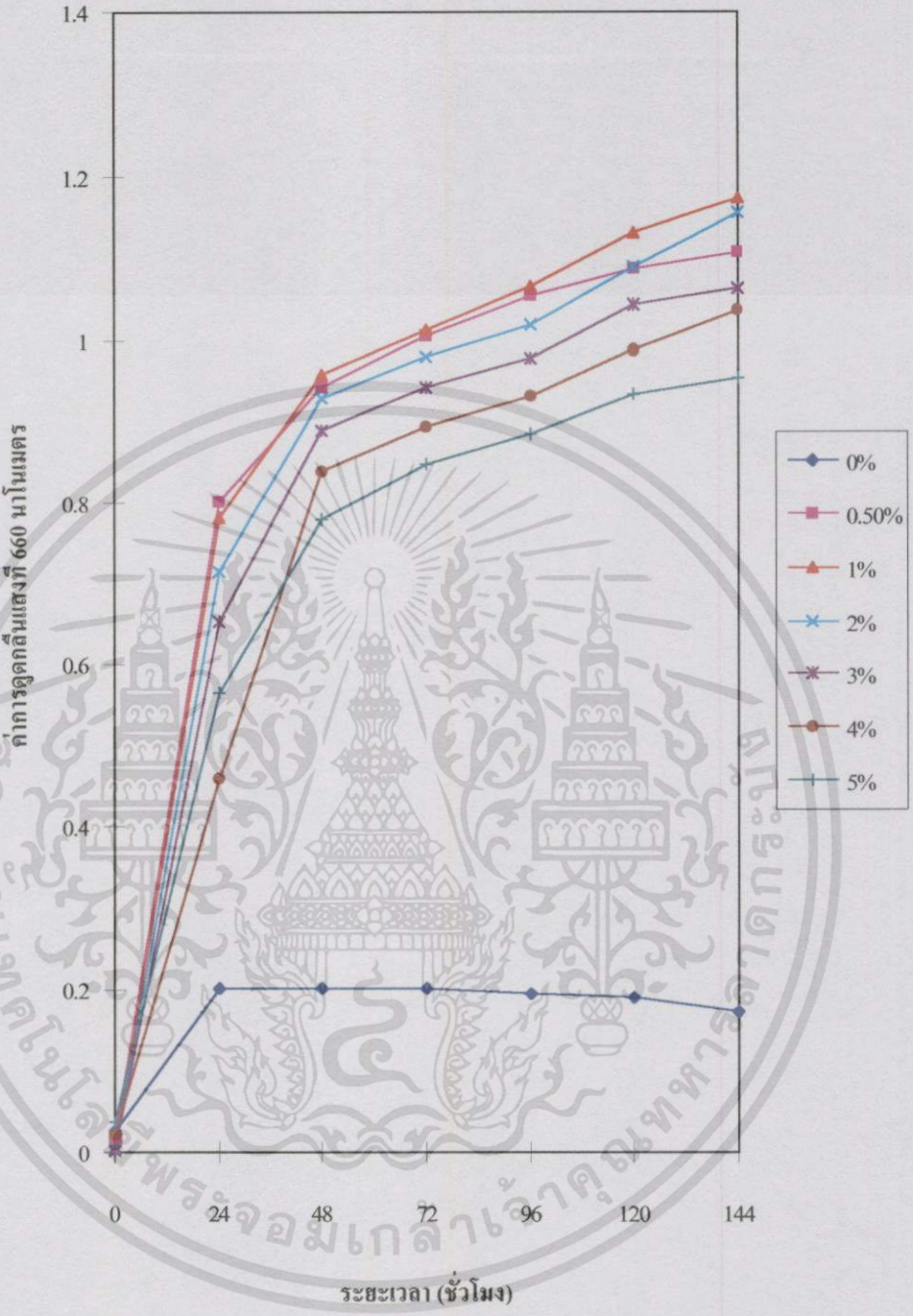
ภาพที่ 4.2 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium ที่มีปริมาณหัวเชื้อต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหาร complete medium , น้ำทิ้ง , น้ำทิ้งเติมแหล่งคาร์บอน และน้ำทิ้งเติมแหล่งไนโตรเจน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hydrolysate of casein และ pancreatic digest of casein ตามลำดับ แสดงว่า yeast extract ประกอบด้วยธาตุอาหารไนโตรเจน และ growth factor หลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อ ส่วนอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุไนโตรเจนครบทั้ง 3 ชนิด จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งธาตุไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด ที่มีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ

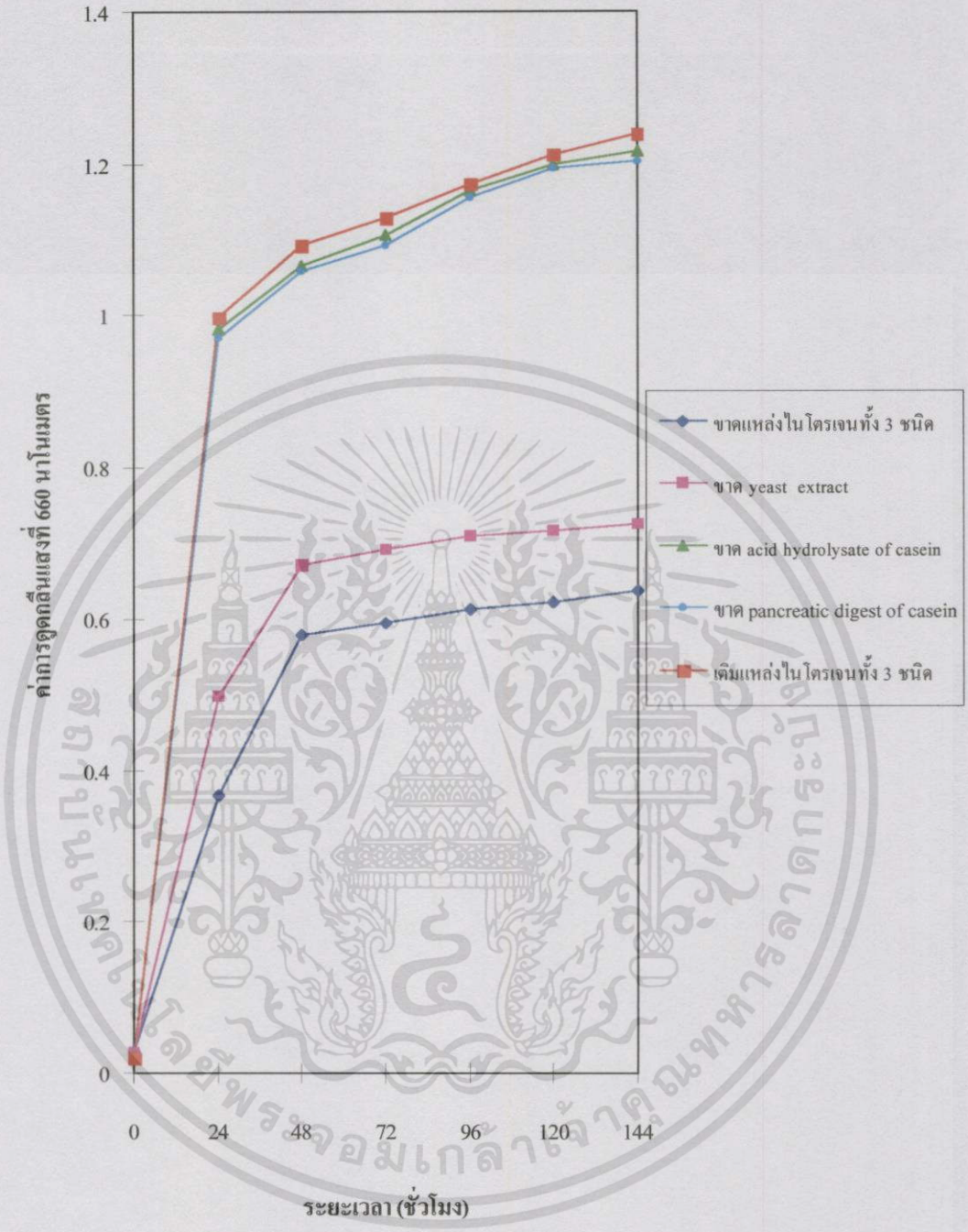
จากการทดลองเมื่อเติมแหล่งธาตุไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด ปริมาณต่าง ๆ กันลงในอาหารน้ำทิ้ง พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด 0.0172 ต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 6 วัน ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดเป็นปริมาณ 2 เท่าของปริมาณที่เติมในอาหาร complete medium ได้แก่ yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ , acid hydrolysate of casein 0.2 เปอร์เซ็นต์ , pancreatic digest of casein 0.3 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนประกอบอื่น ๆ ในปริมาณเท่าเดิม (ภาพที่ 4.6) จากการศึกษาของ Walter และ Aldrich (1970) รายงานว่า acid hydrolysate of casein และ pancreatic digest of casein เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่สำคัญในการผลิตวิตามินบี 12 ช่วยกระตุ้นให้เซลล์สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงขึ้น

4.3.4 ผลการศึกษาหาปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสม

จากการศึกษาอิทธิพลของแร่ธาตุโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4) โพแทสเซียมฟอสเฟต ($K_3PO_4 \cdot 3H_2O$) , แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) , เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) และโคบอลท์ซัลเฟต ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$) ในอาหารน้ำทิ้งที่มีน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ , yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ , acid hydrolysate of casein 0.2 เปอร์เซ็นต์ , pancreatic digest of casein 0.3 เปอร์เซ็นต์ และส่วนประกอบอื่น ๆ ในปริมาณเท่าเดิม โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารน้ำทิ้งที่ขาดแร่ธาตุชนิดใดชนิดหนึ่งที่กล่าวมาแล้ว อาหารน้ำทิ้งที่ไม่เติมแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิดนี้ และอาหารน้ำทิ้งที่เติมแร่ธาตุครบทุกชนิด พบว่า อาหารน้ำทิ้งที่ขาดโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมฟอสเฟต แมกนีเซียมคลอไรด์ และเฟอรัสซัลเฟต เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อน้อยมาก โดยอัตราการเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกับอาหารน้ำทิ้งที่เติมแร่ธาตุครบทุกชนิด ในขณะที่อาหารน้ำทิ้งที่ขาดโคบอลท์ซัลเฟตจะมีอัตราการเจริญต่ำสุดเมื่อเทียบกับอาหารน้ำทิ้งที่ขาดแร่ธาตุอื่น ๆ อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของเชื้อยังคงสูงอยู่เนื่องจากอาหารที่ใช้เป็น preculture มีการเติมโคบอลท์ซัลเฟตด้วยทำให้มีการสะสมโคบอลท์ในตัวเซลล์ ส่วนอาหารน้ำทิ้งที่ไม่เติมแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด จะมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับอาหารน้ำทิ้งที่ขาดโคบอลท์ซัลเฟต ดังแสดงในภาพที่ 4.7

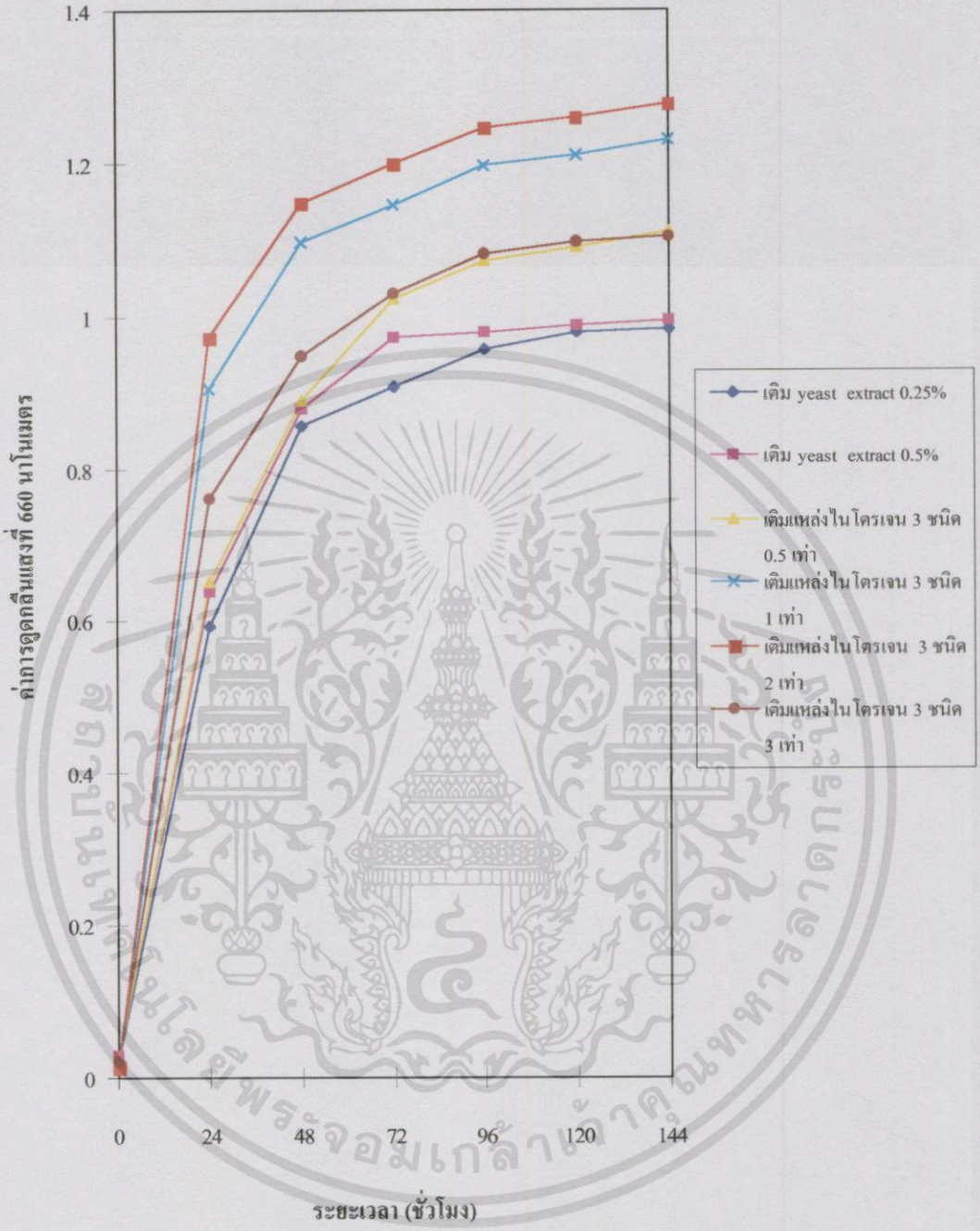
ผลการศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียมฟอสเฟต แมกนีเซียมคลอไรด์ เฟอรัสซัลเฟต และโคบอลท์ซัลเฟต ในอาหารน้ำทิ้งปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่าโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมฟอสเฟต 1.6 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



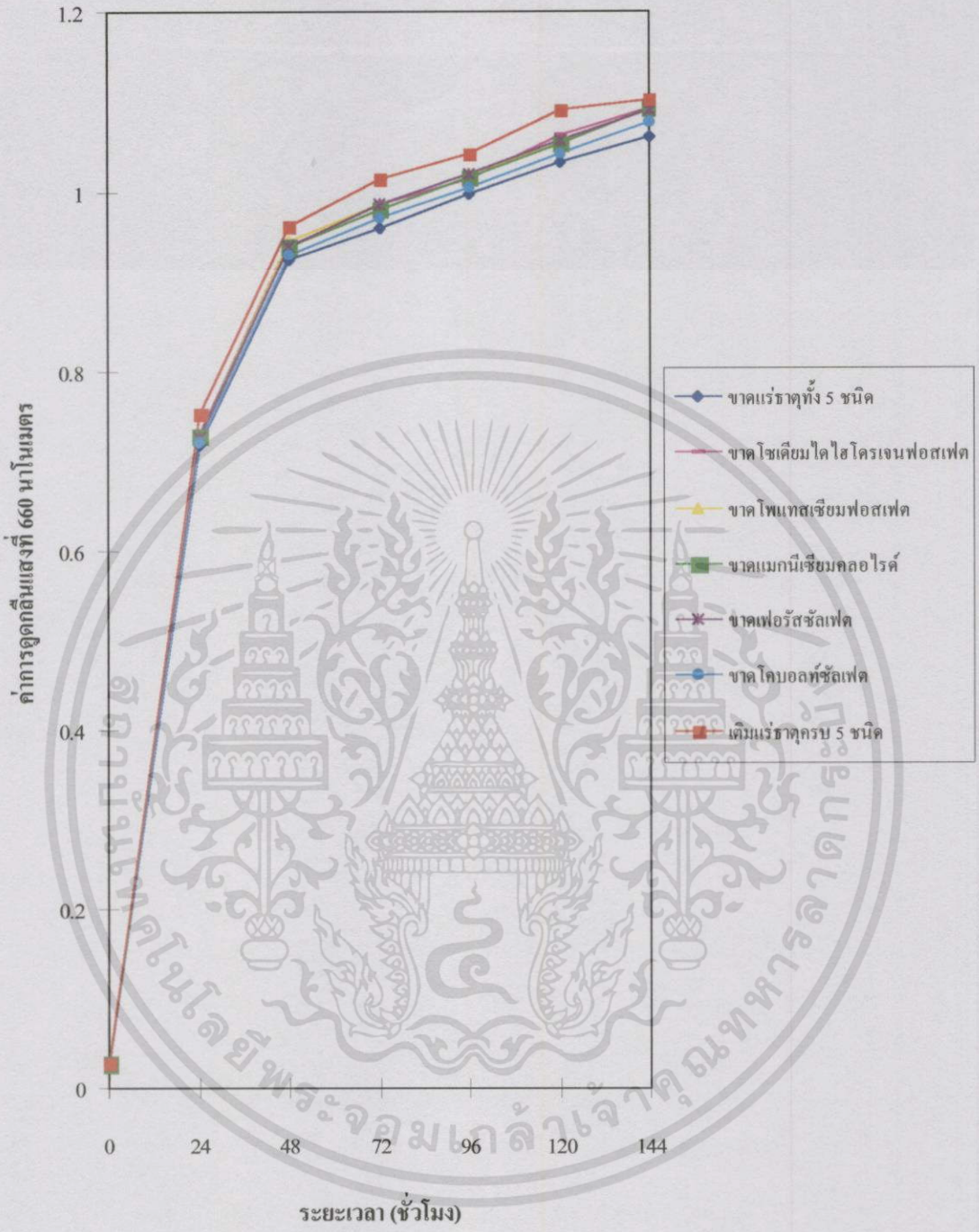
ภาพที่ 4.5 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีแหล่งแร่ธาตุครบ 5 ชนิด ความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.4 กรัมต่อลิตร เฟอรัสซัลเฟต 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และโคบอลท์ซัลเฟต 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณเดียวกับในอาหาร complete medium จะให้อัตราการเจริญสูงกว่าอาหารที่เติมแร่ธาตุทั้ง 5 ชนิด ในปริมาณเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณที่เหมาะสมนี้เล็กน้อย (ภาพที่ 4.8) ดังนั้นจึงเลือกใช้แร่ธาตุทั้ง 5 ชนิดในปริมาณที่ระดับเหมาะสมนี้สำหรับการทดลองต่อไป

4.3.5 ผลการศึกษาหาปริมาณของแพนโททีนิกและไบโอตินที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำทิ้งซึ่งมีส่วนประกอบต่าง ๆ ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้ในเบื้องต้นและเติมแพนโททีนิก 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือไบโอติน 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างใดอย่างหนึ่งเปรียบเทียบกับอาหารน้ำทิ้งที่เติมทั้งแพนโททีนิกและไบโอตินในปริมาณดังกล่าว และอาหารน้ำทิ้งที่ไม่เติมทั้ง 2 ชนิด พบว่าอาหารน้ำทิ้งที่เติมแพนโททีนิกและไบโอตินจะมีอัตราการเจริญสูงสุด (ภาพที่ 4.9) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่าสถิติ (ภาคผนวก จ.) พบว่าอาหารน้ำทิ้งที่เติมแพนโททีนิกและไบโอตินต่างกัน จะมีอัตราการเจริญของเชื้อที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของ Zodrow และคณะ (1963) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียโพรพิโอนิกในอาหารที่เติมแพนโททีนิกจะช่วยเพิ่มการผลิตวิตามินบี 12 (corrinoid) เมื่อเติมไบโอตินร่วมกับแพนโททีนิกจะมีผลทำให้การผลิตวิตามินบี 12 เพิ่มสูงขึ้น แสดงว่าไบโอตินจะมีปฏิกิริยาเสริม (synergistic) กับแพนโททีนิก ถ้าเติมไบโอตินเพียงอย่างเดียวจะไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12

ผลการศึกษาเมื่อเติมแพนโททีนิกและไบโอตินในปริมาณต่าง ๆ กัน พบว่าแพนโททีนิก 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และไบโอติน 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ (ภาพที่ 4.10) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ระดับนี้สำหรับการทดลองต่อไป

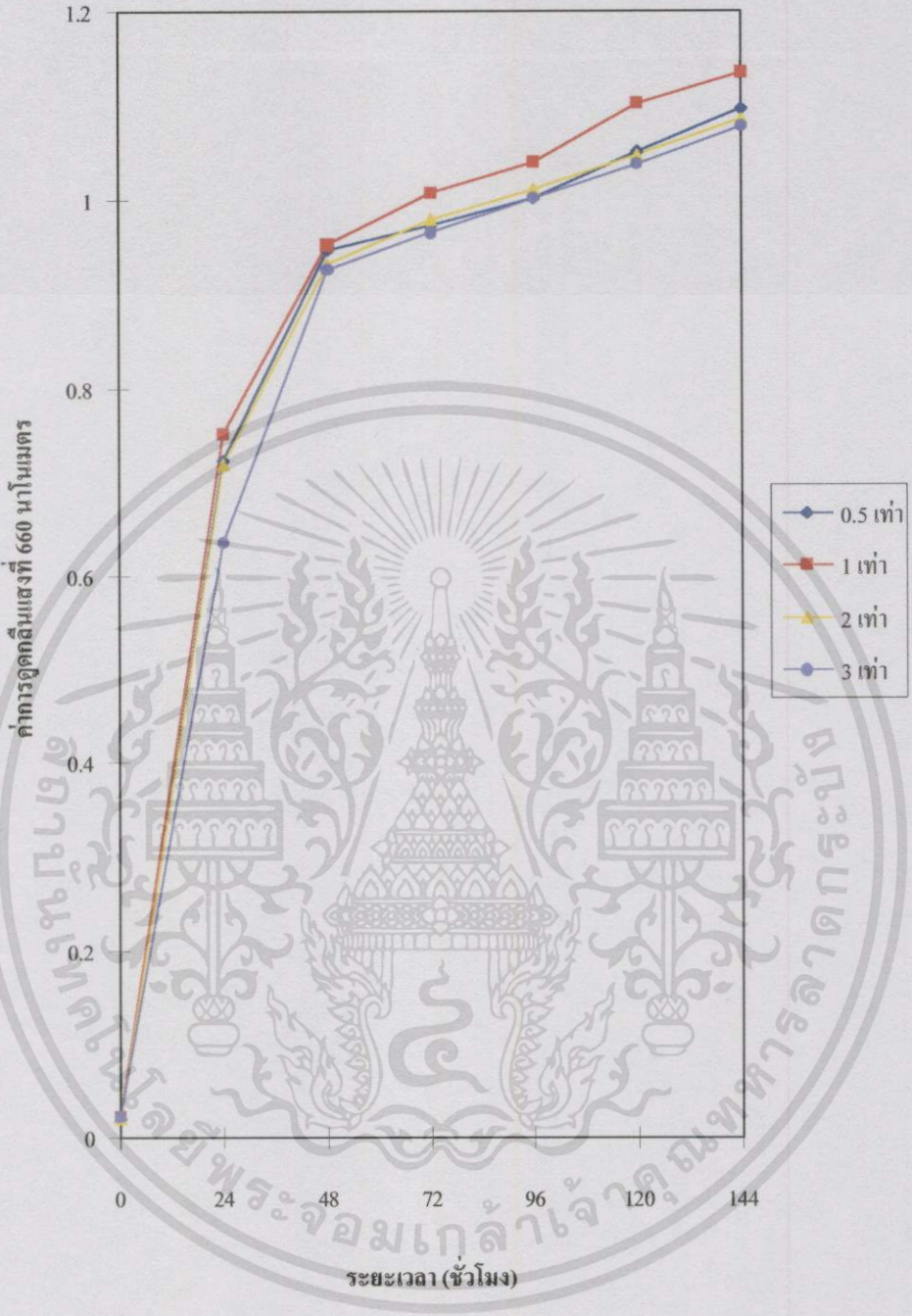
4.3.6 ผลการศึกษาหาปริมาณของวิตามินบี 2 ที่เหมาะสม

จากการศึกษาของ Renz (1970) พบว่าสามารถใช้วิตามินบี 2 แทน 5 ,6 – dimethylbenzimidazole ซึ่งเป็นสารเริ่มต้น (precursor) ที่สำคัญของวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium shermanii* สามารถเปลี่ยนวิตามินบี 2 เป็น 5 ,6 – dimethylbenzimidazole ได้ จึงทดลองเติมวิตามินบี 2 ในปริมาณ 1 , 5 , 10 , 25 , 50 , 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารน้ำทิ้งซึ่งมีส่วนประกอบต่าง ๆ ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้ในเบื้องต้น เปรียบเทียบกับอาหารน้ำทิ้งที่ไม่เติมวิตามินบี 2 ปรากฏว่าอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อเติมวิตามินบี 2 ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.11) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ระดับนี้สำหรับการทดลองต่อไป

4.3.7 ผลการศึกษาหาปริมาณของเมทธิโอนินที่เหมาะสม

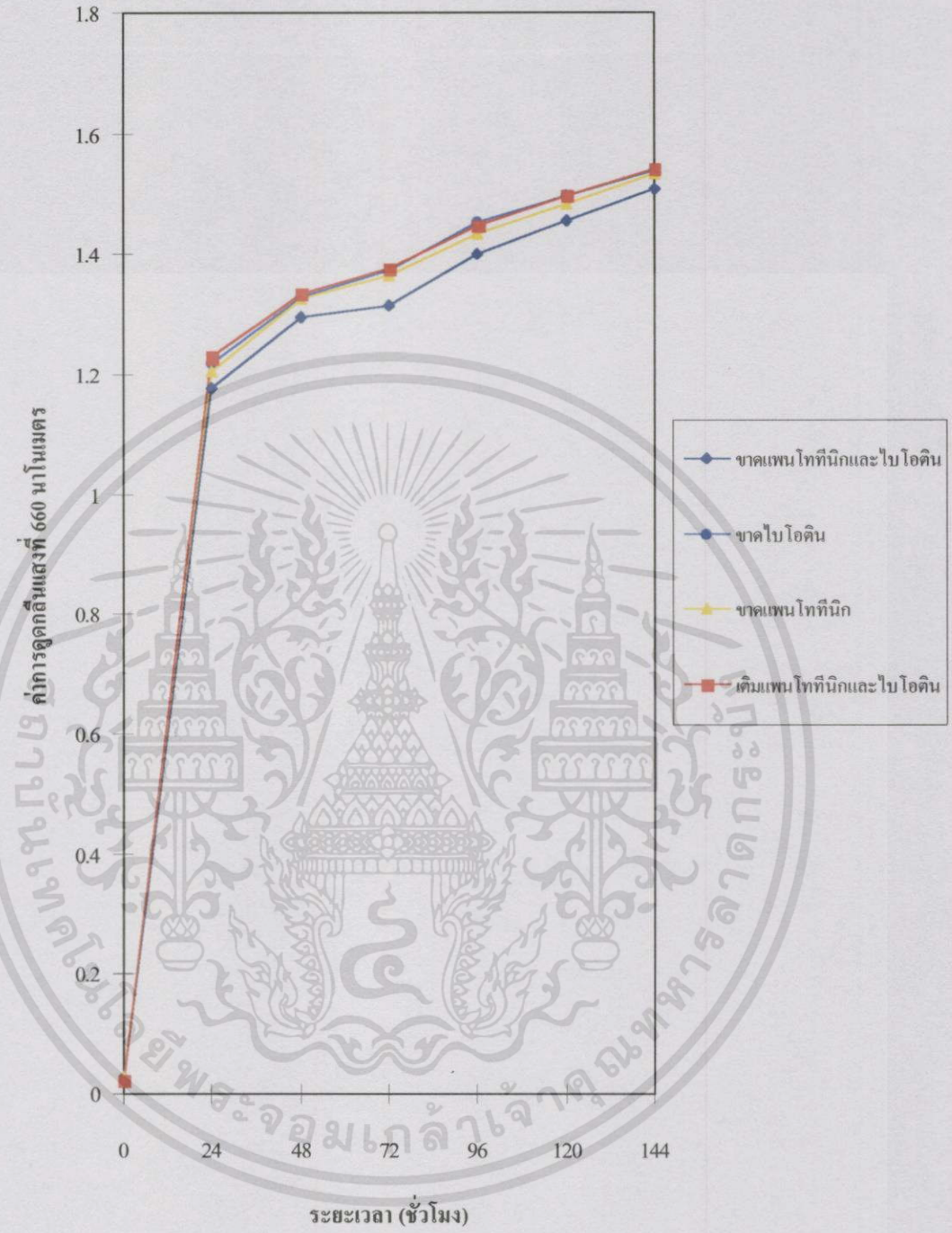
จากการศึกษาของ Bukin และ Pronyakova (1960) พบว่าเมทธิโอนินช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 โดยเป็นตัวเติมอนุมูลเมทธิลให้กับวงแหวนคอร์ริน (corrin ring) ดังนั้นจึงทดลองเติมเมทธิโอนินในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 75 , 150 , 220 , 450 , 750, 1500 และ 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



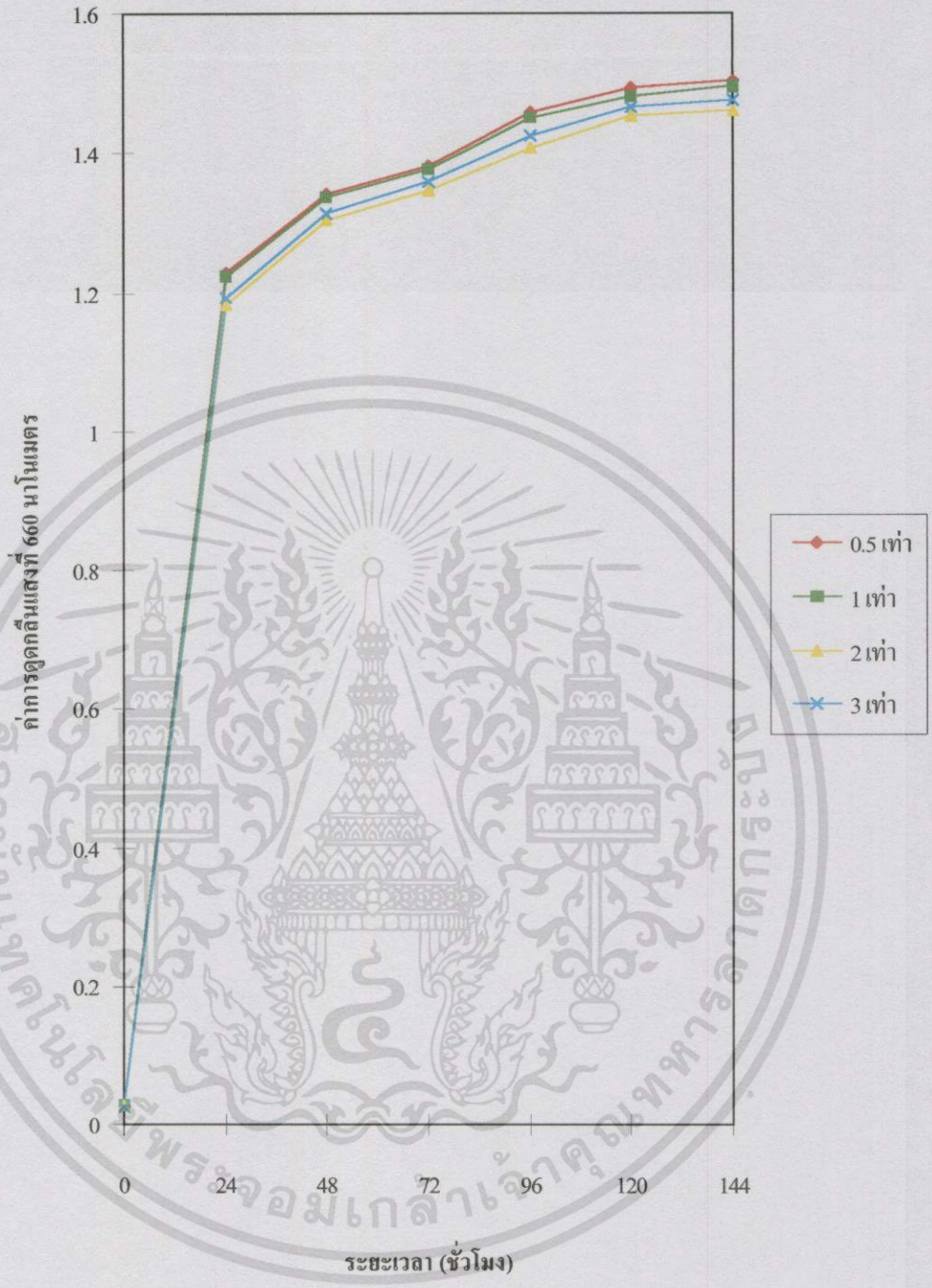
ภาพที่ 4.8 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีแหล่งแร่ธาตุ 5 ชนิด ความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



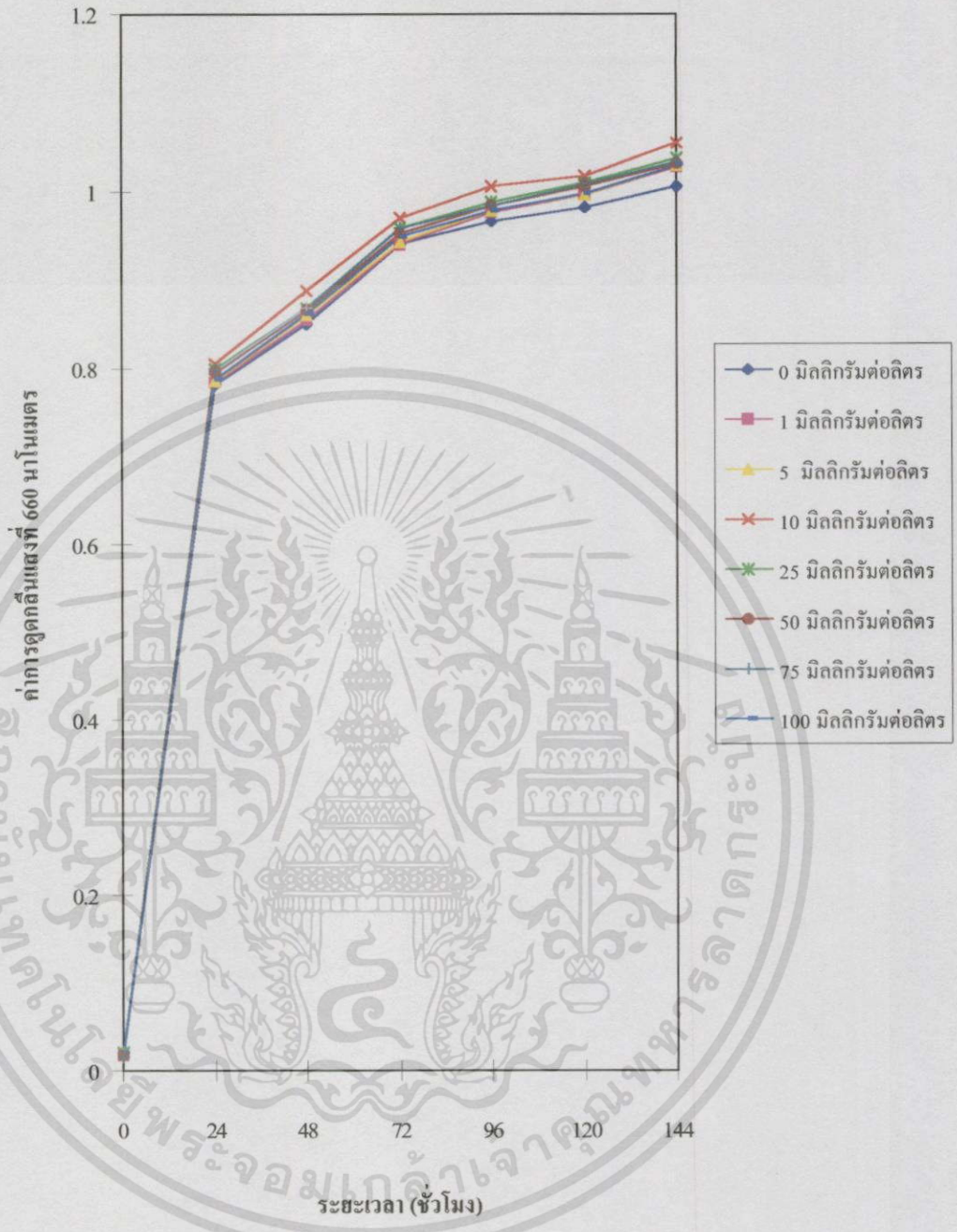
ภาพที่ 4.9 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีแพนโททีนิกและไบโอตินต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446ในอาหารน้ำทิ้งที่มีแพนโททีนิกและไบโอตินความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณวิตามินบี 2 ความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงในอาหารน้ำทิ้งที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้ในเบื้องต้น เปรียบเทียบกับอาหารน้ำทิ้งที่ไม่เติมเมทธิโอนิน ปรากฏว่าอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อเติมเมทธิโอนินปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร (ดังภาพที่ 4.12) ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ระดับนี้สำหรับการทดลองต่อไป

4.3.8 ผลการศึกษาหาปริมาณของไกลซีนที่เหมาะสม

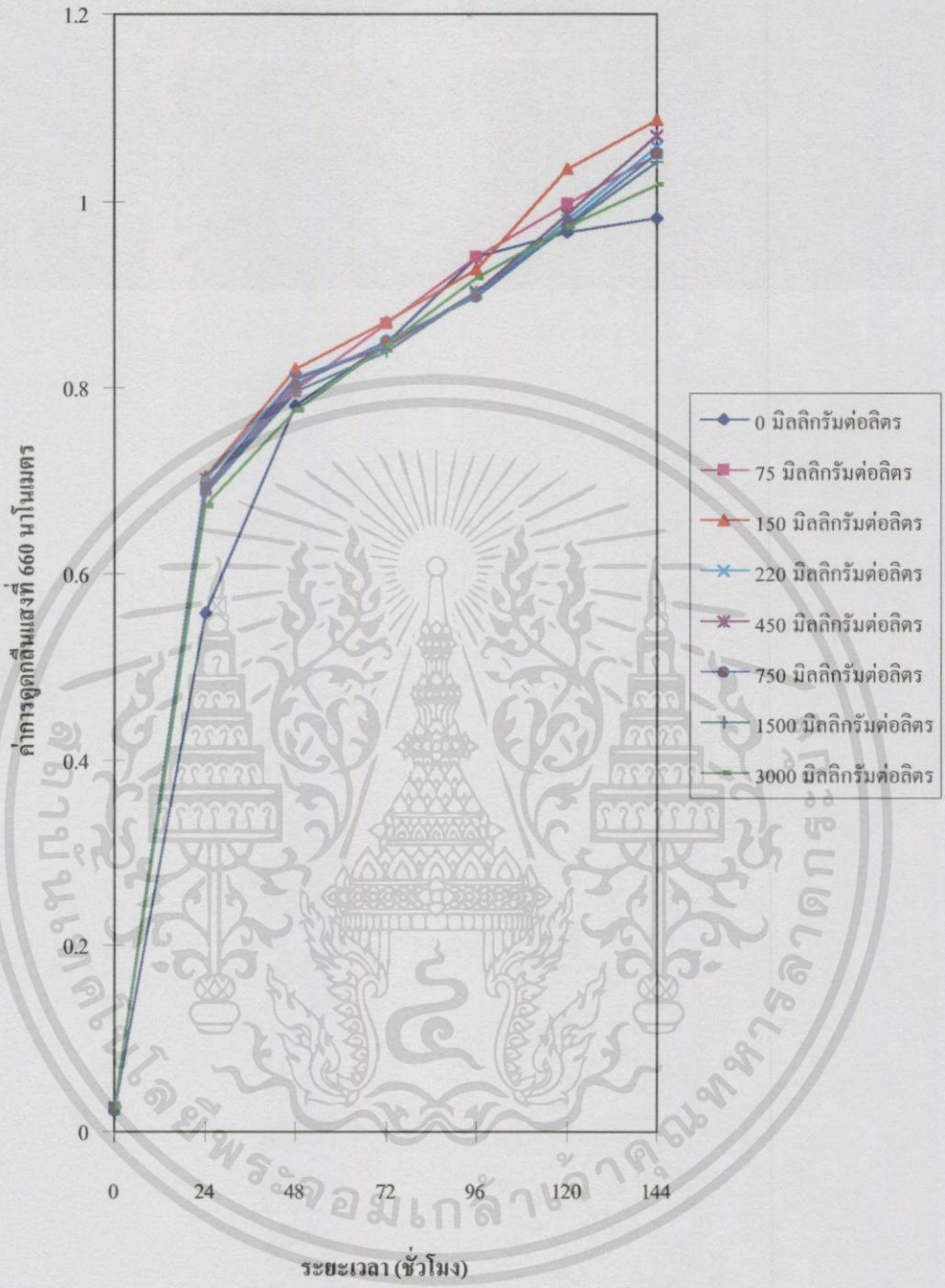
ไกลซีนเป็นสารเริ่มต้น (precursor) ตัวหนึ่งของการสังเคราะห์วงแหวนคอร์ริน (corrin ring) ของโมเลกุลวิตามินบี 12 ซึ่งจากการศึกษาของ Lim (1968) พบว่าการเติมไกลซีน ปริมาณ 0.1 – 0.3 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มเสริมแหล่งธาตุไนโตรเจนในอาหารที่ใช้ในการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 ของ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 มีผลทำให้ปริมาณวิตามินบี 12 เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่เติมไกลซีน ดังนั้นจึงทดลองเติมไกลซีนปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0.3 , 0.5 , 1 , 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารน้ำทิ้งที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ ในปริมาณเหมาะสมที่ศึกษาได้ในเบื้องต้น เปรียบเทียบกับอาหารน้ำทิ้งที่ไม่เติมไกลซีน ปรากฏว่าอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อเติมไกลซีนปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.13) ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ระดับนี้สำหรับการทดลองต่อไป

4.4 ผลการศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสมภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

จากการศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 4.3 โดยใช้น้ำทิ้งเป็นส่วนประกอบในอาหาร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารที่เหมาะสมเป็นเวลา 264 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณขึ้นจนอัตราการเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 240 ชั่วโมง หลังจากนั้นอัตราการเจริญของเชื้อค่อนข้างจะคงที่ เพราะอัตราการเจริญของเชื้อเท่ากับอัตราการตายเนื่องจากปริมาณสารอาหารลดน้อยลง ในระหว่างการหมักเชื้อจะผลิตวิตามินบี 12 ออกมาสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุด 3.881 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 (ภาพที่ 4.14) จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อมีความสัมพันธ์กันโดยตรง (growth associated product)

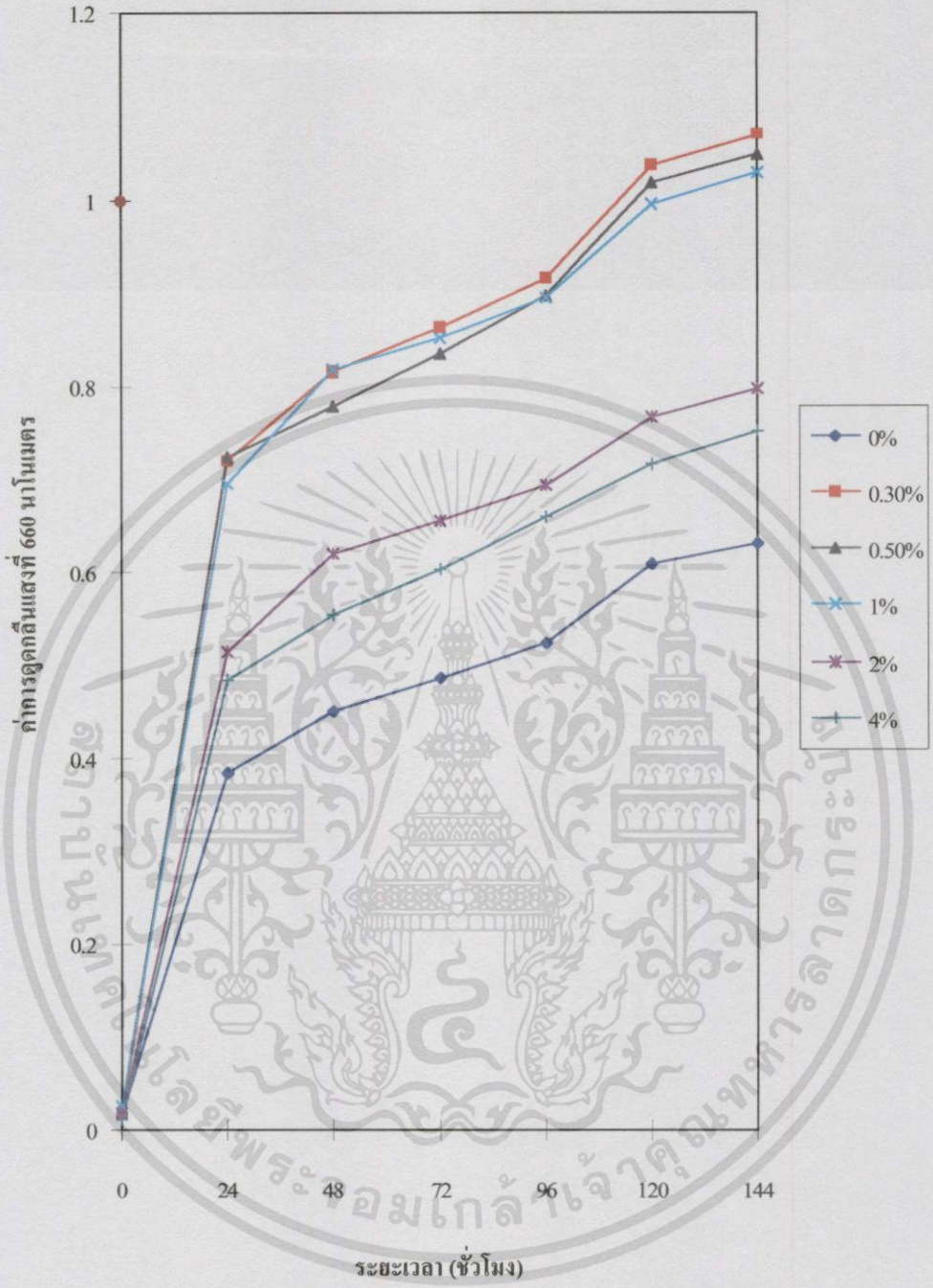
ในการผลิตวิตามินบี 12 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ต่อจากนั้นพีเอชของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วโดยลดลงจากพีเอช 7.0 เป็นพีเอช 4.03 ภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณเมทธิโอนินความเข้มข้นระดับต่างกัน ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 อัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่มีปริมาณไกลซีนความเข้มข้นระดับต่างกันภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นพีเอชจะค่อย ๆ ลดลงจนคงที่ (ภาพที่ 4.14) เนื่องจากในระหว่างการหมักเชื้อจะผลิตกรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก จึงทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและทำให้การผลิตวิตามินบี 12 ลดลง ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Nanba และคณะ (1983) ได้รายงานไว้ว่ากรดโพรพิโอนิก และกรดอะซิติกจะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโพรพิโอนิกได้

4.5 ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหาร complete medium และ น้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า (stationary flask) กับระดับถังหมักแบบแบช (batch fermentation)

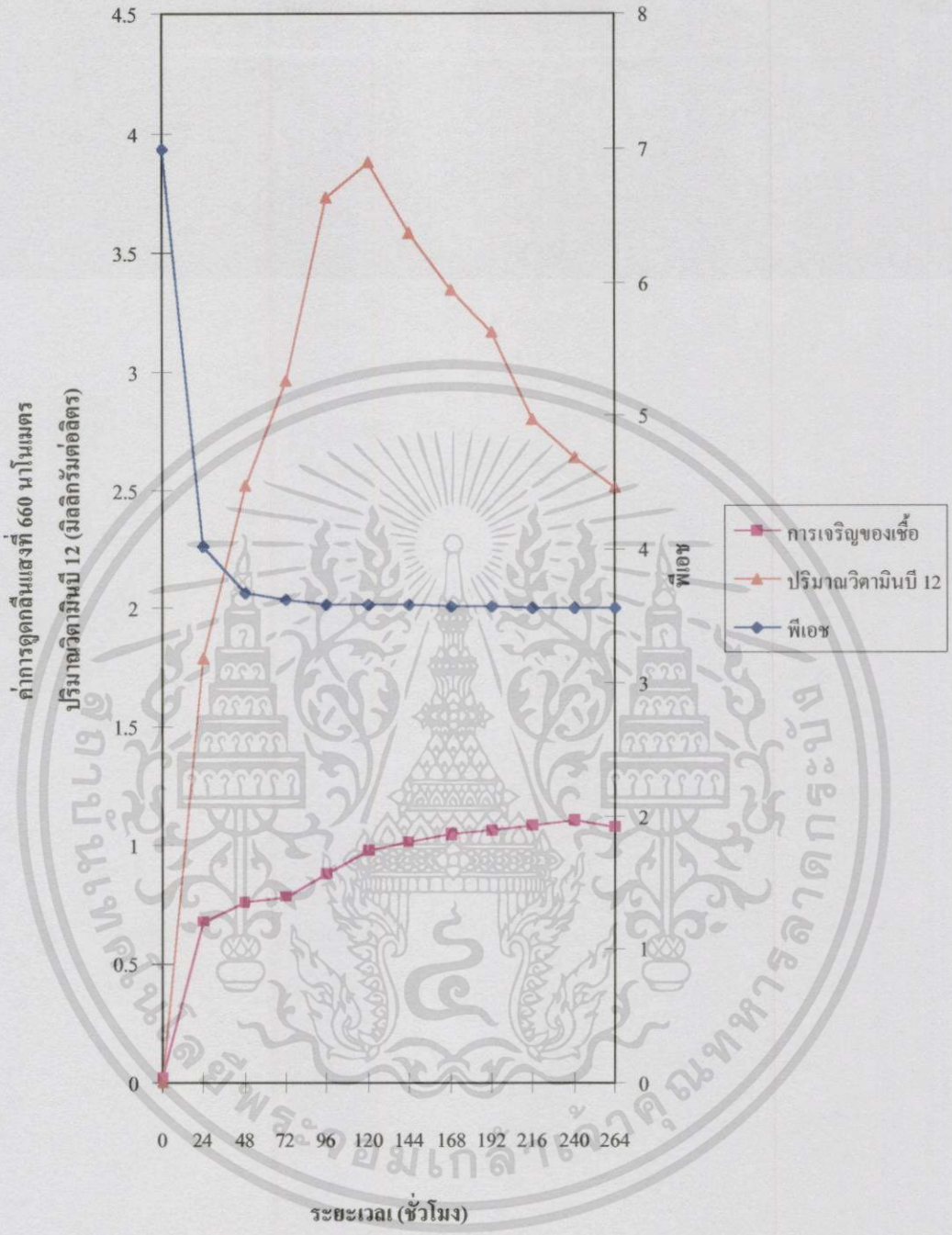
4.5.1 ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 และการเจริญของเซลล์อิสระในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมัก

จากการทดลองเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 และอัตราการเจริญของเซลล์อิสระในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมัก โดยใช้อาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม พบว่าเมื่อใช้ complete medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับฟลาสก์กับถังหมัก ต้องใช้เวลา 264 ชั่วโมงจึงถึงระยะที่เชื้อเจริญสูงสุดและได้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุด 0.832 และ 1.109 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 144 ส่วนอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสมใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับฟลาสก์กับถังหมัก เชื้อเจริญได้สูงสุดเมื่อใช้เวลา 240 ชั่วโมง และสามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงสุด 3.873 และ 4.325 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 120 ดังแสดงในภาพที่ 4.15 และ 4.16

4.5.2 ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียม-แอลจิเนทในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์กับระดับถังหมัก

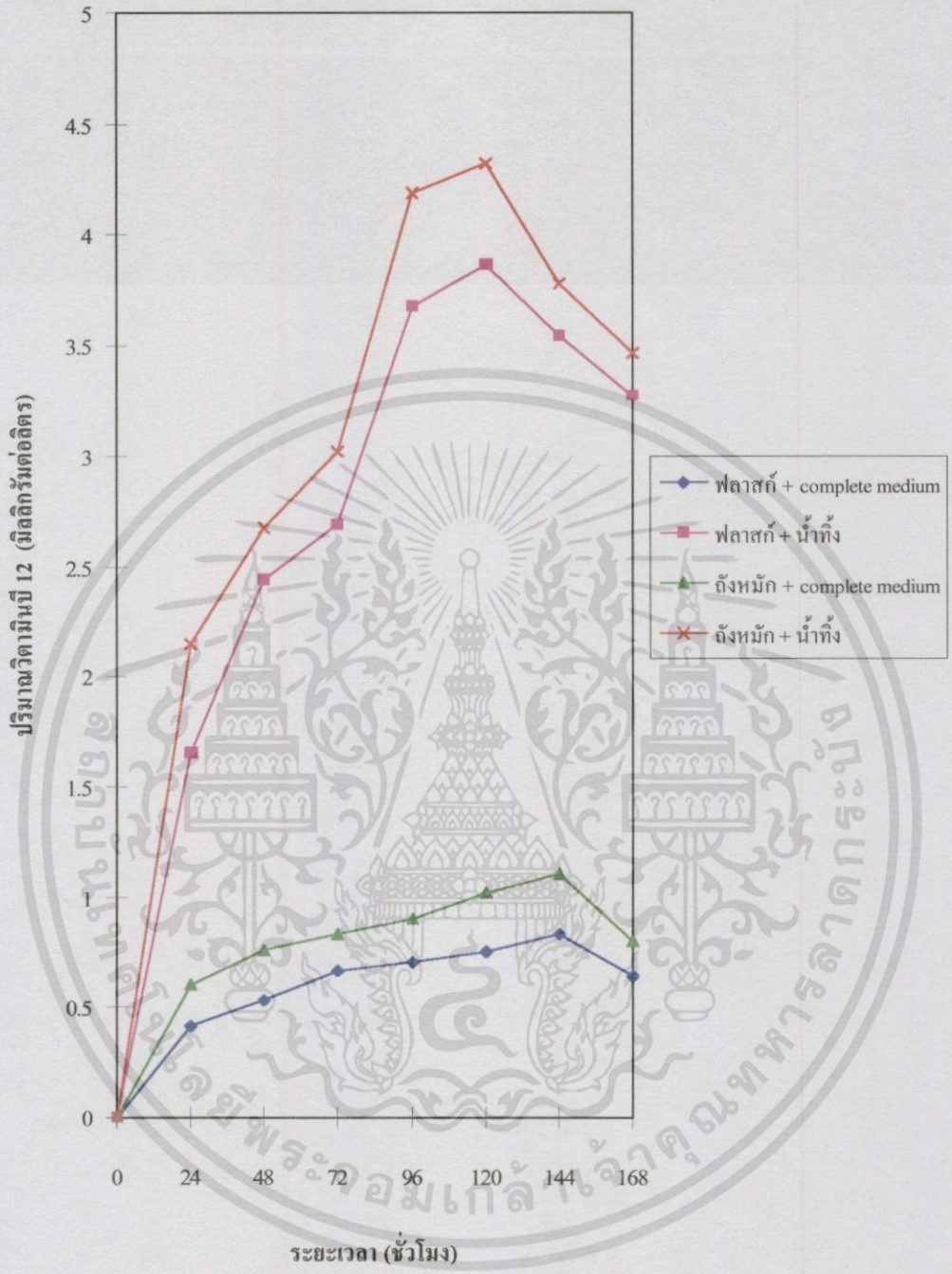
จากการทดลองเปรียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียม-แอลจิเนท ในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม พบว่า เมื่อนำเซลล์ที่ถูกตรึงมาเลี้ยงในอาหาร complete medium ภายใต้สภาวะฟลาสก์และถังหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะได้ปริมาณวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ (intracellular vitamin B_{12}) สูงสุด 0.726 และ 0.938 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเจล ตามลำดับ ส่วนวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ (extracellular vitamin B_{12}) มีปริมาณ 0.164 และ 0.188 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ต่อจากนั้นทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



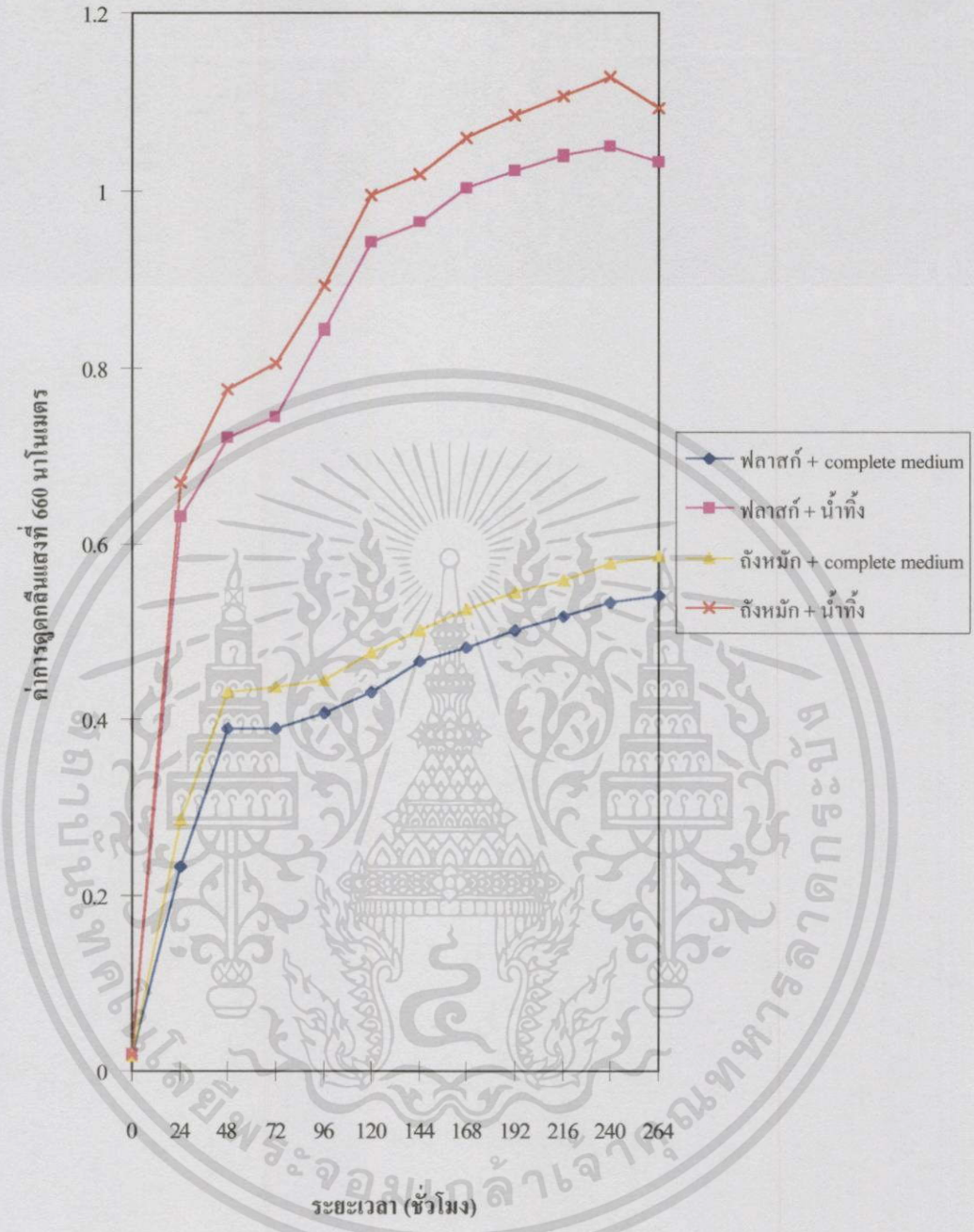
ภาพที่ 4.14 อัตราการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 การผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า และถังหมักแบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 อัตราการเจริญของเซลล์อิสระ เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า และถังหมักแบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

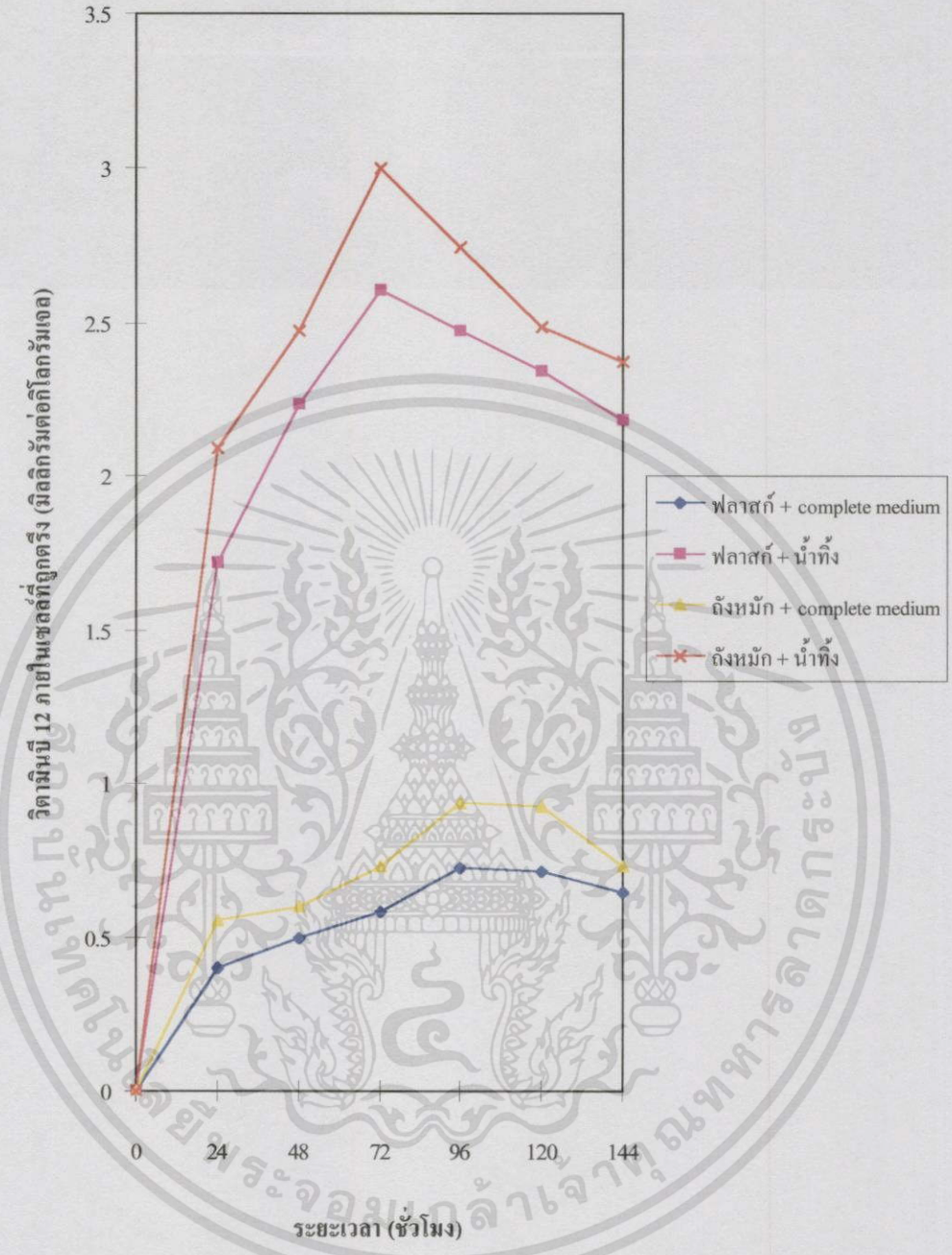
การทดลอง โดยนำเซลล์ที่ถูกตรึงมาเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับฟลาสก์และถังหมัก ใช้เวลาเพียง 72 ชั่วโมง จะได้ปริมาณวิตามินบี 12 ภายในเซลล์สูงสุด 2.608 และ 3.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเจล ตามลำดับ ส่วนวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ มีปริมาณ 0.347 และ 0.398 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.17 และ 4.18) จะเห็นได้ว่าอัตราการเจริญและปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อที่ทดลองในระดับถังหมักจะสูงกว่าในฟลาสก์ ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองในถังหมักมีการใช้ใบพัดกวน ทำให้เชื้อมีโอกาสสัมผัสกับอาหารได้ทั่วถึงตลอดการทดลอง จึงทำให้เชื้อใช้อาหารได้อย่างเต็มที่และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้นสะสมอยู่มากกว่าในฟลาสก์ จากการทดลองของ Toraya และคณะ (1976) ศึกษาการเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ exponential-fed batch โดยใช้อัตราการเติมแหล่งอาหารคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นให้สมดุลย์กับปริมาณจุลินทรีย์ พบว่าได้วิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นถึง 20 เท่าของการเลี้ยงจุลินทรีย์ในฟลาสก์ที่ไม่ได้เติมอาหารให้สมดุลกับเชื้อ

4.5.3 ผลการศึกษาเพิ่มปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารปริมาณเหมาะสม ในถังหมักแบบแบช

ผลการเปรียบเทียบปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักที่มีอาหารน้ำทิ้งที่เติมแหล่งธาตุอาหารเหมาะสมปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร พบว่า เซลล์อิสระสามารถผลิตวิตามินบี 12 ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ได้ 2.684 และ 2.503 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงจะได้ปริมาณของวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ 3.943 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเจล และมีปริมาณวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ 0.487 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 (ภาพที่ 4.19) จะเห็นได้ว่าเซลล์อิสระมีความสามารถในการผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง แต่ระบบการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าระบบการใช้เซลล์อิสระ คือสามารถแยกผลผลิตวิตามินบี 12 (extracellular vitamin B_{12}) ออกจากเซลล์ที่ถูกตรึงโดยการกรอง ซึ่งเป็นวิธีการง่ายและสะดวกกว่าการแยกของระบบการใช้เซลล์อิสระซึ่งต้องใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) นอกจากนี้ยังสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้เพื่อผลิตวิตามินบี 12 ได้อีก

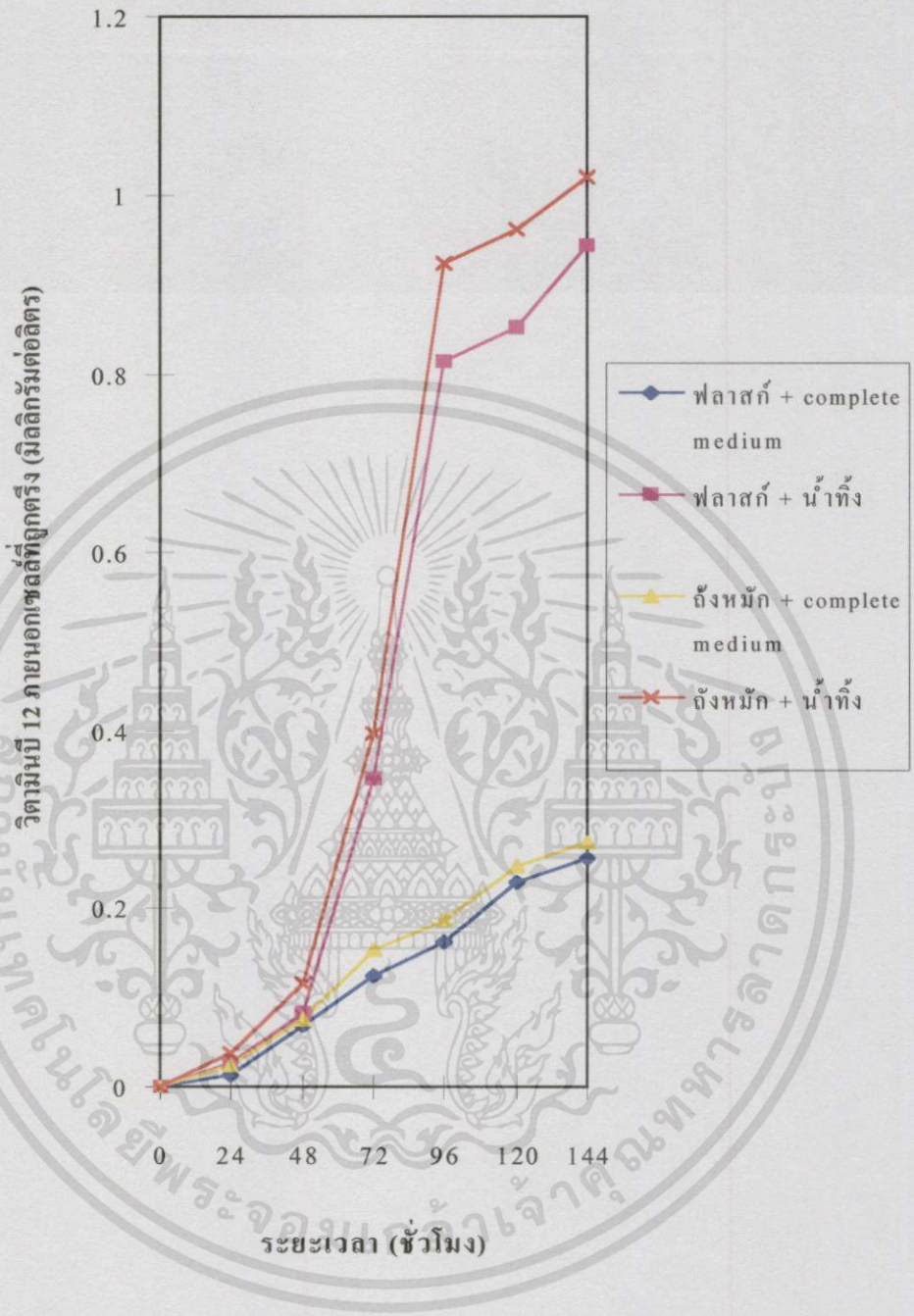
เมื่อเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระในอุตสาหกรรม พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระ คือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมากในถังหมักขนาดเล็กได้ ในการแยกผลผลิตจากขบวนการหมัก ไม่ต้องใช้ความร้อนในการสกัดวิตามินบี 12 ออกจากเซลล์ ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองพลังงาน วิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ (ต่อหน่วยปริมาตร) มีความเข้มข้นสูง และเซลล์ที่ถูกตรึงยังนำกลับมาใช้ผลิตวิตามินบี 12 ได้อีก ซึ่งนับว่าการผลิตวิตามินบี 12 โดยระบบเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



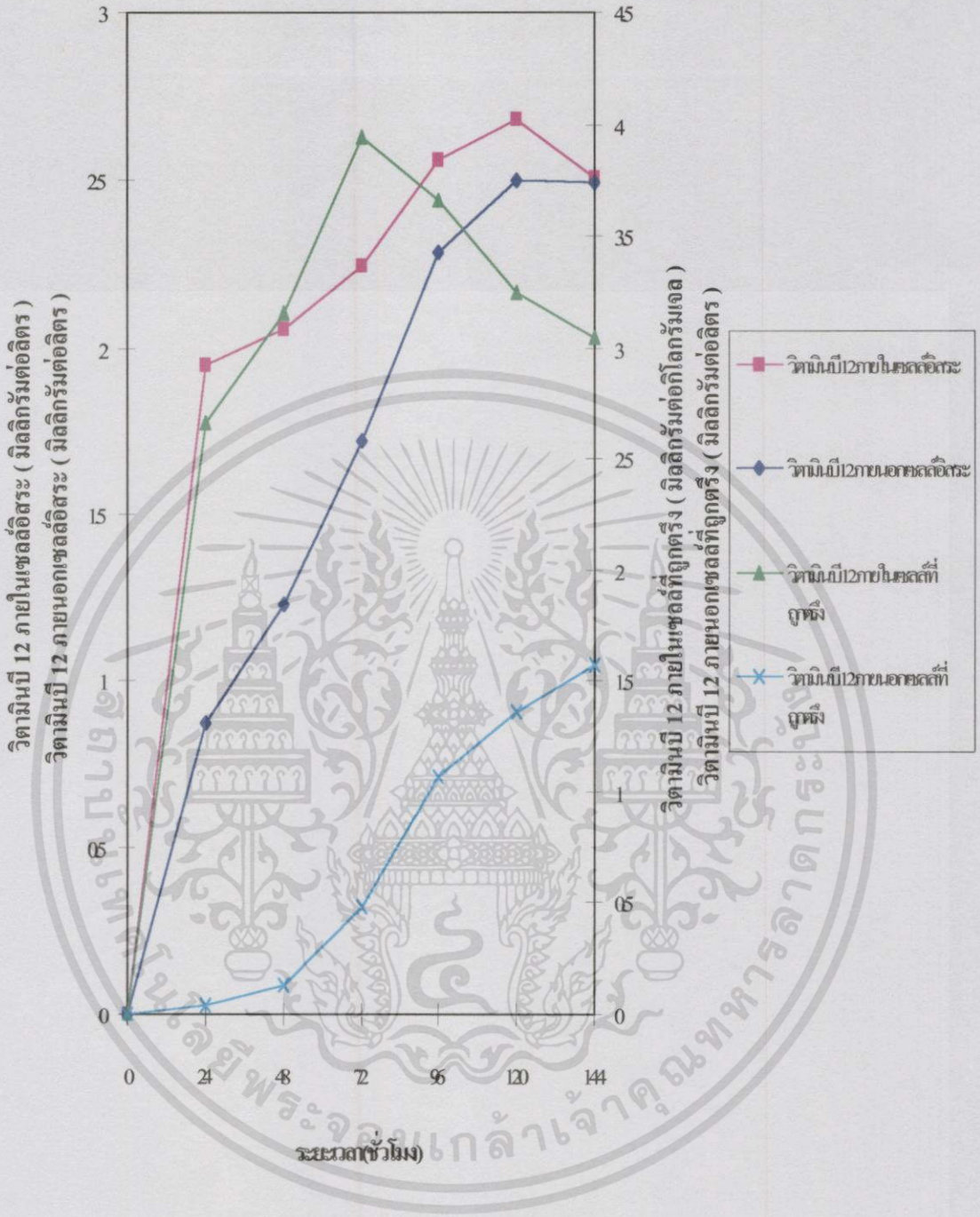
ภาพที่ 4.17 การผลิตวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท (intracellular vitamin B_{12}) เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า และถังหมักแบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



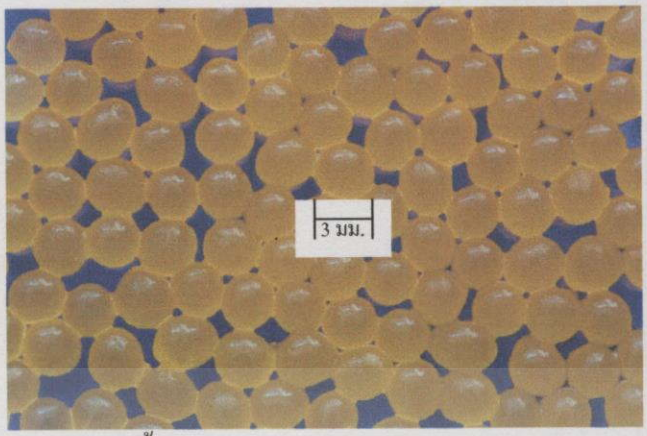
ภาพที่ 4.18 การผลิตวิตามินบี 12 ออกมาภายนอกเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท (extracellular vitamin B_{12}) เมื่อเลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า และถังหมักแบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.19 การเพิ่มปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียม-แอลจิเนท เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ภายใต้สภาวะถังหมักแบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 ลักษณะเม็ดเจลของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท

4.6 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเหลือทิ้งที่ได้จากการวิจัย

จากการวิเคราะห์หาค่าบีโอดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล น้ำทิ้งเติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมใช้เลี้ยงเซลล์อิสระ และน้ำทิ้งเติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมใช้เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึง ในช่วงก่อนทำการหมักและหลังจากเสร็จสิ้นการหมักแล้ว พบว่าบีโอดีของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลมีค่า 5,700 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำทิ้งที่เติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมก่อนการหมัก มีค่าบีโอดี 37,250 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำทิ้งที่เหลือจากการหมักโดยใช้เซลล์อิสระ มีค่าบีโอดี 29,900 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำทิ้งที่เหลือจากการหมักโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีค่าบีโอดี 26,763 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.2) จะเห็นได้ว่าน้ำทิ้งมีค่าบีโอดีสูงมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากได้ทำการเติมสารอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ซึ่งจากการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้ง พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมจะสูงกว่าอัตราการเจริญของเชื้อในน้ำทิ้งที่ไม่ได้เติมสารอาหาร และมีค่าบีโอดีสูงกว่าถึง 7 เท่า เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าบีโอดีในน้ำทิ้งที่เหลือจากการหมักโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ปรากฏว่าสามารถลดค่าบีโอดีของน้ำทิ้งได้ 19 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 สามารถใช้สารอาหารต่าง ๆ ในน้ำทิ้งได้พอสมควร จากการศึกษาของ Perez-Mendoza (1983) รายงานว่า น้ำทิ้งจากการต้มถั่วเหลืองที่ได้จากการทำเต้าเจี้ยวญี่ปุ่น ใช้เลี้ยงยีสต์ *Torulopsis xylinus* OUT 6182 สามารถลดค่าบีโอดี ได้เกือบ 90 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าวเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใช้เลี้ยง *Candida utilis* สามารถลดค่าบีโอดีได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ สามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ได้ และสามารถลดปัญหาน้ำเสียอีกทางหนึ่งด้วย

การเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุตสาหกรรมอาหารทะเล ได้ประโยชน์ในแง่การผลิตวิตามินบี 12 แต่ค่าบีโอดีของน้ำเหลือจากการเลี้ยงแบคทีเรียยังสูงมาก ดังนั้นจึงต้องอาศัยกระบวนการกำจัดน้ำเสียวิธีต่าง ๆ ร่วมด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ในการลดปัญหาน้ำเสียที่ก่อให้เกิดมลภาวะเป็นพิษ

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์หาค่าบีโอดีของน้ำทิ้งที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าบีโอดี (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
	ก่อนทำการหมัก	หลักจากการหมัก
complete medium	22,300	13,100
น้ำทิ้ง	5,700	3,440
น้ำทิ้งเติมสารอาหารใช้เลี้ยงเซลล์อิสระ	37,250	29,900
น้ำทิ้งเติมสารอาหารใช้เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึง	37,250	26,763

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในสภาพเซลล์อิสระ พบว่า เซลล์อิสระที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล ที่ประกอบด้วย (ต่อลิตร)

น้ำตาลกลูโคส	10 กรัม	โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH_2PO_4)	1.6 กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	10 กรัม	โพแทสเซียมฟอสเฟต ($K_3PO_4 \cdot 3H_2O$)	1.6 กรัม
acid hydrolysate of casein	2 กรัม	แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.4 กรัม
pancreatic digest of casein	3 กรัม	เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	10 มิลลิกรัม
แพนโททีนิก	2 มิลลิกรัม	โคบอลท์ซัลเฟต ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$)	12 มิลลิกรัม
ไบโอติน	0.15 มิลลิกรัม	เมทธิโอนีน	150 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2	10 มิลลิกรัม	ไกลซีน	3 กรัม

พีเอชเริ่มต้น 7.0 ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 264 ชั่วโมง ให้ปริมาณวิตามินบี 12 สูงสุด 3.881 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 สภาพเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหารน้ำทิ้งสูตรเหมาะสม ในระดับฟลาสก์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าและระดับถังหมักแบบแบช พบว่าใช้เวลาเพียง 72 ชั่วโมง ได้ปริมาณวิตามินบี 12 ภายในเซลล์สูงสุด 2.608 และ 3.002 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเจล ตามลำดับ ส่วนวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ มีปริมาณ 0.347 และ 0.398 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับถังหมักจะสูงกว่าในระดับฟลาสก์

จากการศึกษาเพิ่มปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ในถังหมักแบบแบช โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำทิ้งสูตรเหมาะสมปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร พบว่า เซลล์อิสระสามารถผลิตวิตามินบี 12 ภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ได้ 2.684 และ 2.503 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 120 ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงจะได้ปริมาณวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ 3.943 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเจล และให้ปริมาณวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ 0.487 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 จะเห็นว่าเซลล์อิสระมีความสามารถในการผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง แต่ระบบการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าระบบการใช้เซลล์อิสระอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายประการ คือ สามารถแยกผลผลิตวิตามินบี 12 ออกจากเซลล์ที่ถูกตรึงได้ง่าย สะดวก และประหยัด นอกจากนั้นยังนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ใหม่ได้อีก

จากการวิเคราะห์ค่าบีโอดีของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล และน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมก่อนทำการหมักมีค่า 5,700 และ 37,250 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ หลังจากเสร็จสิ้นการหมักแล้วค่าบีโอดีของน้ำทิ้งโดยใช้เซลล์ที่ถูกตรึงลดลงเหลือ 3,440 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำทิ้งที่เติมสารอาหารปริมาณเหมาะสมโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงมีค่าบีโอดี 29,900 และ 26,763 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสามารถลดค่าบีโอดีของน้ำทิ้งได้ถึง 39 , 19 และ 28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ค่าบีโอดีของน้ำเหลือจากการหมักยังมีค่าสูงมาก ดังนั้นจึงควรใช้กระบวนการกำจัดน้ำเสียวิธีต่าง ๆ ร่วมด้วย

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า

1) เซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ภายในเจล ปริมาณเซลล์เพิ่มสูงขึ้นจะถูกอัดแน่นอยู่รอบ ๆ ผิวเจล ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการส่งผ่านของสารออกสู่นอกเจลและอาจมีการรั่วไหลของเซลล์ ในกรณีที่มีการนำเซลล์ที่ถูกตรึงนี้กลับมาใช้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน จึงควรหาสารโพลีเมอร์ชนิดอื่นมาผสมร่วมกับแคลเซียมแอลจิเนท เพื่อเพิ่มความคงทนของเจล โดยนำเซลล์มาตรึงในลักษณะที่เป็นแผ่นเจลบาง ๆ เพื่อให้สารต่าง ๆ สามารถส่งผ่านเข้าออกภายในเจลได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้การนำมาใช้ใหม่มีประสิทธิภาพดีขึ้น

2) ในการทดลองศึกษาความคงตัวในการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเลี้ยงแบบแบชในฟลาสก์ พบว่า กรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลพลอยได้ของกระบวนการนี้ มีผลทำให้การผลิตวิตามินบี 12 ลดต่ำลง แนวทางการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 ให้สูงขึ้นและเซลล์ที่ถูกตรึงยังนำกลับมาใช้ใหม่ได้เป็นเวลานาน อาจทดลองโดยการนำเซลล์ที่ถูกตรึงนี้มาเลี้ยงแบบต่อเนื่องในถังหมักซึ่งมีการควบคุมพีเอชของอาหารตลอดการทดลอง

3) ควรศึกษาวิธีการแยกวิตามินบี 12 ให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จรีรัตน์ ผลจันทร์. "การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินบี 12 จากแบคทีเรีย *Propionibacterium shermanii.*" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2539.

น้อย ทองสกุลพานิชย์. "ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิกที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนท." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2527.

พรพรรณ อภิรักษ์วงศ์. "การศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ *Propionibacterium freudenreichii* sub sp. *shermanii* ATCC 13673 โดยใช้วัสดุเหลือใช้จากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2519.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. **จุลินทรีย์ที่สำคัญต่อการเกษตรและสิ่งแวดล้อม, ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ. เล่ม 1.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Association of Official Agricultural Chemists. 1995. **Official methods of analysis.** 16th ed. Maryland : AOAC international.

Barker, H.A. 1960. "Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing benzimidazole or 5, 6–dimethylbenzimidazole." **J. Biol. Chem.** 235 : 480–488.

Baron, A. "Use of thickening agent." U.S patent no. 3067109, December 1982.

Becher, E., Bernhauer K. and Wilharm G. "Use of precursors." U.S patent no. 3043750, July 1962.

Boretti, G., DiMarco, A., Fuoco, L., Marnati, M.P., Migliacci, A. and Spalla, C. 1960. **Biochemistry of Industrail Microorganisms.** translated from **Biochem. Biophys.** by Rose, A.H. New York : Academic Press.

Brodelius, P., Dens, B., Mosbach, K. and Zenk, M.N. 1979. "Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products." **FEBS Letters.** 103 : 93–97.

Buchanan, R.E., Gibbon, N.E., Conan, S.T., Holft, J.G., Liston, J. and Marry, R.B.E. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 8th ed. Baltimore : Williams and Wilkins Company.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bucke, C. and Wiseman. 1981. "Immobilized enzymes and cells." **Chemistry and Industry**. 4 : 234–240.

Casida, L.E., Jr. 1968. **Industrial Microbiology**. New York : John Wiley and Sons.

Chaplin, M.F. 1986. **In Carbohydrate Analysis : A Practical Approach**. England : Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. (eds) IRL Press.

Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. 1979. "Physical studies in cell immobilization using calcium alginate gels." **Biotechnol. Bioeng**. 21 : 2155–2168.

Cheetham, P.S.J. 1980. "Developments in the immobilization of microbial cells and their application." **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. 4 : 189–242.

Chibata, I. And Tosa, T. 1977. "Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells." **Adv. Appl. Microbiol**. 22 : 1–25.

Clastle, W.B. 1975. **Biochemistry and Physiology**. New York : John Wiley and Sons.

Darken, M.A. 1953. "Production of vitamin B_{12} by microorganism and occurrence in plant tissue." **The Bot. Rev**. 19 : 99–121.

Davis, B.D. and Mingioli, E.S. 1950. "Mutants of *E. coli* requiring methionine or vitamin B_{12}." **J. Bacteriol**. 60 : 17–28.

Ellenbogen, L. and Cooper, B.A. 1991. **Handbook of Vitamins**. 2nd ed. New Jersey : Marcel Dekker, Inc.

Florent, J. and Ninet, L. 1979. **Microbial Technology**. New York : Academic Press.

Ford, J.E. 1953. "Microbiological test." **Nature London**. 171 : 149–150.

Fredcrick, G.L. and Brisson, G.L. 1961. "Some observation on the relationship between vitamin B_{12} and reproduction in swine." **Can. J. Ani. Sci**. 41 : 212–219.

Friedman, H.C. and Cagen, L.M. 1970. "Microbial biosynthesis of B_{12} like compounds." **Ann. Rev. Microbiol**. 24 : 159 – 208.

Gomez, K.A. and Gomez, A.A. 1984. **Statistical Procedures For Agricultural Research**. 2nd ed. Singapore : John Wiley and Sons.

Harris, R.S. 1968. **The Vitamin, Chemistry, Physiology, Pathology methods**. Sebrell, W.H. and Harris, R.H. ed. New York : Acadamic Press.

Hastings, J.J.H. 1971. "Development of the fermentation industries in Great Britain." **Advance in Applied Microbiology**. Peoman, D. New York : Academic press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hester, A.S. and Ward, G.F. 1954. "Vitamin B_{12} feed supplement." **Ind. Eng. Chem**. 46 : 238–243.

Hoover, S.R., Jasewicz, L.B. and Porges, N. 1951. "Vitamin B_{12} in activated sludge." **Science**. 114 : 213.

Hutner, S.H. 1949. "Assay of antipernicious anemia factor with *Euglena*." **Proc. Soc. Exptl. Med**. 70 : 118–120.

Kierstan, M. and Bucke, C. 1977. "The immobilization of microbial cells, subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels." **Biotechnol. Bioeng**. 19 : 387–397.

Koshcheenko, K.A. 1981. "Living immobilized cells as biocatalysts of transformation and biosynthesis of organic compounds." **Applied Microbiology and Biochemistry**. 17 : 351–365.

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

Liem, I.T.H, Steinkrauss, K.H. and Cronk, T.C. 1972. "Production of vitamin B_{12} in Tempe a fermented soybean food." **Appl. And Env. Microbiol**. 34 : 773–776.

Maynard, L.A. 1979. **Animal Nutrition**. 7th ed. New York : Mc Graw–Hill.

Mcdonald, P.R.A. and Greenhalgh, J.F.D. 1973. **Animal nutrition**. 2nd ed. London : longman Group Limited.

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

Nanba, A., Nukada, R. and Nagai, S. 1983. "Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*." **J. Ferment. Technol**. 61 : 551–556.

Noyes, R. 1969. **Vitamin B_{12} Manufacture**. New Jersey : Noyes Development Corp.

Osman, H.G. and Chenouda, M.S. 1968. "Biosynthesis of vitamin B_{12} by *Propionibacterium freudenreichii* II." **J. Chem. URA**. 11 : 353–361.

Perlman, D. 1959. "Microbial synthesis of cobamides." **Adv. Appl. Microbiol**. 1 : 87–123.

Perlman, D, Semar, J.B. and Frazier, W.R. 1960. **Vitamin B_{12} and Intrinsic Factor**. 2nd ed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hamburg : European Symposium.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. "The production of vitamin B_{12}" **Industrial Microbiology**. New York : Mc Graw–Hill.

Rapp, P. 1968. "Microbial biosynthesis of B_{12} like compounds." **Ann. Rev. Microbiol.** 24 : 159–208.

Rick, E.L., Brink, N.G., Koniuszy, F.R., Wood, T.R. and Falkers, K. 1948. "Crystalline vitamin B_{12}." **Science**. 107 : 396–397.

Riley, P.B., Jackson, P.N., Rose, D. and Savage, A. 1961. **Primary Products of Metabolism**. New York : Academic Press.

Sawyer, C.N. and Mc–Carty, P.L. 1978. **Chemistry for Sanitary Engineering**. 3rd ed. Tokyo : Mc Graw–Hill.

Sebrell, W.H. and Harris, R.S. 1968. **The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology Methods**. New York : Academic Press.

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

Shorb, M.S. 1948. "Activity of vitamin B_{12} for the growth of *Lactobacillus lactis*." **Science**. 107 : 397–398.

Skeggs, H.R., Huff, J.W., Wright, L.D. and Bosshardt, D.K. 1948. "The use of *L. leichmannii* in the microbiological assay of the animal protein factor." **J. Biol. Chem.** 176 : 1459–1460.

Smith, J.L. 1948. **The Vitamins, Chemistry, Physiology, Pathology Methods**. New York : Academic Press.

Speedie, J.D. and Hull, G.W. "Vitamin B_{12} production by *Propionibacterium shermanii*." U.S patent no. 2251017, July 1963.

Thompson, R.C. 1943. "The B-vitamin requirements of the propionibacteria." **J. Bacteriology**. 46 : 99–104.

Toraya, T., Yongsmith, B., Honda, S., Tanaka, A. and Fukui, S. 1976. "Prodution of vitamin B_{12} from methanol–utilizing bacterium." **J. Ferment. Technol.** 54 : 102–108.

White, F.H. and Portno, A.D. 1978. "Topics in enzyme." **J. Inst. Brew.** 84 : 228–230.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yongsimth, B., Tanaka, A. and Fukui, S. 1982. "Vitamin B_{12} production by Immobilized cells of propionic acid bacteria." **Eur. J. Appl. Microbiol Biotechnol** 16 : 70–74.

Yongsmith, B., and Apiraktivongse, P. 1983. "Vitamin B_{12} production from soybean curd whey with *Propionibacterium freudenreichii*." **J. Ferment. Technol.** 16 : 105–107.

Zodrow, K., Stefaniak, O., Chelkowski, J. and Sxcsepska, K. 1963. "Influence of Ca-pantothenate and biotin on the growth and biosynthesis of corrinoids by Propionibacteria." **Acta. Microbiol. Pol.** 12 : 263–266.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทำ stock culture

อาหาร MRS agar สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิกรัม
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
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตวิตามินบี 12

อาหาร Complete medium มีส่วนประกอบดังนี้

Acid hydrolysate of casein	1.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	1.5	กรัม
NaH_2PO_4	1.6	กรัม
$K_3PO_4 \cdot 3H_2O$	1.6	กรัม
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.4	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	12.0	มิลลิกรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Pantothenic acid	4.0	มิลลิกรัม
Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

1. การคำนวณหาปริมาณโปรตีน

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

$$\% \text{ โปรตีน} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times 6.25$$

เมื่อ A = ปริมาตรกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ในการไทเทรตสารตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ในการไทเทรตแบลงก์ (มิลลิลิตร)

C = ความเข้มข้นของกรดซัลฟุริก (0.1 นอร์มอล)

V = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้กลั่น (มิลลิลิตร)

2. การคำนวณหาปริมาณสารแขวนลอย

$$\text{ปริมาณสารแขวนลอย (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอน (มิลลิกรัม)} \times 1{,}000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

3. การคำนวณหาค่าซีโอดี

$$\text{ซีโอดี (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(A - B) \times C \times 8{,}000}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำ}}$$

เมื่อ A = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับแบลงก์

B = มิลลิลิตรของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้กับตัวอย่างน้ำ

C = โมลาริตี (M) ของสารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การคำนวณหาค่าบีโอดี

ถ้าใช้ตัวอย่างในการไทเทรต ปริมาตร 200 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีค่าสมมูลพอดีกับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ของออกซิเจนที่ละลายในตัวอย่างน้ำ

4.1 กรณีไม่เติมหัวเชื้อ

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

4.2 กรณีเติมหัวเชื้อ

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

เมื่อ D_1 = ออกซิเจนละลายของตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วเป็นเวลา 15 นาที ของวันที่ 0

D_2 = ออกซิเจนละลายที่ทำการเจือจางแล้วและบ่มเป็นเวลา 5 วัน

P = อัตราส่วนของตัวอย่างที่ใช้ต่อตัวอย่างที่เจือจางแล้ว

B_1 = ออกซิเจนละลายของหัวเชื้อคุม (seed control) ก่อนการบ่ม

B_2 = ออกซิเจนละลายของหัวเชื้อคุม (seed control) หลังการบ่ม 5 วัน

f = อัตราส่วนของหัวเชื้อในตัวอย่างต่อในหัวเชื้อคุม (เปอร์เซ็นต์หัวเชื้อใน D_1/เปอร์เซ็นต์หัวเชื้อใน B_1)

5. การคำนวณหาค่าไขมันและน้ำมัน

$$\text{ไขมันและน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{(B - A) \times 10^6}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

เมื่อ A = น้ำหนักของจานระเหยก่อนการวิเคราะห์ (กรัม)

B = น้ำหนักของจานระเหยหลังการวิเคราะห์ (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การคำนวณหาปริมาณเกลือ

$$\% \text{ เกลือ} = \frac{(A - B) \times 58.45}{V \times 100}$$

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมไธโอไซยาเนต ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

7. การคำนวณหาปริมาณวิตามินบี 12

ปริมาณวิตามินบี 12 (10^{-5} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $\frac{\text{ค่าเฉลี่ยวิตามินบี 12}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}} \times$ อัตราการเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

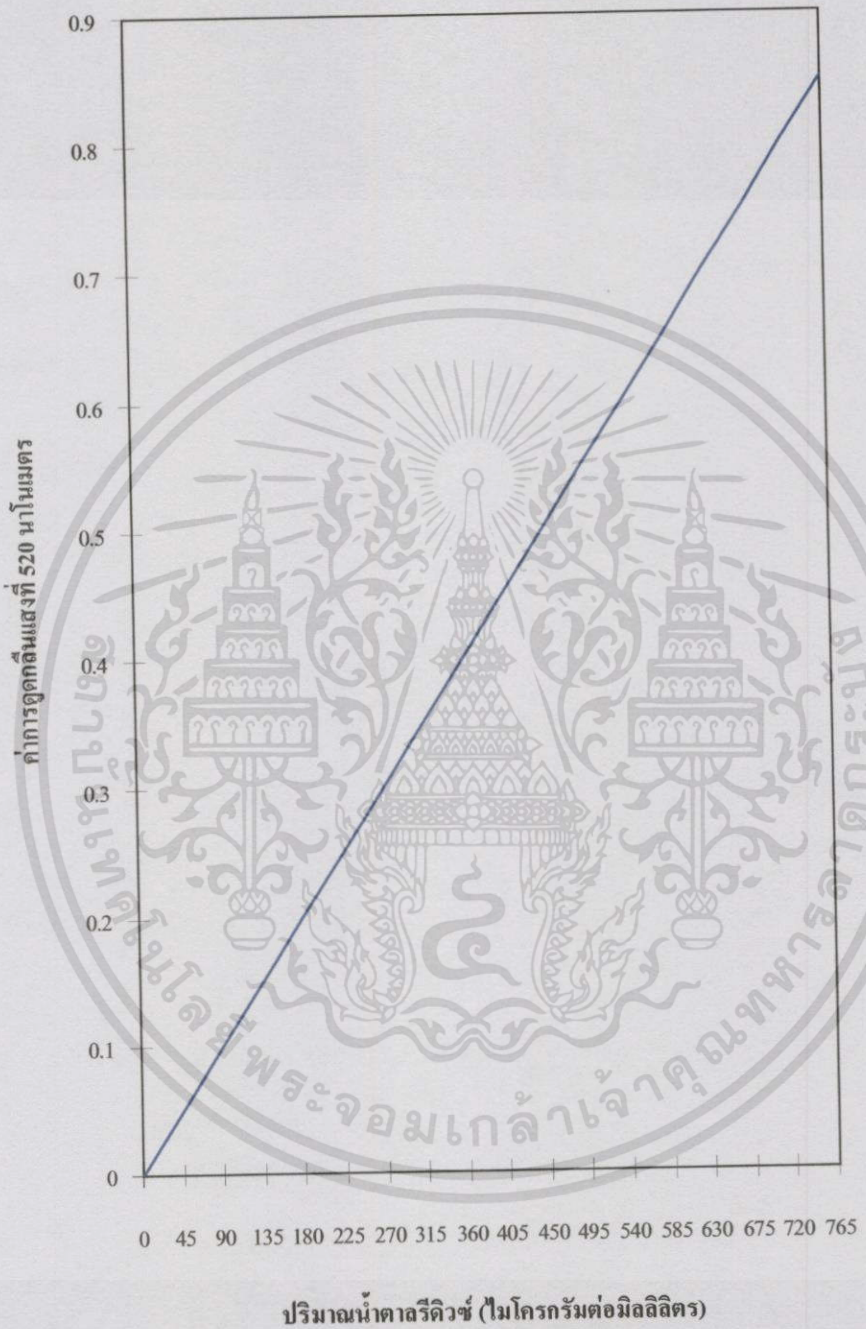
ตารางที่ ค.-1 ช่วงค่าบีโอดีกับวิธีการเจือจางของตัวอย่างน้ำ

โดยวิธีเจือจาง		โดยใช้ตัวอย่างน้ำโดยตรง	
% ตัวอย่าง	ช่วงบีโอดี	มิลลิลิตรของตัวอย่างน้ำ	ช่วงบีโอดี
0.01	20,000 - 70,000	0.02	30,000 - 105,000
0.02	10,000 - 35,000	0.05	12,000 - 42,000
0.05	4,000 - 14,000	0.10	6,000 - 21,000
0.10	2,000 - 7,000	0.20	3,000 - 10,500
0.20	1,000 - 3,500	0.50	1,200 - 4,200
0.5	400 - 1,400	1.0	600 - 2,100
1.0	200 - 700	2.0	300 – 1,050
2.0	100 - 350	5.0	120 – 420
5.0	40 - 140	10.0	60 – 210
10.0	20 - 70	20.0	30 – 105
20.0	10 – 35	50.0	12 – 42
50.0	4 – 14	100.0	6 – 21
100.0	0 – 7	300.0	0 – 7

ที่มา : Sawyer และ Mc Carty (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

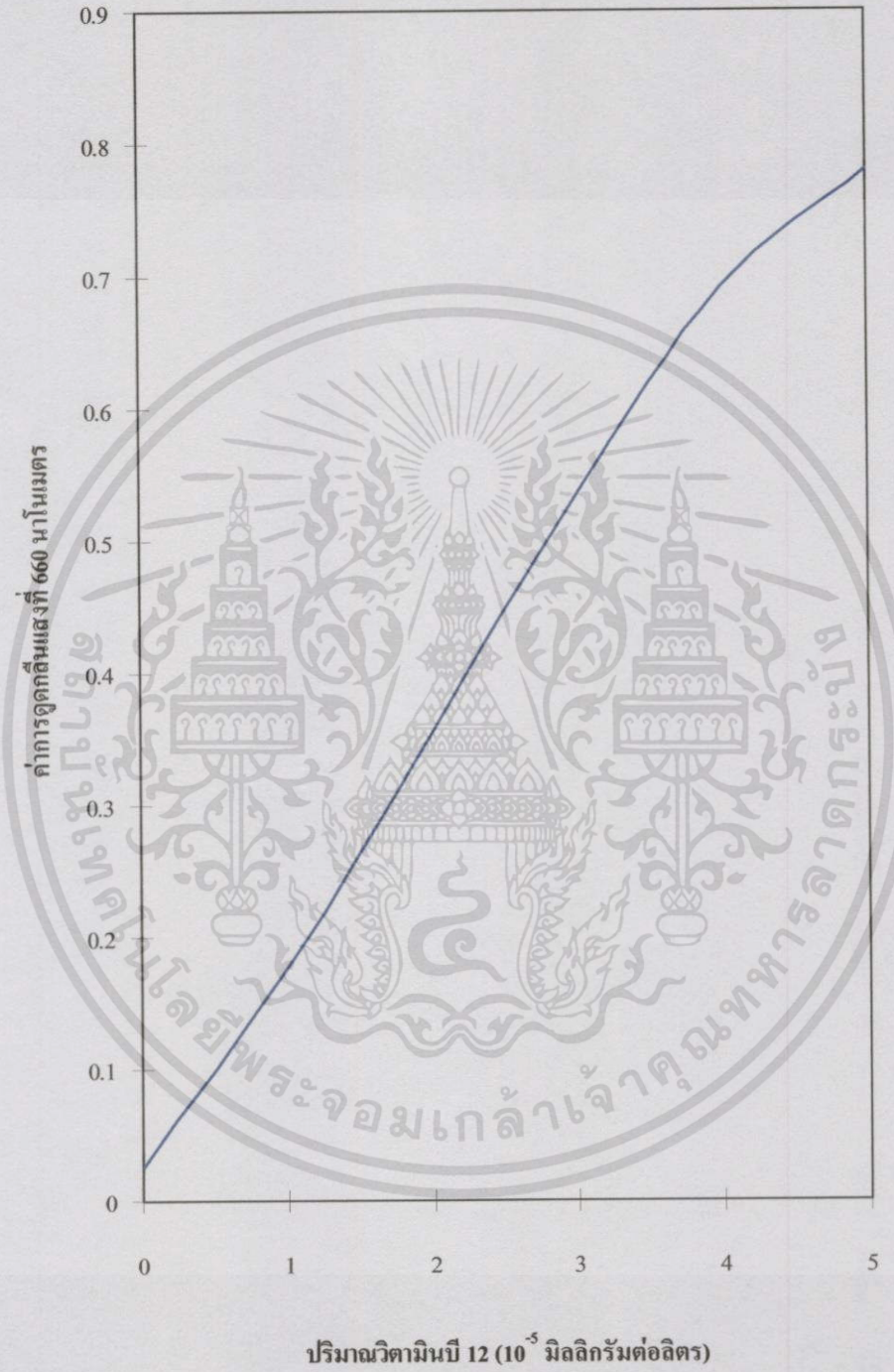


ภาพที่ ง.-1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ง.-2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ง.-3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณวิตามินบี 12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

ตารางที่ จ.-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งเป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean of Square	F Value
Rows	6	6.656995	1.109499	12207.83*
Columns	3	0.006508	0.002169	23.87017*
Error	18	0.001636	9.09E–05	
Total	27	6.665139		

หมายเหตุ Rows ระยะเวลา (ชั่วโมง)
Columns แพนโททีนิกและไบโอติน
* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ จ.-1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในอาหารน้ำทิ้งที่เติมแพนโททีนิกและไบโอตินต่างกัน เป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะฟลาสก์ที่ไม่มีการเขย่า

สูตรอาหารน้ำทิ้ง	ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญของเชื้อ (OD_{660})
ขาดแพนโทนิกและไบโอติน	1.168657^{c}
ขาดแพนโททีนิก	1.195971^{ab}
ขาดไบโอติน	1.204929^{ab}
เติมแพนโททีนิกและไบโอติน	1.206814^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Gomez และ Gomez , 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุรีย์ ทองวณิชนิยม เกิดเมื่อวันที่ 21 ธันวาคม 2517 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตเกษตรศาสตร์บางพระ ปีการศึกษา 2540

ได้รับทุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการศึกษาปริญญาโทที่คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นระยะเวลา 1 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้