

การผลิตวิตามินบี 12 จากเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446
ที่ถูกตรึงและตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC

PRODUCTION OF VITAMIN B₁₂ FROM IMMOBILIZED
Propionibacterium freudenreichii TISTR 446 AND DETERMINATION BY HPLC

สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์
SOMSAK YOOBORIBOON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

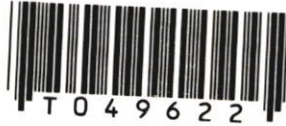
พ.ศ. 2546

ISSN 974-824-545-6

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตวิตามินบี 12 จากเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446
ที่ถูกตรึงและตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC

PRODUCTION OF VITAMIN B₁₂ FROM IMMOBILIZED
Propionibacterium freudenreichii TISTR 446 AND DETERMINATION BY HPLC



สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์

SOMSAK YOOBORIBOON

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49622.....
วัน, เดือน, ปี 25 ก.พ. 2547

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-545-6

PRODUCTION OF VITAMIN B₁₂ FROM IMMOBILIZED
Propionibacterium freudenreichii TISTR 446 AND DETERMINATION BY HPLC

SOMSAK YOORIBOON

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

2003

ISBN 974-324-545-6

COPYRIGHT 2003

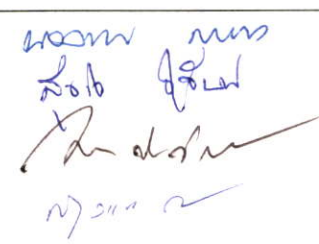
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตวิตามินบี 12 จากเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงและตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC
PRODUCTION OF VITAMIN B₁₂ FROM IMMOBILIZED *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 AND DETERMINATION BY HPLC

ชื่อนักศึกษา นายสมศักดิ์ อยู่บุรีรัมย์
รหัสประจำตัว 41065215
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.สุขใจ ชูจันทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.นवलพรรณ ฌ ระนอง	
รศ.สุขใจ ชูจันทร์	
รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์	
ผศ.ดร.สุวรรณ ไชยสิทธิ์	

วัน/เดือนปี ที่สอบ 19 พฤษภาคม 2546 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424



วันที่.....๒๙.....เดือน.....พฤษภาคม.....พ.ศ.....๒๕๔๖.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตวิตามินบี 12 จากเชื้อ <i>Propionibacterium freudenreichii</i> TISTR 446 ที่ถูกตรึงและตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค HPLC
นักศึกษา	นายสมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์
รหัสประจำตัว	41065215
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ชนิดของวิตามินบี 12 ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในรูปของ cyanocobalamin ซึ่งมีค่า retention time ใกล้เคียงกับค่ามาตรฐาน คือ 21.989 นาที

การผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึง ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่เลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสม และมีผลต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12 ออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 เซลล์อิสระที่เลี้ยงใน complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร จะมีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์เป็น 1.500 และ 2.066 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ มีค่าเป็น 9.600 และ 13.333 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 28.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วน วิตามินบี 12 ทั้งหมดมีค่าเป็น 11.100 และ 15.400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 27.92 เปอร์เซ็นต์

จากการเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึง พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 อาหาร complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร จะมีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์เป็น 4.666 และ 6.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 22.23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์มีค่าเป็น 8.266 และ 10.000 ไมโครกรัมต่อกรัม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 17.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วน วิตามินบี 12 ทั้งหมดมีค่าเป็น 12.933 และ 15.967 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 19.00 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบเซลล์อิสระ กับเซลล์ที่ถูกตรึง ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร พบว่า ใน ชั่วโมงที่ 96 จะมีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ เป็น 2.067 และ 6.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 65.56 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ เป็น 13.333 และ 10.000 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 25.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วน วิตามินบี 12 ทั้งหมด มีค่าเป็น 15.400 และ 15.967 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Thesis Title	Production of Vitamin B ₁₂ from Immobilized <i>Propionibacterium freudenreichii</i> TISTR 446 and Determination by HPLC
Student	Mr. Somsak Yooboriboon
Student ID.	41065215
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Associate Professor Sukjai Choojun

ABSTRACT

Vitamin b₁₂ production of *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 was studied in this report. It was found that cyanocobalamine and retention time was 21.989 mins.

Vitamin b₁₂ production of free and immobilized cell were cultured in 2 liters of complete medium and supplemented waste. In addition, the optimal tween 80 for transportation of vitamin b₁₂ was 0.1%. extracellular and intracellular vitamin b₁₂ of free cell and immobilized cell in completed medium and supplemented waste were investigated. At 96 hrs, it was observed that the average of extracellular vitamin b₁₂ of free cell in complete medium and supplemented waste were 1.500 and 2.066 µg/ml, respectively. There was no significantly different, while the average of intracellular vitamin b₁₂ were 9.600 and 13.333 µg/g, respectively. There was significantly different at 28.00%. Total vitamin b₁₂ were 11.100 and 15.400 µg/ml, respectively. There was significantly different at 27.92%.

For immobilized cell at 96 hrs, the average of extracellular vitamin b₁₂ of immobilized cell in complete medium and supplemented waste were 4.666 and 6.000 µg/ml, respectively. There was significantly different at 22.23%, while the average of intracellular vitamin b₁₂ were 8.266 and 10.000 µg/g, respectively. There was significantly different at 17.34%. Total vitamin b₁₂ were 12.933 and 15.967 µg/ml, respectively. There was significantly different at 19.00%.

The comparison between free and immobilized cell in supplemented waste, it was revealed that the average of extracellular vitamin b₁₂ were 2.067 and 6.000 µg/ml, respectively. There was significantly different at 65.56%, while the average of intracellular vitamin b₁₂ were 13.333 and 10.000 µg/g, respectively. There was significantly different at 25.00%. Total vitamin b₁₂ were 15.400 and 15.967 µg/ml, respectively. There was no significantly different.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากคณาจารย์และบุคคลหลายท่าน ขอกราบขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือสนับสนุนให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องในด้านต่างๆ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์นพพร สงค์อ้อม ที่กรุณาให้คำแนะนำ และเป็นที่ปรึกษาในด้านการใช้เครื่องมือ HPLC

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน เจ้าหน้าที่ธุรการรวมทั้งพี่ เพื่อน และน้องภาคชีววิทยาประยุกต์ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือ และให้คำแนะนำ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยสนับสนุน และให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์

เมษายน 2546

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XI
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ประวัติของวิตามินบี 12.....	3
2.2 คุณสมบัติของวิตามินบี 12.....	4
2.3 แหล่งที่พบวิตามินบี 12.....	6
2.4 การดูดซึมและการขนส่ง.....	6
2.5 หน้าที่ของวิตามินบี 12.....	8
2.6 การขาดวิตามินบี 12.....	12
2.7 ประโยชน์ของวิตามินบี 12.....	12
2.8 กระบวนการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางชีวภาพ.....	13
2.9 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12.....	17
2.10 ลักษณะและคุณสมบัติของ <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	20
2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	21
2.12 กระบวนการหมัก.....	23

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.13	การผลิตวิตามินบี 12 โดยระบบการตรึงเซลล์	
2.13.1	ความหมายและประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง.....	23
2.13.2	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของระบบที่ถูกตรึงกับวิธีอื่นๆ.....	24
2.13.3	การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์.....	24
2.13.4	คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง.....	25
2.13.5	วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์.....	25
2.13.6	คุณสมบัติของแอลจิเนทและการใช้ประโยชน์.....	27
2.14	การวิเคราะห์วิตามินบี 12 ด้วยเทคนิค HPLC	
2.14.1	หลักการพื้นฐาน Liquid Chromatography (LC).....	30
2.14.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	32
2.14.3	องค์ประกอบของเครื่อง HPLC.....	33
2.14.4	เทคนิค HPLC.....	36
2.14.5	การประยุกต์ใช้งานของเทคนิค HPLC.....	37
2.14.6	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	39
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย		
3.1	อุปกรณ์การทดลอง.....	40
3.2	สารเคมี.....	41
3.3	วัตถุดิบ.....	42
3.4	เชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย.....	42
3.5	วิธีการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนท.....	43
3.6	การศึกษาความสามารถในการผลิตและการส่งผ่านวิตามินบี 12	
3.6.1	ศึกษาอิทธิพลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12.....	45
3.6.2	การศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหาร complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร	
3.6.2.1	การเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหารในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	45

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.6.2.2	การเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึงระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	46
3.6.2.3	การเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	46
3.7	การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC.....	46
3.8	สภาพการวิเคราะห์.....	48
3.9	การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	48
3.10	สถานที่ทำการวิจัย.....	48

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1	ผลการวิเคราะห์หาชนิดของวิตามินบี 12 ของเชื้อ <i>Propionibacterium freudenreichii</i> TISTR 446 ด้วยเทคนิค HPLC.....	49
4.2	ผลการศึกษาอิทธิพลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12.....	51
4.3	ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร	
4.3.1	ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	53
4.3.2	ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึงระหว่าง complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	57
4.3.3	ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	59

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	63
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก.....	71
ประวัติผู้แต่ง.....	90

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่		
2.1	แหล่งที่พบวิตามินบี 12.....	6
2.2	ปฏิกิริยาที่ต้องการ methylcobalamin เป็น โคเอนไซม์.....	8
2.3	ปฏิกิริยาที่ต้องการ deoxyadenosylcobalamin เป็น โคเอนไซม์.....	9
2.4	การผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ.....	18
2.5	แสดงตัวอย่างของ cobamides ที่สร้างโดยจุลินทรีย์.....	19
4.2	แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12.....	53
4.3	แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นวิตามินบี12 (ทั้งหมด)ของ เซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ใน complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	56
4.4	แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของเซลล์อิสระ ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	56
4.5	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของเซลล์อิสระระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	56
4.6	แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของเซลล์ที่ถูกตรึงระหว่าง complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	59
4.7	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของเซลล์ที่ถูกตรึงระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	59
4.8	แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	61
4.9	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร.....	62

สารบัญญภาพ

หน้า

ภาพที่		
2.1	โครงสร้างของวิตามินบี 12.....	3
2.2	แสดงส่วนประกอบหลักของโครงสร้างโคบาลามิน.....	5
2.3	แสดงการดูดซึมและการขนส่งวิตามินบี 12.....	7
2.4	การสังเคราะห์ methionine โดยอาศัยโฟเลตและวิตามินบี 12.....	10
2.5	ความสัมพันธ์ของวิตามินบี 12 กรดโฟลิก methionine และการสังเคราะห์ deoxythymidine monophosphate.....	11
2.6	แสดงรูปผลิตภัณฑ์วิตามินบี 12.....	12
2.7	แสดงวิถีทั่วไปของการสังเคราะห์วิตามินบี 12.....	15
2.8	แสดงโครงสร้างของการสร้างวิตามินบี 12.....	16
2.9	แสดงสูตรโมเลกุลวิตามินบี 2.....	14
2.10	เชื้อ <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	20
2.11	รูปแบบการตรึงเอ็นไซม์.....	26
2.12	แสดงโครงสร้างแอลจินท.....	28
2.13	แสดงผลิตภัณฑ์แอลจินท.....	29
2.14	แสดงการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด โดยสมมติให้สาร A เป็น สาร B เป็น , สาร C เป็น	30
2.15	แสดงโครมาโทแกรมของการแยกสาร 3 ชนิด จากภาพที่ 2.14.....	32
2.16	แสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC.....	33
3.1	วิธีการตรึงเซลล์โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจินท.....	44
3.2	ลักษณะเม็ดเจลของเชื้อ <i>Propionibacterium freudenreichii</i> TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินท.....	44
4.1	แสดงค่า retention time ของสารมาตรฐานวิตามินบี 12 ต่างๆ.....	50
4.2	แสดงกราฟความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ.....	52
4.3	แสดงกราฟเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	55

สารบัญภาพ(ต่อ)

	หน้า
4.4 แสดงกราฟเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	58
4.5 แสดงกราฟเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับ ถังหมักขนาด 2 ลิตร.....	60

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาของงานวิจัย

วิตามินบี 12 (cobalamin) เป็นวิตามินที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ถึงแม้ร่างกายจะต้องการในปริมาณเพียงวันละ 0.5 ไมโครกรัม ซึ่งเป็นปริมาณเพียงเล็กน้อยแต่ก็ขาดวิตามินนี้ไม่ได้ (Armstrong *et. al.* 1974) โดยมีความสำคัญทางด้านกายภาพ ทางด้านเภสัชกรรม ทางด้านโภชนาการ และทางด้านปศุสัตว์ จึงมีผลทำให้ความต้องการวิตามินบี 12 มีปริมาณเพิ่มขึ้น

ในปัจจุบันการผลิตวิตามินบี 12 จะได้จากการสังเคราะห์ทางจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 ได้ในปริมาณสูง คือ กลุ่มแบคทีเรีย *Propionibacteria* เช่น *Propionibacterium freudenreichii* และ *Propionibacterium shermanii* (Leviton and Hargrove. 1952)

ในประเทศไทยมีน้ำเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรอยู่มาก เช่น น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตยาปฏิชีวนะ น้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตกรดซัลฟูริกและน้ำเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล ซึ่งน้ำเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารเหล่านี้มีความอุดมสมบูรณ์ไปด้วยแหล่งสารอาหารที่จำเป็นในการผลิตวิตามินบี 12 (Becher *et. al.* 1962)

วิตามินบี 12 ที่ได้จากการสังเคราะห์จุลินทรีย์จะสะสมอยู่ในเซลล์ ต้องทำการสกัดวิตามินบี 12 ออกจากส่วนของกากเซลล์หลังจากแยกเซลล์ออกจากอาหารที่ใช้เลี้ยง ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเสียเวลา จึงได้มีการพัฒนานำระบบการตรึงเซลล์มาใช้ประโยชน์ในการผลิตวิตามินบี 12 ซึ่งการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบคือ ไม่เสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการแยกผลผลิตออกจากตัวเซลล์ และเซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงตัวสูงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยแคลเซียมแอลจินเอทเป็นสารตรึงเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีวิธีทำได้ง่าย รวดเร็ว ปลอดภัย หลังจากการตรึงเซลล์แล้ว เซลล์สามารถเจริญ และแบ่งตัวภายในเจลได้ จึงเหมาะในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตวิตามินบี 12 ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น (น้อย ทองสกุลพานิชย์. 2527)

ดังนั้นเพื่อช่วยลดมลภาวะ เป็นการนำเอาน้ำเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลมาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ เพื่อผลิตวิตามินบี 12 และเพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตวิตามินบี 12 ให้มากขึ้น จึงใช้ระบบการตรึงเซลล์มาใช้ในการศึกษาการผลิตวิตามินบี 12 ในครั้งนี้

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาขบวนการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตวิตามินบี 12 จากเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงในระดับถังหมัก
2. เพื่อวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณของวิตามินบี 12 โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาความสามารถในการผลิตและการส่งผ่านวิตามินบี 12 จากเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต
2. ศึกษาการวิเคราะห์หาชนิดของวิตามินบี 12 ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography
3. ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณของวิตามินบี 12 ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางการศึกษา และพัฒนาการผลิตวิตามินบี 12 ในระดับอุตสาหกรรม
2. เพื่อเป็นแนวทางการประยุกต์เทคนิคการวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณของวิตามินบี 12 โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

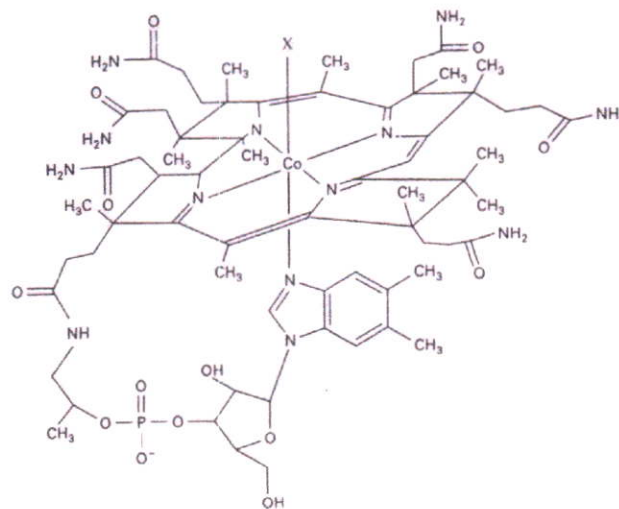
2.1 ประวัติของวิตามินบี 12

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

Rickes และคณะ กับ Smith ได้สกัดวิตามินบี 12 จากตับโดยสำเร็จเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1948 และตั้งชื่อว่า anti-pernicious anemia factor (Spallholz *et. al.* 1999)

Hodgkin และคณะ ได้เสนอสูตรโครงสร้างของวิตามินบี 12 โดยใช้วิธีการ X-ray diffraction ในปี ค.ศ. 1955-1960 แสดงดังภาพที่ 2.1

Woodward และ Eschenmoser ได้พยายามสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางเคมี โดยเริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1962 จนสำเร็จในปี ค.ศ. 1972 แต่วิตามินบี 12 ที่สังเคราะห์โดยทางเคมียังมีราคาสูงมาก การสังเคราะห์มีมากกว่า 70 ขั้นตอน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในปัจจุบันวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ในเชิงอุตสาหกรรม เป็นการผลิตด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพโดยจุลินทรีย์เท่านั้น (Ball. 1994)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของวิตามินบี 12 (Brody. 1994)

2.2 คุณสมบัติของวิตามินบี 12

2.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

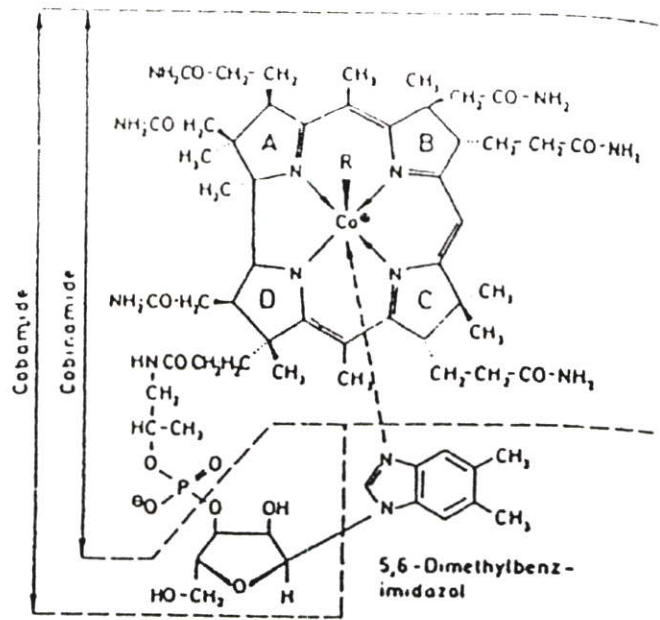
วิตามินบี 12 มีชื่อทางเคมีว่า 5,6-dimethylbenzimidazole cobamide cyanide หรือ Cyanocobalamin สูตรโมเลกุล คือ $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ เป็นผลึกรูปเข็ม หรือ ปริซึมสีแดงคล้ำ ไม่มีกลิ่นรส สามารถละลายน้ำได้ (1.25 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) สามารถละลายได้เล็กน้อยในแอลกอฮอล์ และฟีนอล แต่ไม่ละลายในอะซีโตน คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ผลึกของวิตามินบี 12 จะกลายเป็นสีดำที่อุณหภูมิ 210-220 องศาเซลเซียส และหลอมที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส (Ellenbogen and Cooper. 1991)

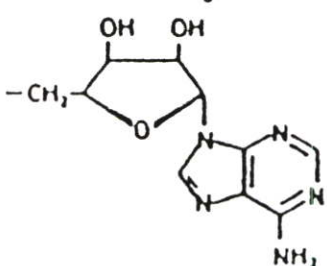
วิตามินบี 12 ในรูปของ cyanocobalamin จะเสถียรมากกว่าวิตามินบี 12 ในรูปอื่นๆ มีค่าความเสถียรที่ค่าพีเอช 4-7 และทนต่ออุณหภูมิของ autoclave (120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที) และการเติม ammonium sulphate จะช่วยเพิ่มความเสถียรของ cyanocobalamin อีกด้วย (Ball. 1994) ส่วนวิตามินบี 12 ในรูปของ adenosylcobalamin และ methylcobalamin จะถูกสลายได้โดยแสงสว่าง (สมทรง เลขะกุล. 2543)

2.2.2 คุณสมบัติทางเคมี

โมเลกุลของวิตามินบี 12 แกนกลางประกอบด้วยโคบอลต์เป็นศูนย์กลาง ล้อมรอบด้วย tetrapyrrol ring (porphyrin) ที่ต่างก็มี N-atoms เชื่อมกับ Co-atoms และมี 6 side chains (acetamide 3 กลุ่ม และ propionamide 3 กลุ่ม) ส่วนที่เรียกว่า นิวเคลียสคอร์ริน (corrin nucleus) เป็นส่วนสำคัญของวิตามินบี 12 นี้ บางครั้งเราอาจเรียกวิตามินบี 12 นี้ว่า คอร์ริโนอิด (corrinooids) และมีโคบอลต์เป็นนิวเคลียส จึงเรียกกันโดยทั่วไปว่าเป็น โคบอลท์คอร์ริโนอิด (cobalt corrinooids)

จากแกนกลางมีแขนยื่นขึ้นข้างบนเรียกว่า upper ligand ส่วนข้างล่างที่มีแขนยื่นลงไปจากศูนย์กลางโคบอลท์ เรียกว่า lower ligand ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไรโบสฟอสเฟต และ organic base ทั้งหมดของ lower ligand นี้เรียกว่า nucleotide moiety ถ้าวิตามินบี 12 มีส่วนประกอบ nucleotide moiety ครบดังข้างต้นเราเรียกว่า วิตามินบี 12 สมบูรณ์แบบ (Vitamin B₁₂ complete type) ส่วน upper ligand อาจแทนที่ด้วยสารต่างๆ กัน เช่น หมู่ CN , OH , CH₃ หรือ 5'-deoxyadenosyl โดยจะมีการเรียกชื่อต่างๆ กัน โมเลกุลคอร์ริโนอิดที่ปราศจาก nucleotide residues เรียกว่าโคบินามิด (cobinamide) หรือแฟกเตอร์บี (factor B) แต่หากโมเลกุลคอร์ริโนอิด ดังกล่าวขาดเฉพาะส่วน base เรียกว่าโคบาไมด์ (cobamide) ถ้าโมเลกุลดังกล่าวมีทุกกลุ่มรวมทั้งกลุ่ม 5,6-dimethylbenzimidazole เรียกว่า โคบาลามิน (cobalamin) แสดงดังภาพที่ 2.2 (บุษบา ยงสมิทธิ์. 2540)



R	Designation
- CN	Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)
- OH	Vitamin B _{12a} (Hydroxocobalamin)
- CH ₃	Methylcobalamin
	Coenzyme B ₁₂ (5-Deoxyadenosylcobalamin)

ภาพที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบหลักของโครงสร้างโคบาลามิน (Florent and Ninet. 1979)

2.3 แหล่งที่พบวิตามินบี 12

วิตามินบี 12 ในธรรมชาติ ได้จากการสังเคราะห์จากจุลินทรีย์เท่านั้น สัตว์และพืชสังเคราะห์ไม่ได้ โดยสัตว์ได้รับวิตามินบี 12 จากอาหารหรือน้ำที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ เช่น สัตว์จำพวกวัว และแกะ มีวิตามินบี 12 จากการสังเคราะห์ของแบคทีเรียที่อยู่ในช่องท้อง หรือจากการกิน (Wardlaw. 1999) มนุษย์ได้รับวิตามินบี 12 ในอาหารที่ได้จากสัตว์เท่านั้น ส่วนพืชผักและผลไม้ไม่มีวิตามินบี 12 เพราะพืชไม่มีการใช้โคบอลท์ (สมทรง เลขะกุล. 2543)

แหล่งวิตามินบี 12 ได้แก่ เนื้อสัตว์ (ตับ ไต และหัวใจ), เบ็ดไก่, อาหารทะเล, ไข่, เนื้อวัว, ไข่กรอก, แสม, นมและผลิตภัณฑ์นม, ถั่วเหลือง แสดงดังตารางที่ 2.1 (Wardlaw. 1999)

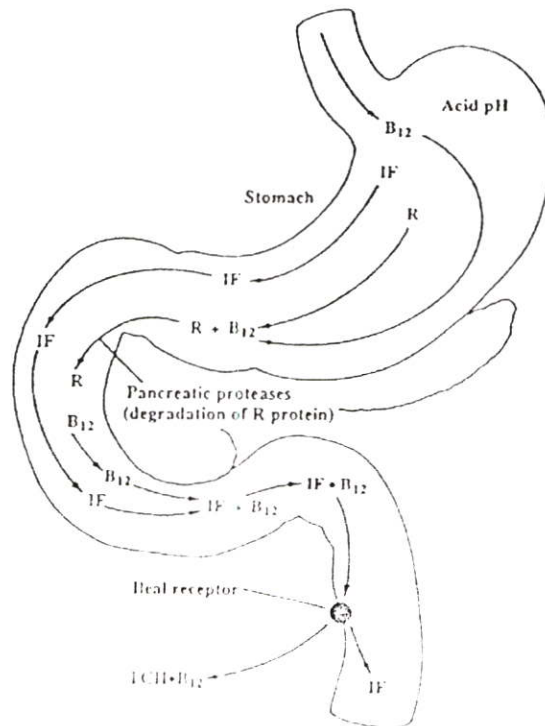
ตารางที่ 2.1 แหล่งที่พบวิตามินบี 12 (Wardlaw. 1999)

ประเภทอาหาร	จำนวน	วิตามินบี 12 (ไมโครกรัม)
ตับวัวย่าง	1 ออนซ์	31.8
หอยกาบเผา	1 ออนซ์	15.6
หอยนางรมอบ	2	14.4
เนื้อย่าง	3 ออนซ์	2.0
โยเกิร์ต	1 ถ้วย	1.4
นมถั่วเหลือง	8 ออนซ์	1.0
นมสด	8 ออนซ์	0.9
ไข่กรอกเนื้อ	1	0.9
ไข่ต้ม	1	0.6
แสมสุก	3 ออนซ์	0.5

2.4 การดูดซึมและการขนส่ง

วิตามินบี 12 ในอาหารส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของโคเอนไซม์ที่จับอยู่กับโปรตีน ซึ่งจะถูกสลายได้บ้างในขณะประกอบอาหาร และโดยความเป็นกรดหรือเอนไซม์เปปซินในกระเพาะอาหารจะสลายให้ได้วิตามินบี 12 เสรีออกมา ในคนที่ไม่มีการกรดในกระเพาะอาหารหรือถูกตัดกระเพาะอาหารบางส่วนออกไป จะทำให้วิตามินบี 12 ไม่แยกออกมาและทำให้การดูดซึมช้าลง อย่างไรก็ตาม โคบาลามินก็อาจถูกปล่อยออกมาได้เมื่ออยู่ในลำไส้โดยอาศัยเอนไซม์โปรติเอสจากตับอ่อน การดูดซึมวิตามินบี 12 เป็นการดูดซึมที่ต่างจากสารอาหารชนิดอื่นๆ เนื่องจากต้องมีปัจจัยหลายชนิดเข้ามาเกี่ยวข้อง (Rose *et. al.* 1984)

วิตามินบี 12 เสรี ที่ได้ออกมาในกระเพาะอาหารในครั้งแรกนี้จะสัมผัสกับ intrinsic factor (IF) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่งหลังจาก parietal cell ของกระเพาะอาหาร และ R-protein ซึ่งหลังจากต่อมน้ำลายและกระเพาะอาหาร (Grasbeck. 1984 ; Seetharam and Alpers. 1985) ในกระเพาะอาหารวิตามินบี 12 เสรีจะจับกับ R-protein เป็น R-protein-B₁₂ complex ได้รวดเร็วกว่า IF R-protein-B₁₂ complex เมื่อผ่านไปยังลำไส้เล็กส่วนต้นแล้ว R-protein จะถูกแยกออกจากวิตามินบี 12 โดยเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อน วิตามินบี 12 ที่ถูกปล่อยออกมาในครั้งที่สองนี้จะจับกับ IF ที่ตามลงมาจากระเพาะอาหารเป็น IF-B₁₂ complex แล้วผ่านต่อไปยังบริเวณ ileum จากนั้นก็จะส่ง IF-B₁₂ complex นี้ให้กับ receptor ของเซลล์ที่ผนังลำไส้ B₁₂ จะไปจับกับ transcobalamin II (TCII) เป็น TCII-B₁₂ complex แล้วก็จะผ่านเข้าสู่ portal venous blood ไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ที่ต้องการ แสดงดังภาพที่ 2.3 สำหรับการดูดซึมวิตามินบี 12 เป็นไปโดยวิธี passive diffusion ผ่าน IF-mediated mechanism ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถดูดซึมได้แม้มีปริมาณของวิตามินบี 12 เพียง 1-3 ไมโครกรัมก็ตาม ถ้าปริมาณของวิตามินบี 12 สูงๆ การดูดซึมจะไม่ต้องมีการใช้พาหะเป็นตัวพาไปเหมือนข้างต้น แต่วิธีการแบบหลังนี้สู้วิธีแรกไม่ได้ เพราะจะมีการดูดซึมได้น้อยกว่า (Seetharam and Alpers. 1982)



ภาพที่ 2.3 แสดงการดูดซึมและการขนส่งวิตามินบี 12 (Groff *et al.* 1995)

2.5 หน้าที่ของวิตามินบี 12

วิตามินบี 12 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมในร่างกายในรูปของโคเอนไซม์ 2 ชนิดด้วยกัน คือ deoxyadenosylcobalamin และ methylcobalamin แสดงดังตารางที่ 2.2 และ 2.3

ตารางที่ 2.2 ปฏิกริยาที่ต้องการ methylcobalamin เป็นโคเอนไซม์ (Ellenbogen and Cooper. 1991)

เอนไซม์	ปฏิกิริยา
1. N ⁵ -Methyltetrahydrofolate homocysteine methyltransferase (methionine synthetase)	$\text{CH}_3\text{-THFA} + \text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{THFA}$
2. Methane synthetase	$2\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$
3. Acetate synthetase	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$

THFA = Tetrahydrofolic acid

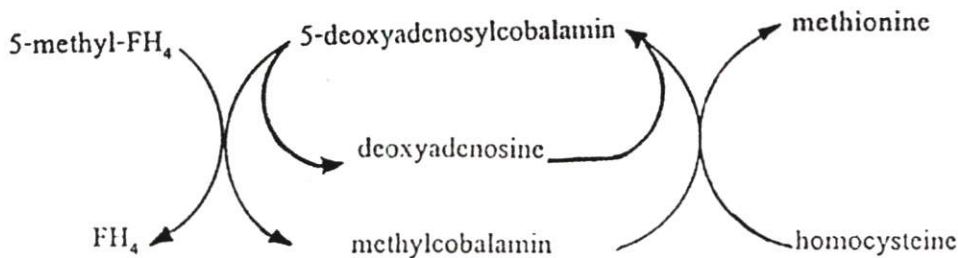
ตารางที่ 2.3 ปฏิกิริยาที่ต้องการ deoxyadenosylcobalamin เป็นโคเอนไซม์
(Ellenbogen and Cooper. 1991)

เอนไซม์	ปฏิกิริยา
1. Glutamate mutase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
2. Methylmalonyl - CoA mutase	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{o} \\ \quad // \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{SCoA} \\ \\ \text{H} \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{o} \\ \quad // \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{C}-\text{SCoA} \end{array}$
3. α - Methylene glutarate mutase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{CH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$
4. a. Dioldehydase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \end{array} \rightarrow \text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}-\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$
b. Dioldehydase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \end{array} \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{H}_2\text{O}$
5. Glyceroldehydase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{H} \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO} + \text{H}_2\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
6. Ethanolamine ammonia lyase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{OH} \end{array} \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NH}_3$
7. L - β - Lysine mutase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
8. D - α - Lysine mutase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
9. Ornithine mutase	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
10. L - β - Leucine aminomutase	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}-\text{CHNH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$

2.5.1 methylcobalamin ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ methyl transferase ในการขนย้ายหมู่ CH_3 ที่ใช้สังเคราะห์ methionine choline และ thymine ตัวอย่างเช่นการสังเคราะห์ methionine จาก homocysteine กล่าวคือ เมื่อร่างกายได้รับโฟเลตจากอาหารเข้าไปแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ เก็บไว้ที่ตับและตามกล้ามเนื้อต่างๆ จากนั้น $\text{CH}_3\text{-FH}_4$ ก็จะส่งหมู่ CH_3 ให้กับ homocysteine เพื่อสังเคราะห์เป็น methionine และ $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ จะเปลี่ยนไปเป็นดังสมการ

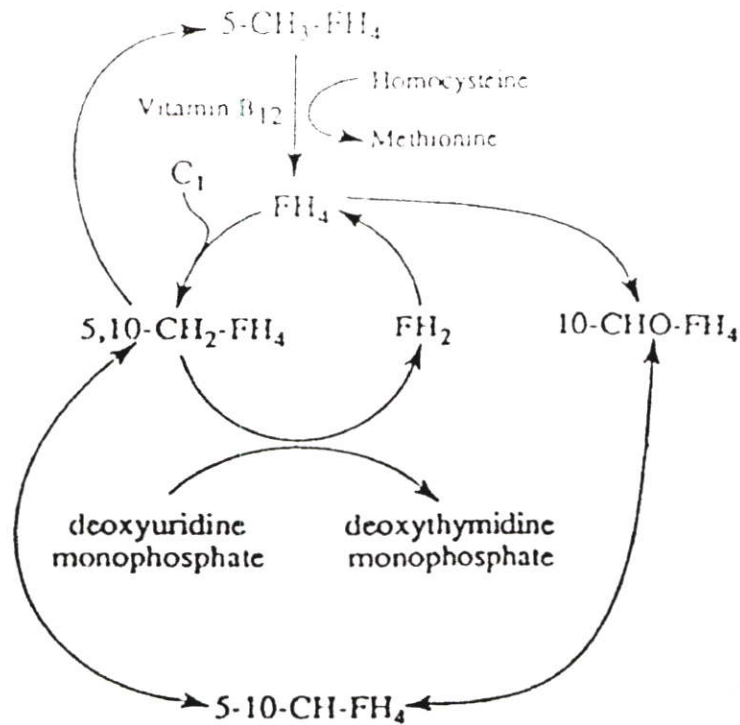


เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้คือเอนไซม์ 5-deoxyadenosylcobalamin เป็นตัวรับ CH_3 จาก $\text{CH}_3\text{-FH}_4$ แสดงดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 การสังเคราะห์ methionine โดยอาศัยโฟเลตและวิตามินบี 12 (Marks *et. al.* 1996)

ในบรรดาสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือเอนไซม์ 5- CH_3 -THF-homocysteine methyl-transferase (methionine synthase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวเท่านั้นที่จะใช้ในการขนส่งหมู่ CH_3 จาก $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ ไปให้กับ homocysteine ในการสังเคราะห์ methionine ได้เท่านั้น ดังนั้นถ้าร่างกายขาดวิตามินบี 12 ก็จะทำให้เกิดการสะสม $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ ในร่างกายมากขึ้นจึงทำให้ขาด FH_4 ที่ร่างกายจำเป็นต้องนำไปใช้ในปฏิกิริยาสำคัญอื่นๆ แสดงดังภาพที่ 2.5 ด้วยเหตุนี้โฟเลตที่มีในร่างกายก็จะคงอยู่ในสภาพของ $5\text{-CH}_3\text{-FH}_4$ จึงเท่ากับร่างกายขาด FH_4 ไปด้วย ผลที่ตามมาจะทำให้การสังเคราะห์สารประกอบสำคัญอื่นๆ เช่น deoxythymidine phosphate ที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ DNA ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งเกี่ยวกับเซลล์ก็จะบกพร่องไป ดังนั้นจะเห็นว่าทั้งโฟเลต วิตามินบี 12 และ methionine มีความสัมพันธ์กัน ถ้าร่างกายขาดวิตามินบี 12 ก็เท่ากับว่าร่างกายขาดโฟเลตด้วย จากตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนเกี่ยวกับความผิดปกติทางโลหิตวิทยาที่เนื่องมาจากการขาดวิตามินบี 12 จะไม่มีความแตกต่างไปจากการขาดกรดโฟลิกเลย ทั้งนี้ไม่ว่าจะขาดวิตามินชนิดหนึ่งชนิดใดดังกล่าวข้างต้น ก็จะทำให้เกิดการขาด $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ methylene FH_4 ที่จะส่ง CH_3 ให้กับ deoxyuridylylate เพื่อสังเคราะห์ thymidylylate ที่จะนำไปสังเคราะห์ DNA ต่อไป



ภาพที่ 2.5 ความสัมพันธ์ของวิตามินบี 12 กรดโฟลิก methionine และการสังเคราะห์ deoxythymidine monophosphate (Groff *et. al.* 1995)

ดังนั้น เมื่อร่างกายขาดวิตามินบี 12 หรือกรดโฟลิกก็ทำให้ DNA สังเคราะห์ได้ไม่เพียงพอทำให้เซลล์ที่สร้างเม็ดเลือดในไขกระดูกเกิดความผิดปกติ และตายลง จะส่งผลต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวให้มีลักษณะผิดปกติไปและเกิด megaloblastosis ขึ้น ทำให้เซลล์เม็ดเลือดมีขนาดใหญ่ขึ้น ลักษณะเซลล์เป็นรูปไข่และมีอายุสั้นลง (สมทรง เลขะกุล. 2543)

2.5.2 5-deoxyadenosylcobalamin โคเอนไซม์นี้ทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ methylmalonyl CoA ได้สารที่จะส่งต่อเข้าสู่วงจรเครบส์ เพื่อผลิตพลังงานออกมา ดังนั้นถ้าร่างกายขาดวิตามินนี้จะมี methylmalonic acid คั่งในร่างกาย และถูกขับถ่ายทางปัสสาวะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมี propionyl CoA เพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้เพราะ propionyl CoA เป็นสาร intermediate ที่ได้จาก β -oxidation ของกรดไขมันเลขคี่ ที่จะเปลี่ยนไปเป็น methylmalonyl CoA ได้ โดยขบวนการ CO₂ fixation (ใช้ไบโอติน) สารดังกล่าวที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยเป็น competitive inhibitor ของ acetyl CoA carboxylase (Cox and White. 1962)

2.6 การขาดวิตามินบี 12

สาเหตุของการขาดวิตามินบี 12 อาจเกิดได้จาก

- 1) ได้รับความวิตามินบี 12 จากอาหารไม่พอ ได้แก่ พวกที่ไม่กินเนื้อสัตว์ (พวกมังสะวิรัตแบบเคร่ง) และพวกโรคพิษสุราเรื้อรัง เป็นต้น (Wardlaw. 2000)
- 2) การดูดซึมไม่ดี เช่น ในรายที่ขาดน้ำย่อยจากตับอ่อนทำให้ R-protein ไม่ถูกสลายออกไป ในภาวะที่มีการทำลายเยื่อของ ileum เช่น ผู้ป่วยที่ถูกตัด ileum ออกบางส่วน หรือทำทางเบี่ยงไม่ให้อาหารผ่าน ileum หรือได้รับยาที่ไปขัดขวางการดูดซึม
- 3) ขาด intrinsic factor (IF) เช่น ผู้ป่วยที่ต้องตัดกระเพาะอาหารส่วนใหญ่ออกไป มี IF-antibodies หรือ parietal cell antibodies ทำให้ IF ทำหน้าที่ไม่ได้ หรือหลั่งออกมาไม่ได้
- 4) มีพยาธิลำไส้แย่งวิตามินบี 12 ในลำไส้ไปใช้

2.7 ประโยชน์ของวิตามินบี 12

2.7.1 ทางการแพทย์

กรณีคนที่เป็นโรค pernicious anemia เกิดจากความบกพร่อง intrinsic factor (IF) โดยให้วิตามินบี 12 ในรูปไซยาโนโคบาลามิน 300 ไมโครกรัมทุกวันติดต่อกัน ส่วนกรณีของโรคประสาทที่เกิดจากการขาดวิตามินบี 12 จะให้วิตามินบี 12 สูงถึง 1000 ไมโครกรัมต่อวัน(บุษบายงสมิทธิ์. 2540)

2.7.2 ทางด้านเภสัชกรรม

กระตุ้นการเจริญเติบโตในเด็กที่เติบโตช้ากว่าปกติ คือ เมื่อให้วิตามินบี 12 เข้าไปจะเพิ่มความอยากอาหารและกินอาหารได้มากขึ้น แสดงดังภาพที่ 2.6 แต่ในเด็กที่มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ ไม่ขาดวิตามินบี 12 เมื่อให้วิตามินบี 12 ก็จะไม่มียผล (Lindenbaum *et. al.* 1988)



ภาพที่ 2.6 แสดงรูปผลิตภัณฑ์วิตามินบี 12

2.7.3 ทางด้านอาหารสัตว์

วิตามินบี 12 มีความสำคัญต่อสัตว์ที่กำลังเจริญเติบโต มากกว่าสัตว์ที่โตเต็มที่แล้ว ถ้าขาดวิตามินบี 12 ในระยะนี้ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตช้า อัตราการตายสูง ในพวกเป็ด ไก่ ทำให้มีขนน้อย เปอร์เซ็นต์การฟักต่ำ ส่วนในลูกสุกรทำให้ขาหลังเสียว ผิวหนังหยาบ ในสัตว์พวกเคี้ยวเอื้อง วิตามินบี 12 มีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของกรดโพรพิโอนิก คือ โคเอนไซม์วิตามินบี 12 มีความสำคัญในการเปลี่ยน methylmalonyl CoA ไปเป็น succinyl CoA โดยกรดโพรพิโอนิก ซึ่งเป็นผลผลิตหลักจากการหมักในกระเพาะรูเมน คือ จะเปลี่ยนเป็น propionyl CoA และ methylmalonyl CoA ตามลำดับ ถ้าขาดวิตามินบี 12 เกิดการสะสมของ methylmalonyl CoA และกรดโพรพิโอนิกในร่างกาย และขับออกมาทางปัสสาวะทำให้สัตว์มีอาการเบื่ออาหาร อัตราการเจริญลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแอ ความสำคัญของวิตามินบี 12 ต่อสัตว์ คือ ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับการสร้าง methyl group จาก one- carbon precursor พบว่าลูกไก่ต้องการโปรตีนจากสัตว์เพื่อเสริมการเจริญซึ่งเรียกว่า Animal Protein Factor (APF) ซึ่งพบในอาหารที่มาจากสัตว์ พบว่าวิตามินบี 12 เป็นองค์ประกอบสำคัญของ APF โดยทั่วไปสุกรที่มีน้ำหนักระหว่าง 12-23 กิโลกรัม ต้องการวิตามินบี 12 ในปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และลูกไก่ที่กำลังเจริญต้องการวิตามินบี 12 ปริมาณ 9 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (McDonald and Greenhalgh. 1973 ; Maynard *et. al.* 1979)

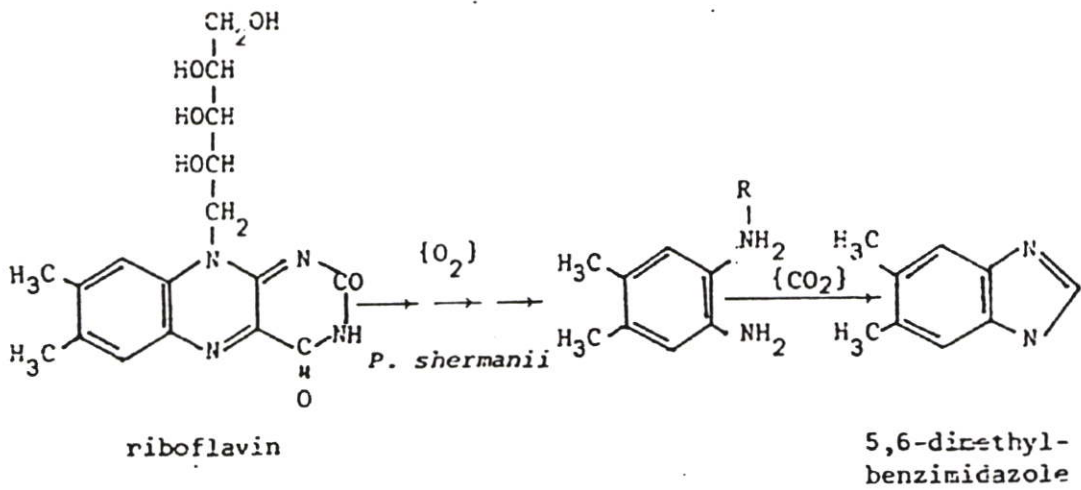
2.8 กระบวนการสังเคราะห์วิตามินบี 12 ทางชีวภาพ (Boretti *et. al.* 1960)

การสังเคราะห์วิตามินบี 12 ขั้นตอนแรก คือ การสร้างวงแหวนคอรีน (corrin ring) จากสารเริ่มต้น succinyl CoA และ glycine รวมกันได้ δ - aminolaevulinic acid โดยมีการสร้างส่วนต่างๆ คือ A , B , C และ D โดยที่แต่ละส่วนเรียกว่า porphobilinogen ซึ่งมาจับกันโดยเอนไซม์ deaminase และ isomerase ได้สาร uroporphyrin III และเกิดปฏิกิริยาต่างๆ สรุปได้ดังนี้

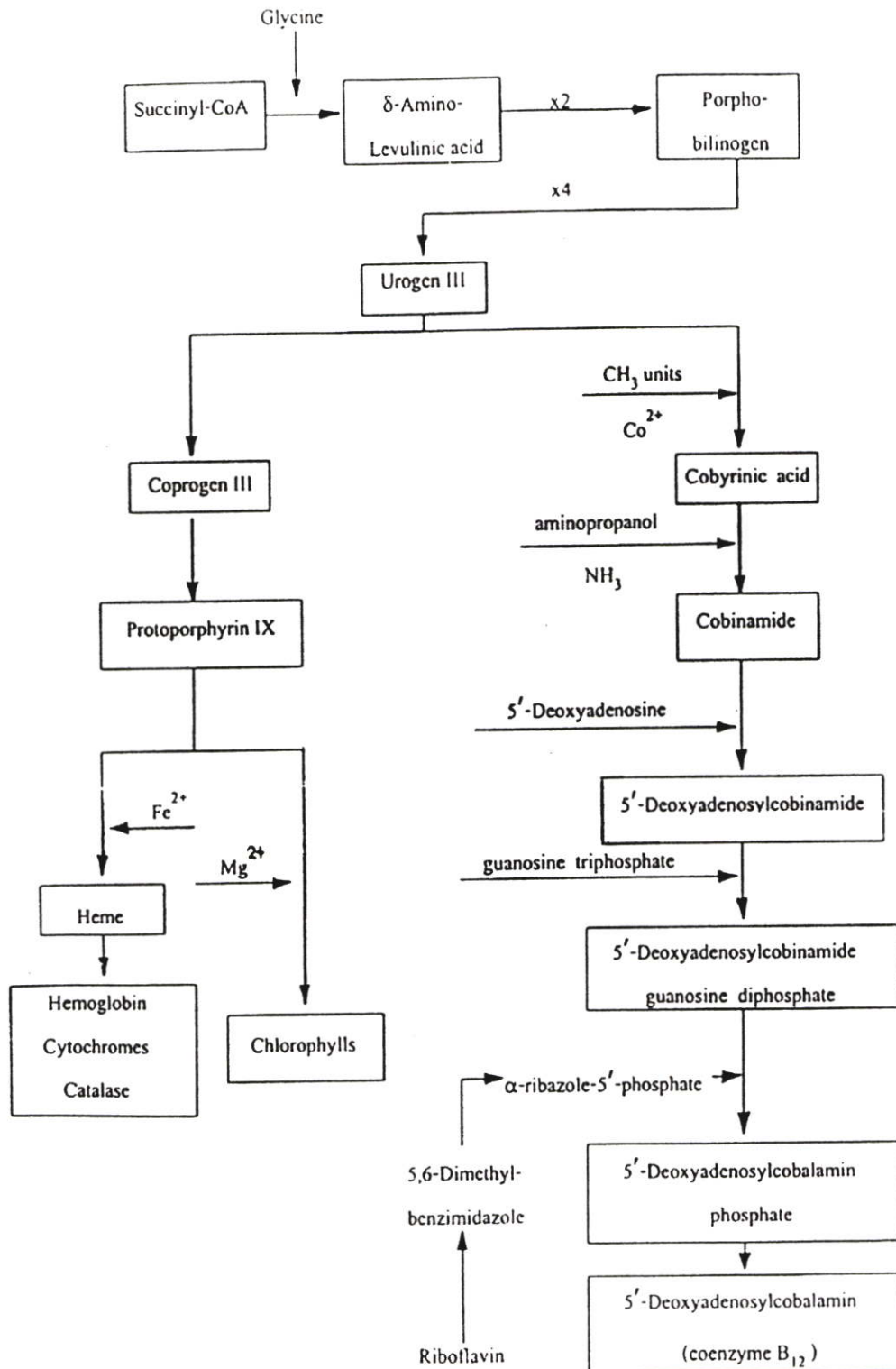
- 1) มีการเชื่อมต่อระหว่างวงแหวนโดยตรงระหว่าง A และ D โดยปฏิกิริยา hydrogenation และ isomerization
- 2) เกิด methylation โดย methionine ในอาหารจะเติมหมู่ (CH_3) กับนิวเคลียสคอรีน 7 จุด สารที่ให้หมู่ methyl ดังกล่าวอาจเป็น methionine , choline หรือ betaine
- 3) มีปฏิกิริยา decarboxylation ที่วงแหวน C เปลี่ยนวงแหวน A จาก $\text{CH}_2\text{-COOH}$ เป็น CH_3 group

4) โคบอลต์จะเข้าไปรวมที่ศูนย์กลาง ถึงขั้นที่นิวเคลียสคอรีนสมบูรณ์ ต่อไปเป็นการเชื่อมของส่วน upper ligand เช่น 5'-deoxyadenosyl จะเข้าไปเป็น upper ligand ของโมเลกุลโดยต่อกับโคบอลต์ จากนั้นเป็นการเชื่อม lower ligand เข้าไปต่อกับโคบอลต์ที่ส่วนล่างโดยผ่านกระบวนการที่มีการสร้างสิ่งต่างๆ ดังนี้ การเชื่อมของ nucleotide residue การสร้าง 5,6-dimethylbenzimidazole riboside (DMR riboside) และ การสร้างพิวรีน แสดงดังภาพที่ 2.7 และ 2.8

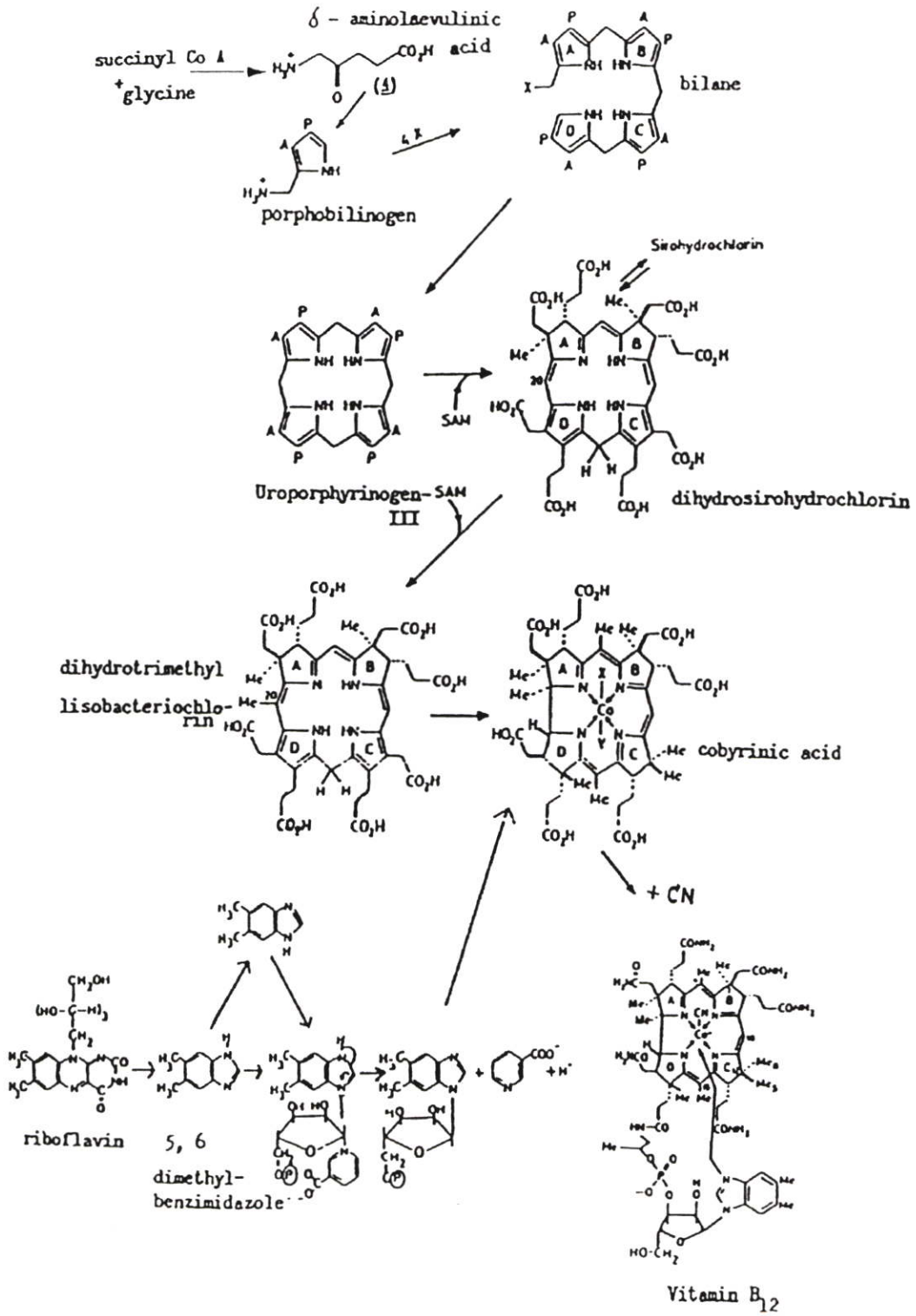
วิตามินบี 2 (riboflavin) เป็นสารตั้งต้นของ DBI (5,6-dimethyl benzimidazole) ซึ่งเป็นส่วน lower ligand ของโมเลกุลวิตามินบี 12 แสดงดังภาพที่ 2.9 (Renz. 1970)



ภาพที่ 2.9 แสดงสูตร โมเลกุลวิตามินบี 2 (Renz. 1970)



ภาพที่ 2.7 แสดงวิธีทั่วไปของการสังเคราะห์วิตามินบี 12 (Florent and Ninet. 1979)



ภาพที่ 2.8 แสดงโครงสร้างของการสร้างวิตามินบี 12 (Florent and Ninet. 1979)

2.9 จุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12

การผลิตวิตามินบี 12 ระดับอุตสาหกรรมในระยะแรกเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น สเตรปโตมัยซิน ผลิตโดย *Streptomyces griseus* (Smith and Ball. 1953) ,นีโอมัยซิน ผลิตโดย *S. fradiae* (Jackson et. al. 1951) และคลอเตตระซัยคลิน ผลิตโดย *S. aureofaciens* (Pierce et. al. 1950) แต่วิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ปริมาณค่อนข้างต่ำ อีกทั้งยังมีสารปฏิชีวนะเจือปน ทำให้ยุ่งยากในการทำวิตามินบริสุทธิ์ และยังเป็น การเพิ่มต้นทุนการผลิต (Noyes. 1969) ต่อมา มีผู้รายงานว่าน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตต่างๆ เมื่อผ่านกระบวนการกำจัดแล้วยังมีปริมาณ วิตามินบี 12 เพิ่มขึ้นในส่วนตะกอน (sludge) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการเติมเกลือโคบอลต์ใน ระหว่างกระบวนการกำจัดน้ำเสีย (Casida. 1968)

ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ปริมาณสูง โดยการคัดเลือก โดยตรง หรือทำให้เกิดการกลาย เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Propionibacterium* พบว่า *Propionibacterium* บางสายพันธุ์สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในปริมาณสูงถึง 25,000 ไมโครกรัม ต่อลิตร (Hastings. 1971) จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินบี 12 และสารที่มี คุณสมบัติคล้ายวิตามินบี 12 ได้แก่ แบคทีเรีย แอคติโนมัยซีส ยีสต์ รา และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จุลินทรีย์เหล่านี้บางชนิดเท่านั้นที่สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้สูงเพียงพอในระดับอุตสาหกรรม แสดงดังตารางที่ 2.4 และ 2.5

ตารางที่ 2.4 การผลิตวิตามินบี 12 โดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Florent and Ninet. 1979)

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

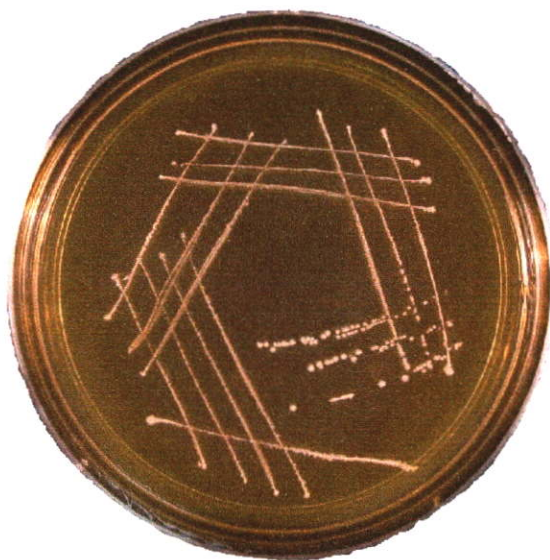
ตารางที่ 2.5 แสดงตัวอย่างของ cobamide ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ (Florent and Ninet. 1979)

cobamide	sources
5,6 Dimethyl- α -benzimidazolylcobamide	Bacilli, Propionibacteria Sewage, Streptomyces
α -Adenylcobamide	Anaerobes, Propionibacteria Rumen samples, Sewage.
2 - Methyl- α -adenylcobamide	Anaerobes, Propionibacteria Rumen samples, Sewage
5 - Hydroxy- α -benzimidazolylcobamide	Sewage
2 - Methylmercapto- α -adenylcobamide	Sewage
α - Guanylcobamide	Nocardia
Cobinamide	Propionibacteria Streptomyces, Rumen samples
5-Methyl - α -benzimidazolylcobamide	Sewage
α - Benzimidazolylcobamide	Sewage

2.10 ลักษณะ และคุณสมบัติของ *Propionibacterium freudenreichii*

Propionibacteria เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช้ออกซิเจน สกุล *Propionibacterium* แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่อยู่ในนม และพวกที่อยู่ตามผิวหนัง (Pouwels *et. al.* 1999)

Propionibacterium freudenreichii เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ รูปร่างหลายแบบได้แก่ เชื้อที่เจริญในสภาวะไร้อากาศจะมีรูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่า 0.5 ไมครอน เรียงตัวเป็นคู่ หรือสายสั้น ๆ ส่วนเชื้อที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อยจะเป็นรูปร่างเป็นท่อน เหมือนไม้กระบอง (club shape) หรือเป็นท่อนยาว ระหว่างการหมักมักเกิดกรดไพรูวิกด้วยซึ่งช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มักพบเชือกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์นม ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ (Buchanan *et. al.* 1974) คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถผลิตวิตามินบี 12 ได้ในสภาวะไม่มีอากาศ หรือมีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) แสดงดังภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*

2.11 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*

2.11.1 อุณหภูมิบ่ม

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

2.11.2 ค่าพีเอชของอาหาร

ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 6.8-7.2 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ค่าพีเอช 7.0 (Prescott and Dunn. 1959) จึงควรรักษาค่าพีเอชของอาหารให้อยู่ระหว่าง 4-9 เพราะถ้าค่าพีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้ จะทำให้เกิดการสลายตัวของวิตามินบี 12 เนื่องจากโคบาลามินไม่คงตัวหรือถูกทำลายไป (Noyes. 1969)

2.11.3 แหล่งธาตุอาหาร

1) แหล่งคาร์บอน (carbon source)

ประเภทที่เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น เด็กซ์โตส กลูโคส มอลโตส โซโลส น้ำตาลอินเวอร์ท คอร์นไซรัป แลกโตส ซูโครส กากน้ำตาล และแป้ง ส่วนประเภทที่เป็นสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น กรดแลกติก กรดกลูโคนิก กรดซิตริก และกลีเซอรอล (Baron. 1962) ต้องใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการศึกษาพบว่า กลูโคส เป็นแหล่งธาตุคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด (Speedie and Hull. 1960)

2) แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

เช่น กรดอะมิโน หรือ โปรตีนจากถั่วเหลือง ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี ข้าวโพด เนื้อสัตว์ เปปโตน ปลาบ่น ถั่วป่น กากเมล็ดฝ้าย yeast extract , tryptic digest of casein , pancreatic digest of casein , meat extract , blood meal protein , corn steep liquor และ lactalbumin (Baron. 1962) สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด ได้แก่ yeast extract (Prescott and Dunn. 1959) ส่วนกรดอะมิโนบางชนิด เช่น ไกลซีน เมทไธโอนิน ซีรีน กลูตามีน อาร์จินีนและอะลานีน จะช่วยเร่งการผลิตวิตามินบี 12 จากเชื้อ *P. shermanii* แต่ซีสทีนจะยับยั้งขบวนการนี้ (Kucheras. 1972)

3) แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุมีความสำคัญต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ได้แก่ โคบอลท์ (Co) , ไซยาไนต์ (CN) , เหล็ก (Fe) , แมกนีเซียม (Mg) และฟอสเฟต (PO₄)

โคบอลท์ ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 เมื่อเติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อในปริมาณไม่เกิน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้ามีโคบอลท์ในปริมาณสูงเกินไปจะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และมีผลไปถึงการสร้างวิตามินบี 12 อาจใช้โคบอลท์ในรูปของเกลือที่ละลายน้ำได้ เช่น คลอไรด์ ซัลเฟต ไนเตรท หรือเกลือโคบอลท์อื่น ๆ (Baron. 1962) *Propionibacterium* ต้องการโคบอลท์ ประมาณ 10-20 ppm (Noyes. 1969)

ไซยาไนต์ ช่วยเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 เมื่อเติมในอาหารจะต้องเติมในปริมาณไม่เกิน 0.1-100 มิลลิกรัม ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และมักเติมในรูปเกลือของ แอมโมเนียม โซเดียม โพแทสเซียม (Baron. 1962) และรูปอื่น ๆ หรือในรูปของเหลว และก๊าซ เช่น กรดไฮโดรไซยานิก

เหล็ก มีผลต่อการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium shermanii* ส่วน แมกนีเซียม มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Osman and Chenouda. 1968) แต่ธาตุทองแดง (Cu) และบิสมัท (Bi) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ขณะที่ผงซักฟอกจะยับยั้งการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 (Petty. 1948)

ฟอสเฟต มีความสำคัญต่อเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียโพรพิโอนิกในปฏิกิริยา เอนไซม์ต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการสังเคราะห์ ATP ฟอสโฟลิปิด RNA และ DNA

4) แหล่งอาหารเสริม

แหล่งอาหารเสริมที่ช่วยเร่งการเจริญ และการผลิตวิตามินบี 12 คือ ไบโอดีนิ กรดแพนโททีนิก และ วิตามินบี 2 โดยพบว่าแคลเซียมแพนโททีนิก และไบโอดีนิ ในทางเสริมกัน (synergistic action) ต่อการเจริญ และการผลิต corrinoid ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในการ สังเคราะห์วิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิก (Zodrow et. al. 1963)

2.11.4 การให้อากาศ

จากการศึกษาขบวนการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิก พบว่ามีอยู่ 2 ช่วง คือ ช่วงแรกปรับให้อยู่ในสภาพไม่มีอากาศ โดยการผ่านก๊าซไนโตรเจนหรือคาร์บอนไดออกไซด์ ลงในอาหาร หรือรักษาระดับก๊าซเหนืออาหารโดยไม่ต้องกวน เพราะการกวนจะเป็นการนำ ออกซิเจนละลายลงในอาหาร ต่อมาคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเกิดขึ้นจากการหมักจะช่วยรักษาสภาพ ไม่มีอากาศของอาหาร ในช่วงนี้เป็นการหมักธรรมดาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลานานกว่า

120 ชั่วโมง ส่วนช่วงหลังปรับให้อาหารสัมผัสกับอากาศในสภาพ microaerophilic โดยจะให้ ออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นเวลา 70-80 ชั่วโมง จะเพิ่มผลผลิตวิตามินบี 12 ได้มาก แต่การให้ออกซิเจนมากเกินไปจะทำให้ผลผลิตวิตามินบี 12 น้อยลง (Speedie and Hull. 1960)

2.12 กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักแบบอาหารเหลว เป็นการหมักในอาหารเหลวหรือส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำที่มีสารอาหารต่างๆ ละลายอยู่ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการ เจริญเติบโตและทำการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ได้

จากปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* ดังข้างต้นนั้น กระบวนการผลิตวิตามินบี 12 ที่นิยมใช้ คือกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลว ง่ายต่อการควบคุมปัจจัยและสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของจุลินทรีย์ เช่น การเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในน้ำทิ้งโรงงานผลิตซอสถั่วเหลือง (เทพสิทธิ์ ผดุงโยธี และคณะ. 2540) , การเลี้ยงเชื้อ *P. freudenreichii* จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่ (กิจจา ช.เจริญยิ่ง และคณะ. 2536 ; กอบชัย พรคุณฎีกุล และเกศินี ชื่นปิยะวาจา. 2538) , การเลี้ยงเชื้อ *P. freudenreichii* จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมปลาทุ่นำกระป๋อง (ฉวีวุฒิสุรณัฐกุล และคณะ. 2536) เพื่อผลิตวิตามินบี 12

2.13 การผลิตวิตามินบี 12 โดยระบบตรึงเซลล์

2.13.1 ความหมายและประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ โดยจุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์กำลังเจริญ เซลล์ระยะพักหรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Chibata *et. al.* 1978)

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้มีการศึกษามานานแล้ว โดยในปี ค.ศ. 1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็ว ด้วยฟิล์มเชื้อที่ติดบนเศษไม้เล็กๆ หลังจากนั้นไม่มีใครสนใจ จนกระทั่งประมาณปี ค.ศ. 1971 ได้มีการสนใจอย่างจริงจังอีกครั้งหนึ่ง จนสามารถนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น การกำจัดน้ำเสียแบบ activated sludge และ trickling filter นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการกำจัดแร่ที่มีคุณภาพต่ำในเหมืองแร่ (Abbott. 1977)

Chibata และ Tosa ได้ประสบความสำเร็จในการผลิต กรดแอล-แอสปาร์ติกแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เซลล์ *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงด้วยสารโพลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide) ในปี ค.ศ. 1973 นับเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึง (Chibate and Tosa. 1977)

2.13.2 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของระบบที่ถูกตรึงกับวิธีอื่น ๆ

เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญและมีข้อได้เปรียบหลายอย่างเมื่อเทียบกับตัวเร่งหรือวิธีอื่น ๆ คือ (Cheetham. 1980)

1) การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะปกติและใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย ข้อเสีย คือต้องการ โคลแฟคเตอร์ต่าง ๆ ในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2) การเปรียบเทียบกับหมัก เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถควบคุมปฏิกิริยาได้ง่ายและสะดวก ไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น สามารถแยกผลผลิตออกได้ง่าย มีความคงทนสูงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก

3) การเปรียบเทียบกับเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงสามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆ ศึกษาในถังปฏิกริยาขนาดเล็กได้ แต่อาจจะเสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้

4) การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าในกรณีที่ขบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคลแฟคเตอร์และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้ขบวนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น และเป็นการลดค่าใช้จ่ายด้วย แต่ก็มีข้อเสียคือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมาที่ยังผลผลิตได้ และการจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสับสเตรทและผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์

2.13.3 การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นคุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีข้อแตกต่างไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ คุณสมบัติทางกลไก คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมีและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ความชอบน้ำ ความซึมซาบ ราคาและการยอมรับ

สำหรับการคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการห่อหุ้มนั้น ได้สรุปหลักในการพิจารณาไว้ดังนี้ คือ

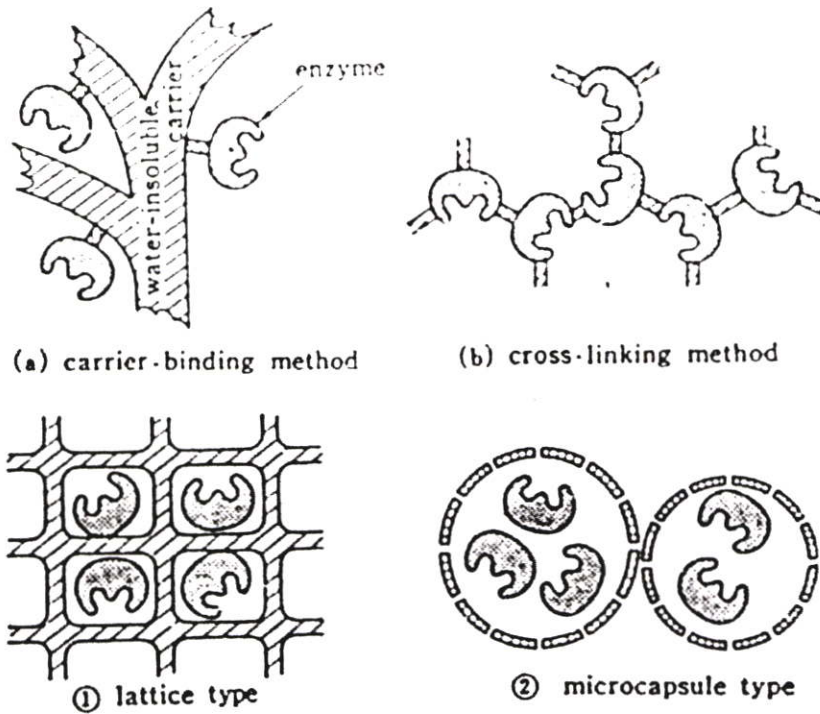
- 1) คุณสมบัติในการละลาย ควรจะทำการละลาย และผสมเซลล์ให้เข้ากับสารละลายของสารโพลีเมอร์ได้ง่าย และสารผสมที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลว
- 2) คุณสมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเจลด้วยวิธีง่ายๆ ภายใต้สภาวะปกติและไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของเอนไซม์หรือเซลล์จุลินทรีย์
- 3) คุณสมบัติของเจล เจลที่ได้ควรจะมีความแข็งแรงและความคงตัวสูง ขนาดของรูที่อยู่ภายในเจล ควรจะเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ แต่สัณฐานและผลผลิตที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ

2.13.4 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

- 1) ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิต เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแตกต่างจากเซลล์อิสระ เนื่องจากสารตัวนำเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารและผลผลิต ในกรณีองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงมีโมเลกุลสูง (Chibata *et. al.* 1978)
- 2) ความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเปลี่ยนแปลงไปทางด้านความเป็นกรดค่า หรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย
- 3) อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงมักมีความคงทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงมักมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ
- 4) ความคงตัว เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนในการใช้งานได้สูงกว่าเซลล์อิสระ คือสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสามารถทนต่อสารเคมี การเสื่อมสภาพทางฟิสิกส์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Cheetham *et. al.* 1979)

2.13.5 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์มีวิธีคล้ายกับวิธีการตรึงเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 3 วิธี แสดงดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 รูปแบบการตรึงเอนไซม์ (Chibata *et. al.* 1978)

2.13.5.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding) วิธีนี้ยังแบ่งออกเป็น 2 วิธีย่อยคือ

1) การดูดซับ (adsorption) หมายถึง การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำไม่ละลายน้ำด้วยแรงอิออนิก หรือแรงดูดซับอย่างอ่อน ๆ ตัวนำที่ใช้มีทั้งสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ เช่น สารแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange resin) ดีอีเอดี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) โคเว็กซ์-1 (Dowex-1) โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) โพลีโพรพิลีน (polypropylene) เยื่อไม้ (wood pulp) แอคติเวทิกคาร์บอน (activated carbon) ลูกแก้วรูพรุน (porous glass) เป็นต้น การตรึงด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ วิธีการตรึงทำได้ง่าย เซลล์จุลินทรีย์เจริญแบ่งตัวบนสารตัวนำได้ แต่มีข้อเสีย คือ แรงยึดระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับสารตัวนำไม่แข็งแรง เซลล์หลุดออกปะปนกับผลิตภัณฑ์ได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของอิออน และอัตราการไหล (Cheetham, 1980)

2) การยึดด้วยแรงโควาเลนต์ (covalent coupling) เป็นวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์กับสารตัวนำที่ถูกร่ง โดยวิธีการแชร์ประจุระหว่างสารตัวนำกลุ่มต่าง ๆ เช่น กลุ่มอะมิโน ซัลฟาไฮดริล คาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล อิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีนบนผิวเซลล์ (Cheetham, 1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ แรงยึดเหนี่ยวกับสารตัวนำแข็งแรง แต่เป็นวิธีที่ไม่ค่อยนิยมเนื่องจากสารตัวนำที่ใช้ยึดส่วนใหญ่เป็นสารพิษ (Koshcheenko, 1981)

2.13.5.2 การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking) เป็นวิธีการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมี เช่น กลูทาร์รัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) โทลูอีน (toluene) ไดไอโซไซยาเนท (diisocyanate) การตรึงด้วยวิธีนี้แรงยึดระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับสารตัวเชื่อมแข็งแรง แต่วิธีการตรึงเซลล์มีความรุนแรงทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรมง่าย

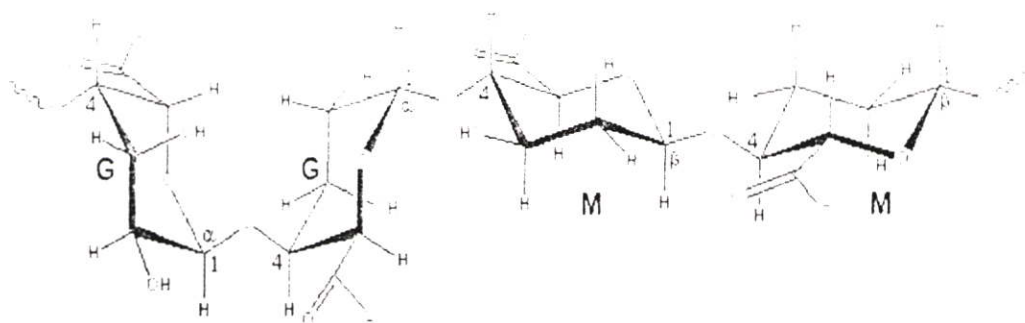
2.13.5.3 การห่อหุ้ม (entrapping) วิธีนี้แบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือ

1) การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (microcapsule) หมายถึงการห่อหุ้มเซลล์ด้วยโพลีเมอร์เยื่อบางกึ่งซาชิมได้ เช่น คอลลอยเดียน (collodian) หรือ ซิลิโคน (silicone) สารอาหารและผลผลิตสามารถซึมผ่านได้อย่างอิสระ แต่มีข้อเสียคือเซลล์ที่ถูกตรึงในแคปซูลมีความเปราะไม่เหมาะนำมาใช้ในการอุตสาหกรรม ส่วนมากนำมาใช้ในการผลิตยารักษาโรค และงานวิเคราะห์ทั่วไป (Cheetham, 1980)

2) การห่อหุ้มแบบร่างแห (lattice) คือ การห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ด้วยสารโพลีเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (matrix) วิธีนี้นิยมใช้กันมากที่สุด สารที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ได้แก่ คอลลาเจน (collagen) เซลลูโลส (cellulose) วุ้น (agar) คาร์ราจีแนน (carrageenan) เจลาติน (gelatin) แอลจีเนท (alginate) โพลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide) โพลีสไตรีน (polystyrene) และสารโพลีเมอร์อื่นๆ (Chibata *et. al.* 1978)

2.13.6 คุณสมบัติของแอลจีเนทและการใช้ประโยชน์

กรดแอลจินิก เป็นสารที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล (Chaplin, 2003) หรือผลิตจาก *Ascophyllum* และ kelp มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นโพลีเมอร์ร่วมของ D-mannuronic acid และ L-guluronic acid แสดงคังภาพที่ 2.12 กรดแอลจินิกไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายต่าง ๆ (โลหะไฮดรอกไซด์ หรือ คาร์บอเนท) เกิดเป็นเกลือแอลจีเนท ทำให้สารละลายมีลักษณะเหนียว อีออนของโลหะพวกโพสิวาเลนซ์ เช่น แคลเซียมอีออน อะลูมิเนียมอีออน เมื่อทำปฏิกิริยากับแอลจีเนททำให้เกิดผลิตภัณฑ์ไม่ละลายน้ำมีลักษณะเป็นเจลแข็งหรือแผ่นฟิล์ม (Cheetham *et. al.* 1979)



ภาพที่ 2.12 แสดงโครงสร้างแอลจินเท (Chaplin. 2003)

คุณสมบัติความแข็งของแอลจินเท เกี่ยวข้องกับปริมาณและการกระจายตัวของกรดแมนนูโรนิก และกรดกลูคูโรนิก แอลจินเทที่ประกอบด้วยโพลีเมอร์ของกลูคูโรนิกในปริมาณสูง จะมีความแข็งของเจล (gel strength) สูง นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารละลายออลอนที่ใช้ในการเกิดเจลมีผลต่อความแข็งของเจลด้วย (Cheetham *et. al.* 1979) ในการตรีงเซลล์ โดยวิธีห่อหุ้มเซลล์ด้วยแอลจินเท เซลล์จะแทรกอยู่ในช่องว่างของเจล โดยที่เจลมีรูพรุนขนาดใหญ่อยู่มากมาย สัตตเรทและผลผลิตสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ แต่สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 5,000 จะมีอุปสรรคในการส่งผ่านเข้าออกภายในเจลเล็กน้อย (Kierstan and Bucke. 1977) ข้อดีของการตรีงเซลล์ด้วยแอลจินเท คือวิธีการตรีงทำได้ง่าย โดยนำเซลล์มาผสมกับสารละลายโซเดียมแอลจินเทแล้วผ่านลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เจลจะเกิดขึ้นทันที เจลที่ได้ควรแช่ในสารละลายเกลือคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เจลมีความแข็งคงทนมากขึ้น เจลที่ได้จะสามารถทนต่อแรงคั้นในคอลัมน์ได้ดี ขนาดของเม็ดเจลไม่มีผลต่ออัตราการไหลของสารละลาย (chelating agent) เช่น ฟอสเฟต อิติทีเอ เป็นต้น และสามารถถูกแทนที่ด้วยประจุบวกอื่นๆ เช่น Mg^{++} , K^+ , Na^+ ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาตรวจนับการเจริญของเซลล์ในเจลได้ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ถูกตรีงด้วยแคลเซียมแอลจินเทมีการแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล และอาจหลุดร่วออกนอกเจลได้ (Kierstan and Bucke. 1977 ; Cheetham *et. al.* 1979) สำหรับการแก้ไขปัญหาคาละลายของเจลเมื่อมีสารดีเลทคิงนั้น ทำได้โดยใช้สตรอนเซียมหรือแบเรียม แทนแคลเซียม จะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวมากกว่า (Paul and Vignais. 1980) แต่ไม่เป็นที่ยอมรับในกรณีที่ผลผลิตที่ได้เกี่ยวข้องกับการใช้ในอาหาร

ปกติแอลจินเนทจะถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทำให้สารละลายข้นและคงตัว ปัจจุบันใช้เป็นสารตัวนำในการตรึงเอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ คลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย (Kierstan and Bucke. 1977) และเนื้อเยื่อพืช (Brodellius *et. al.* 1979) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วยแอลจินแทนนิยมใช้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์กันมาก เช่น การย่อยสลายฟีนอล การผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ สเตอรอยด์ เป็นต้น และยังสามารถใช้สำหรับการจัดแต่งทรงผม ใช้ทำเหยื่อปลอม เช่น ปลา และหอย ช่วยในการย้อมสีเส้นใย และยังใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ดูแลรักษาบำรุง เช่น แชมพู เครื่องสำอาง สบู่เจล (Mitchell. 1998) แสดงดังภาพที่ 2.13

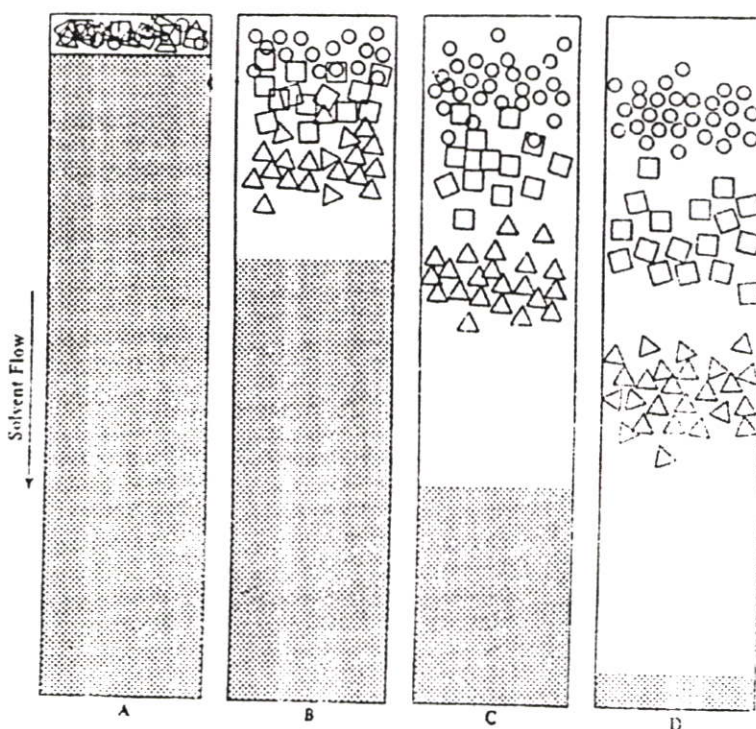


ภาพที่ 2.13 แสดงผลิตภัณฑ์แอลจินเนท

2.14 การวิเคราะห์วิตามินบี 12 ด้วยเทคนิค HPLC

2.14.1 หลักการพื้นฐานของ Liquid Chromatography (LC)

เป็นการพิจารณาถึงการแยกสารละลายผสม ที่ประกอบด้วยสารหลายชนิดด้วยกัน ในคอลัมน์ปิด (closed column) ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคของแข็งขนาดเล็กๆ ที่มีรูพรุนเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอน ในหลอดยาวเล็กๆ เรียกว่า คอลัมน์



ภาพที่ 2.14 แสดงการแยกของผสมของสาร 3 ชนิด สมมติให้สาร A เป็น \triangle , สาร B เป็น \square , สาร C เป็น \circ พื้นที่ที่เป็นจุดๆ แสดงถึงตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะล้าง (เม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534)

จากภาพที่ 2.14 แสดงให้เห็นถึงกระบวนการทางโครมาโทกราฟี โดยสารละลายตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าไปในส่วนบนของคอลัมน์ เฟสเคลื่อนที่จะทำหน้าที่พาสารผ่านไปยังคอลัมน์ สารประกอบแต่ละตัวจะถูกดูดซับและถูกทำให้หลุดออกไปจากการดูดซับ บนอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ผลที่ตามมา คือสารประกอบจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้าลง และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับสัมพรรคภาพ (affinity) ของสารกับอนุภาคที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ สารประกอบ X มีการกระจายอยู่ระหว่างเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อมันผ่านไปตามคอลัมน์ ดังสมการ

X_m (mobile phase)X_s (stationary phase)

ค่า K_s (distribution coefficient) สำหรับสารประกอบที่สอดคล้องกับสมการข้างบน คือ

$$K_s = [X]_s / [X]_m$$

ถ้าค่า K_s มีค่ามาก แสดงว่าสารประกอบชอบละลายในเฟสคงที่มากกว่าเฟสเคลื่อนที่ ดังนั้นสารประกอบดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปตามคอลัมน์ได้ช้า ถ้าค่า K_s มีค่าน้อย สารประกอบนี้ก็จะชอบละลายในเฟสเคลื่อนที่ได้ดีกว่าเฟสคงที่ และจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้อย่างรวดเร็ว

ดังนั้นแต่ละองค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจึงมีค่า retention time (t_r) ที่แตกต่างกัน คือ เวลาระหว่างการฉีดสารตัวอย่าง กับการเกิดพีคที่เครื่องตรวจวัด (Skoog, 1996) ซึ่งกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัญญาณกับเวลาเราเรียกว่า โครมาโทแกรม แสดงดังภาพที่ 2.15 ค่า retention time ของสารแต่ละชนิดจะเป็นค่าคงที่ในสภาวะการทดลองหนึ่งๆ เท่านั้น

การแยกสารจะดีเพียงใดขึ้นกับประสิทธิภาพของคอลัมน์ซึ่งแสดงด้วยค่า theoretical plate, N ดังสมการ

$$\begin{aligned} N &= 16 (t_r / W_b)^2 \\ &= 5.54 (t_r / W_{b/2})^2 \end{aligned}$$

เมื่อ N = จำนวน theoretical plate

W_b = ความกว้างของพีคที่วัดตรง base line

t_r = retention time ของสาร

W_{b/2} = ความกว้างของพีคที่ครึ่งหนึ่งของความสูง

ประสิทธิภาพของคอลัมน์ยังสามารถแสดงได้ด้วยค่า Height Equivalent of a Theoretical Plate, H ซึ่งสัมพันธ์กับค่า N ดังนี้

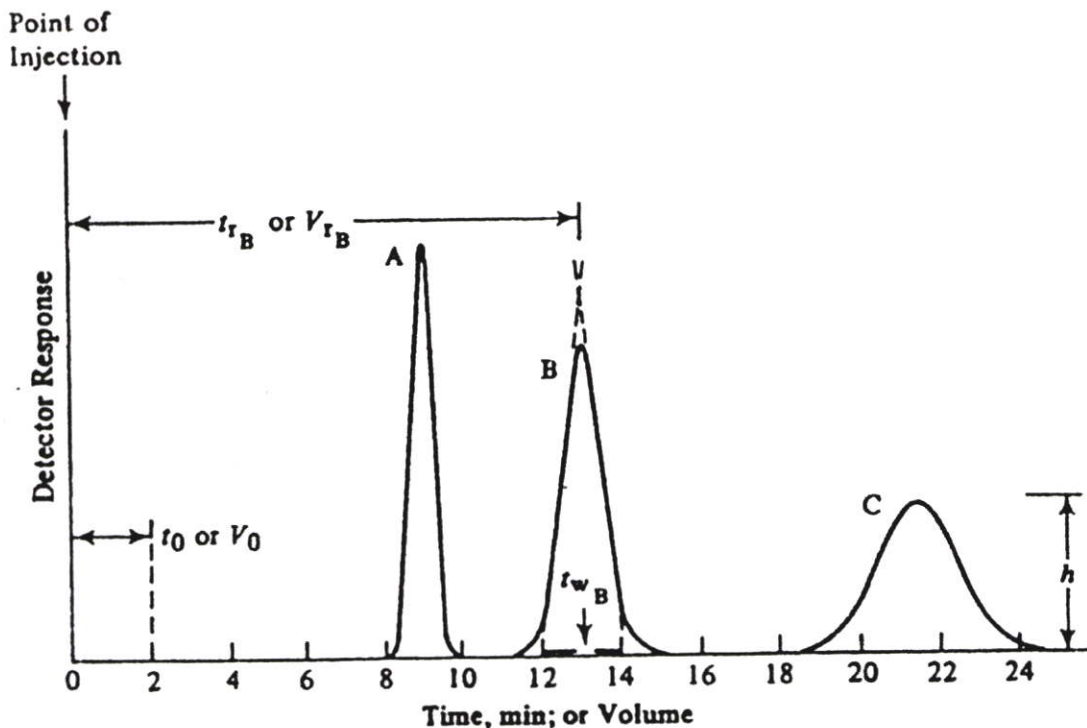
$$H = L / N$$

Resolution, R_s เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถในการแยกพีค 2 พีคออกจากกัน ดังสมการ

$$R_s = 2 \Delta t_r / (W_1 + W_2)$$

เมื่อ Δt_r = ความแตกต่างของ t_{r1} และ t_{r2}
 W_1, W_2 = ความกว้างของพีกที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ถ้าค่า R_s มีค่าเกิน 1.5 แสดงว่าพีก 2 พีกแยกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ ถ้า R_s ต่ำกว่า 0.8 ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ปริมาณได้

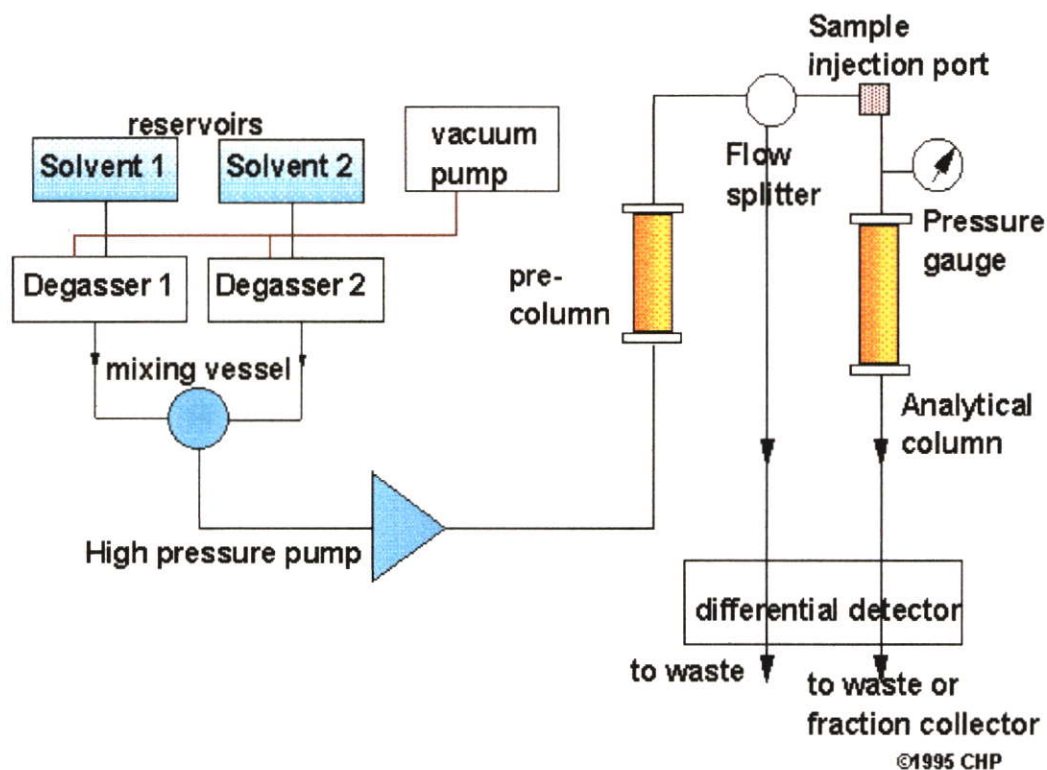


ภาพที่ 2.15 แสดงโครมาโทแกรมของการแยกสาร 3 ชนิด จากภาพที่ 2.14 (แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534)

2.14.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ลิควิดโครมาโทกราฟีในช่วงแรกๆ จะใช้อุณหภูมิที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ ซึ่งบรรจุในคอลัมน์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 5 ซม. ความดันที่ทำให้ตัวทำละลายไหลผ่านระหว่างอนุภาคจะน้อยมาก ทำให้เวลาที่ใช้ในการแยกจะนานมาก เพราะอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่ช้ามาก ต่อมาจึงได้มีการเพิ่มประสิทธิภาพในการแยก โดยการลดขนาดของอนุภาคที่บรรจุในคอลัมน์ และใช้พวก high pressure pump ช่วยให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้เร็ว ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของ HPLC ทำให้ประสิทธิภาพของคอลัมน์เพิ่มขึ้นและเวลาที่ใช้ในการแยกสั้นลง (David. 2000)

2.14.3 องค์ประกอบของเครื่อง HPLC



ภาพที่ 2.16 แสดงส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

2.14.3.1 ภาชนะที่บรรจุเฟสเคลื่อนที่ (reservoirs)

เป็นขวดสำหรับใส่ตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในปัจจุบันขวดที่ใส่เฟสเคลื่อนที่นี้จะมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการไล่อากาศที่ละลายอยู่ เช่น แก๊สออกซิเจน จุดประสงค์ของการไล่อากาศที่ละลายอยู่ในเฟสเคลื่อนที่ก็คือ ต้องการกำจัดแก๊สออกซิเจนซึ่งอาจจะทำปฏิกิริยากับเฟสเคลื่อนที่บางชนิดได้ หรือแม้แต่กับเฟสคงที่ที่อยู่ในคอลัมน์ นอกจากนี้ยังเป็น การลดโอกาสที่จะทำให้เกิดฟองอากาศในเครื่องตรวจหาขณะทำการทดลองอยู่ (Settle, 1997)

2.14.3.2 ระบบของปั๊ม แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1) Mechanical pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่ ปั๊มประเภทนี้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ Syringe pump เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นกระบอกสูบ และ Reciprocating pump เป็นปั๊มที่มีลักษณะเป็นแบบชักลูกสูบ

2) Pneumatic pump เป็นปั๊มที่ควบคุมให้ความดันของการไหลของเฟสเคลื่อนที่มีค่าคงที่ (Skoog, 1996)

หลักการเลือกระบบปั๊ม

- ระบบปั๊มและส่วนประกอบของปั๊ม ต้องทำจากวัสดุที่ทนต่อการสึกกร่อนด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ และสะดวกต่อการบำรุงรักษา
- ปั๊มเฟสเคลื่อนที่ในปริมาณมากๆ ได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการขัดข้อง
- สามารถให้ความดันได้ถึง 4,000 – 6,000 psi เพื่อปั๊มผ่านคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยอนุภาคขนาดเล็กได้ อย่างน้อยต้องให้ความดันถึง 500 psi
- สามารถให้อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ได้สูงถึง 3 มิลลิเมตรต่อนาที เป็นอย่างน้อยและคงที่
- ความคลาดเคลื่อนของการควบคุมการไหลของเฟสเคลื่อนที่ ต้องไม่เกิน 1 – 2 เปอร์เซ็นต์
- ระบบปั๊มควรมีปริมาณภายในต่ำ เพื่อความสะดวกรวดเร็วในการเปลี่ยนเฟสเคลื่อนที่

2.14.3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจวัดความดัน

อยู่ระหว่างทางเข้าของคอลัมน์กับปั๊ม อุปกรณ์ตรวจวัดนี้จะบอกความดันของเฟสเคลื่อนที่ก่อนเข้าสู่คอลัมน์ ความดันนี้จะ เป็นสิ่งที่บอกว่ามีการอุดตันหรือไม่ หรือการทำงานของปั๊มล้มเหลวหรือไม่ ปัจจุบันมีอยู่ 2 ชนิด คือ (แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534)

1) Pressure transducer หรือ strain guage อุปกรณ์ชนิดนี้ราคาค่อนข้างแพง แต่ให้ความถูกต้องดี และสามารถติดตั้งร่วมกับอุปกรณ์ที่ใช้เตือนเมื่อความดันต่ำเกินไปหรือสูงเกินไป หรือติดตั้งร่วมกับเครื่องตัดการทำงานปั๊ม

2) Bourdon tube หรือ diaphragm guage อุปกรณ์นี้ราคาค่อนข้างถูก การทำงานก็ให้ความถูกต้องต่ำและไม่สามารถติดตั้งร่วมกับอุปกรณ์ที่ใช้ป้องกันการทำงานผิดปกติของปั๊มได้

2.14.3.4 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับทำ Gradient Elution

1) แบบ low pressure gradient เป็นแบบที่ใช้วิธีการผสมตัวทำละลายที่ความดันของบรรยากาศ จากนั้นจะถูกปั๊มต่อไปด้วยความดันสูงเข้าสู่คอลัมน์

2) แบบ high pressure gradient เป็นแบบที่ตัวทำละลายที่ใช้ใน gradient elution จะถูกปั๊มผ่าน high pressure pump เข้าสู่ low volume mixing chamber ก่อนเข้าสู่คอลัมน์

2.14.3.5 Sample injection port

Sample injection port ที่ใช้ในปัจจุบันสามารถใช้ได้กับสารตัวอย่างที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5 ไมโครลิตร จนกระทั่งถึงหลายมิลลิลิตร นอกจากนั้น valve ประเภทนี้ยังสามารถใช้งานได้ที่ความดันสูงถึง 5,000 – 6,000 psi โดยที่ไม่เกิดการรั่วไหล สารตัวอย่างที่ผ่านเข้าไปจะอยู่ในท่อซึ่งอยู่ภายนอกที่ต่อเข้ากับ valve นี้ (Skoog, 1996)

2.14.3.6 เครื่องตรวจวัด (Detector)

เครื่องตรวจวัดแบ่งได้เป็น 2 ชนิด (Settle, 1997)

1) Solute property และ Bulk property ซึ่ง solute property หรือ selective detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของตัวถูกละลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น

- UV – VIS Detector หลักการ คือ อาศัยการดูดกลืนแสงยูวีของสารตัวอย่าง นิยมใช้กันมากใน HPLC เพราะเครื่องตรวจวัดนี้มีลักษณะที่พิเศษ คือ ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราของการไหล และ อุณหภูมิ แต่ค่อนข้างจะมีความไวสูงกับสารประกอบอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่

- Fluorescent Detector มีสภาพความไวสูง และมีความเฉพาะ เนื่องจากมันมีความสามารถในการวัดฟลูออเรสเซนซ์ ที่ได้ออกมาจากตัวถูกละลายบางชนิดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงยูวีจากแหล่งกำเนิด โดยผ่านเครื่องกรองแสง หรือโมโนโครเมเตอร์ เพื่อให้แสงที่มีความยาวคลื่นตามที่ต้องการผ่านเข้าไปยัง flow cell ที่ใส่สารตัวอย่างซึ่งออกมาจากคอลัมน์ สารตัวอย่างจะให้ฟลูออเรสเซนซ์ออกมาที่มีความยาวคลื่นเฉพาะและผ่านไปยังฟิลเตอร์ หรือโมโนโครเมเตอร์เพื่อตัดแสงที่ไม่ต้องการออก จากนั้นแสงจึงผ่านเข้าไปยัง ดีเทคเตอร์ ซึ่งเป็นโฟโตเซลล์

2) Bulk property หรือ general detectors เป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงของสมบัติทางกายภาพของเฟสเคลื่อนที่รวมทั้งของตัวถูกละลาย

- เครื่องดิฟเฟอเรนเชียล รีแฟร็กโตมิเตอร์ (Differential refractometers) ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดัชนีหักเห (refractive index, RI) อย่างต่อเนื่องระหว่างเฟสเคลื่อนที่ที่มีสารประกอบของตัวถูกละลายอยู่ขณะผ่านออกจากคอลัมน์ ให้สัญญาณกับตัวทำลายได้ทั้งหมด คราบที่ตัวถูกละลายมีค่าดัชนีหักเหต่างจากเฟสเคลื่อนที่

- เครื่อง Conductivity Detector เป็นเครื่องที่ใช้ในการตรวจหาตัวถูกละลายที่มีประจุในเฟสเคลื่อนที่ที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ โดยที่ ดีเทคเตอร์นี้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก เฟสเคลื่อนที่ที่ออกมาจากคอลัมน์เข้าสู่ conductivity cell เพื่อวัดค่า specific conductivity อย่างต่อเนื่อง จะให้ conductivity ที่เป็นเส้นตรงในช่วงของความเข้มข้นที่กว้าง ดีเทคเตอร์นี้ไม่เหมาะในระบบ gradient elution เนื่องจากเฟสเคลื่อนที่ในระบบ gradient ทำให้ baseline เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ทำให้มีข้อจำกัดอยู่บ้าง

เครื่องตรวจวัดควรมีลักษณะดังต่อไปนี้ คือ

- มีความไวสูง และให้สัญญาณตอบรับที่คาดคะเนได้
- ให้สัญญาณตอบรับได้กับสารทุกชนิด
- ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และอัตราเร็วของการไหลของเฟสเคลื่อนที่
- เชื้อถือได้และง่ายต่อการใช้งาน
- ความสัมพันธ์ของความเข้มข้น และ สัญญาณตอบรับของเครื่องตรวจวัด ควรมี

สภาพเชิงเส้น (linearity) ในช่วงกว้าง

- ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
- ให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์สำหรับพิก ที่ต้องการตรวจสอบ

2.14.4 เทคนิค HPLC

1) โครมาโทกราฟีแบบดูดซับ (Adsorption chromatography)

โครมาโทกราฟีแบบนี้เรียกว่า liquid – solid chromatography (LSC) เฟสดูดซับเป็นของแข็งที่มีขั้ว เช่น ซิลิกา หรือ อะลูมินา และเฟสเคลื่อนที่เป็นของเหลวที่เรียกว่า eluent หลักการสำคัญในการแยกของผสมคือ องค์กรประกอบที่สามารถยึดติดกับเฟสหนึ่งที่ตั้งาแหน่งที่ว่างไว (active site) ได้น้อยกว่าแต่ละลายได้ดีในเฟสเคลื่อนที่จะถูกแยกออกมาก่อนองค์กรประกอบที่ยึดติดกับเฟสหนึ่งได้ดี ดังนั้นองค์กรประกอบที่มีขั้วสูงกว่า (more polar) จะยึดติดกับเฟสหนึ่งได้ดีกว่า องค์กรประกอบที่มีขั้วน้อยกว่า (Settle. 1997)

2) โครมาโทกราฟีแบบกระจาย (Partition chromatography)

โครมาโทกราฟีแบบนี้เรียกว่า liquid – liquid chromatography (LLC) ซึ่งมีเฟสหนึ่งเป็นของเหลวที่เคลือบหรือเกิดพันธะ (bonded phase) กับอนุภาคของแข็ง และไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ที่เป็นของเหลว หลักการแยกอาศัยการกระจายตัวหรือการละลายได้ขององค์กรประกอบในของผสมระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสหนึ่ง องค์กรประกอบที่กระจายตัวได้ดีในเฟสหนึ่ง จะถูกยับยั้งไว้ในคอลัมน์ได้นานกว่าองค์กรประกอบที่กระจายตัวในเฟสหนึ่งได้น้อยกว่า ถ้าเฟสหนึ่งมีขั้วสูงกว่าเฟสเคลื่อนที่ เราเรียกโครมาโทกราฟีชนิดนี้ว่า normal phase chromatography องค์กรประกอบที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยจะกระจายตัวได้ดีในเฟสเคลื่อนที่มากกว่า ดังนั้นจึงถูกพาออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า องค์กรประกอบที่มีขั้วสูงกว่า แต่ถ้าเฟสหนึ่งมีขั้วต่ำกว่าเฟสเคลื่อนที่ เราเรียกโครมาโทกราฟีชนิดนี้ว่า reverse phase chromatography เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ได้แก่ น้ำ เมทานอล อะซิโตไนไตรล์ เป็นต้น (Settle. 1997)

reverse phase chromatography ชนิดที่เป็น bonded phase เช่น C_8 และ C_{18} เป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่เกิดพันธะกับหมู่ไฮดรอกซิลของซิลิกา เราจึงเรียกคอลัมน์ชนิดนี้ว่า คอลัมน์ C_8 และ C_{18} ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางกว่าคอลัมน์ที่มีเฟสนิ่งที่เคลือบด้วยของเหลวและยังสามารถเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ราคาถูกลงได้ ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย โครมาโทกราฟีชนิดนี้ใช้แยก แอลกอฮอล์ อะโรมาติก อัลคาลอยด์ แอนติไบโอติก สารสเตียรอยด์ ยาฆ่าแมลง และวิตามิน (David. 2000)

3) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (Ion Exchange chromatography)

อาศัยหลักการกระจายตัวของไอออน ระหว่างเฟสเคลื่อนที่และเฟสนิ่งที่แลกเปลี่ยนไอออนได้แตกต่างกัน โดยทั่วไปจะใช้เรซินที่ทำจากสไตรีนไดไวนิลเบนซีน ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์แบบโครงข่ายที่มีหมู่ที่สามารถแลกเปลี่ยนไอออนได้เกาะอยู่บนเรซิน ไอออนบวกจะถูกแยกด้วย เรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนไอออนบวก (cation exchanger) ซึ่งจะมีหมู่ SO_3^- หรือ COO^- ส่วนไอออนลบจะถูกแยกด้วยเรซินที่ใช้แลกเปลี่ยนไอออนลบ (anion exchanger) ซึ่งจะมีหมู่ $-N^+Me_2CH_2$ หรือ หมู่ $-CH_2N^+HMe_2$ เกาะอยู่ ไอออนที่มีขนาดและประจุที่แตกต่างกันจะถูกแยกออกจากคอลัมน์ในเวลาที่แตกต่างกัน (Settle. 1997)

4) Size Exclusion chromatography

แยกสารโดยอาศัยขนาดจำเพาะ บางครั้งเรียกว่า gel permeation chromatography หลักการที่ว่องค้ประกอบต่างๆ จะซึมผ่านรูพรุนของวัสดุที่ใช้บรรจุคอลัมน์ได้มากน้อยต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลชนิดนั้น ทำให้ถูกชะออกมาในเวลาต่างกัน และเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลขนาดเล็กออกจากโมเลกุลขนาดใหญ่ (David. 2000)

2.14.5 การประยุกต์ใช้งานของเทคนิค HPLC

2.14.5.1 การทำวิเคราะห์คุณภาพ (Qualitative Analysis)

โดยทั่วไปจะใช้วิธีเทียบ retention time ของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานในสภาวะเดียวกัน นอกจากนี้อาจใช้วิธี spiking ซึ่งจะทำให้ทราบว่าพีกใดเป็นสารชนิดใดในตัวอย่างนั้น โดยที่ทราบชนิดสารแล้ว แต่ต้องการทราบตำแหน่งของพีก วิธีทำโดยเติมสารที่ทราบแล้วลงในสารตัวอย่าง แล้วบันทึกโครมาโทแกรม ถ้าพีกที่สงสัยสูงขึ้นหรือมีพื้นที่พีกเพิ่มขึ้น แสดงว่าสารนั้นเป็นชนิดเดียวกันกับสารที่เติมลงไป ทำให้ทราบตำแหน่งของพีกนั้นได้ (Skoog. 1996)

2.14.5.2 การทำวิเคราะห์ปริมาณ (Quantitative Analysis)

- วิธีสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve)

วิธีนี้ทำได้โดยการเตรียมสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน นำไปบันทึกโครมาโทแกรม คำนวณหาพื้นที่ที่พีก แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานที่พลอตระหว่างพื้นที่ที่พีกกับความเข้มข้น นำพื้นที่ของสารตัวอย่างไปเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของสารนั้นได้ (Skoog, 1996)

- วิธี Normalization

วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ถ้าของผสมประกอบด้วยสาร A, B, C และ D เมื่อกำหนดพื้นที่ของแต่ละองค์ประกอบได้แล้วปริมาณของสาร A คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\% A = \frac{\text{Area A}}{\text{Area A} + \text{Area B} + \text{Area C}} \times 100$$

- วิธีการเติมสารมาตรฐาน (Standard addition)

เมื่อต้องการทราบปริมาณขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างให้ บันทึกโครมาโทแกรมของสารตัวอย่างก่อน แล้วฉีดสารตัวอย่างพร้อมกับสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นต่าง ๆ กัน บันทึกโครมาโทแกรม คำนวณหาพื้นที่แล้วนำมาพลอตเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไปจะได้กราฟเส้นตรง จุดตัดบนแกนความเข้มข้นคือ ความเข้มข้นขององค์ประกอบในตัวอย่าง

- วิธี Internal standard

วิธีนี้จะเลือกสารที่เป็น Internal standard ที่ให้ retention time ใกล้เคียงกับ retention time ของตัวอย่าง โดยเติม internal standard ลงในตัวอย่างและชุดสารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันในปริมาณที่เท่ากัน นำไปบันทึกโครมาโทแกรม แล้วสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่พีกของสารมาตรฐานต่อพื้นที่พีกของ internal standard กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แล้วนำอัตราส่วนของพื้นที่พีกของตัวอย่างต่อพื้นที่พีกของ internal standard มาเทียบกับกราฟมาตรฐานก็สามารถหาความเข้มข้นของสารได้ (Skoog, 1996)

2.14.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ได้มีการนำสารประกอบวิตามินบี 12 ที่สกัดจาก Whey ที่หมักด้วย *Lactobacillus helveticus* แล้วทำ sonication และทริทด้วย proteases มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC สามารถพบสารประกอบวิตามินบี 12 ในรูป hydroxocobalamin , cyanocobalamin , adenosylcobalamin (Sato *et. al.* 1997) นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์หาชนิดของ cobalamin โดยเทคนิค HPLC พบว่าใน maternal plasma และ cord plasma จะพบ cobalamin ส่วนใหญ่ในรูป methylcobalamin และ adenosylcobalamin ส่วนในนมจะพบ cobalamin อยู่ในรูป adenosylcobalamin (Adjalla *et. al.* 1994) และยังมีการนำระบบ HPLC มาใช้เป็นเทคนิคสำหรับการวิเคราะห์ corrinoid precursor ของ cobalamin จาก *Pseudomonas denitrificans* ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงต่อ corrinoids (Blanche *et. al.* 1990) รวมทั้งมีการแยก corrinoids จาก plasma และ faeces ด้วยระบบ HPLC พบว่าใน plasma ส่วนใหญ่จะเป็น cobalamin ที่เป็น coenzymes คือ methylcobalamin และ 5'-deoxyadenosylcobalamin ส่วน cobalamin analogue จะเป็น cobinamide และ deoxyadenosylcobalamin (Djalali *et. al.* 1990)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง(Centrifuge)	รุ่น ZK 380	Hermle
2. เครื่องวัดพีเอช(pH meter)	รุ่น SA 520	Orion
3. เครื่องชั่งแบบละเอียด	รุ่น B 3100S	Sartorius
4. เครื่องเขย่าหลอดผสมสาร	รุ่น G 560E	Scientific Industries, Ing.
5. หม้อนึ่งอ็อกไอ(Autoclave)	รุ่น HA 3D	Hirayama mfg. corp.
6. ตู้บ่มเชื้อ(Incubator)	รุ่น B 60	Memmert
7. อัลตราโซนิกส์(Ultrasonics)	รุ่น 2800HT	Crest Ultrasonics Corp.
8. ตู้อบความร้อนแห้ง(Hot air oven)	รุ่น ED 53	WTC binder
9. ตู้ถ่ายเชื้อ(Larminar air flow)	รุ่น BIO 48M359	Faster
10. Liquid Chromatography	รุ่น LC10ADVP	SHIMADZU
11. UV spectrophotometric detector	รุ่น SPD 10AVP	SHIMADZU
12. เครื่อง Chromatopac	รุ่น C-R7 AC plus	SHIMADZU
13. Column Inertsil ODS-3V (150 x 4.6 mm. I.D.)		GL. Sciences Inc.
14. เครื่องดูดอากาศ(Suction pump)		GE Mortors
15. ถังหมักขนาด 2 ลิตร(Fermentor)		BIOSTAT B
16. ตู้เย็น		
17. ไมโครปิเปตต์(Micropipett)		
18. พาราฟีนฟิล์ม(Paraffin film)		
19. ฟลาสก์(Flask)		
20. บีกเกอร์(Beaker)		
21. หลอดทดลอง(Test tube)		
22. เข็มเย็บเชื้อ(Needle)		
23. กระบอกฉีดยา		
24. กรวยกรอง		
25. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1		
26. เมมเบรนขนาดรู 0.4 ไมครอน		
27. Syringe		

3.2 สารเคมี

1. acid hydrolysate of casein	Difco
2. pancreatic digest of casein	Difco
3. Sodium hydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	Mallinckrodt Co.,Ltd.
4. Potassium phosphate ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	J.T. Baker Inc.
5. Magnesium chloride ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Fluka Chemical Co.,Ltd.
6. Ferrus sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Fluka Chemical Co.,Ltd.
7. Cobalt sulphate ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Fluka Chemical Co.,Ltd.
8. Biotin	Fluka Chemical Co.,Ltd.
9. Pantothenic acid	Fluka Chemical Co.,Ltd.
10. Glucose	Merck Co.,Ltd.
11. Yeast extract	Difco
12. Riboflavin	Fluka Chemical Co.,Ltd.
13. Methionine	Fluka Chemical Co.,Ltd.
14. Glycine	Sigma Chemical Co.,Ltd.
15. Ammonium hydroxide (NH_4OH)	บ. วิทยาศาสตร์ จำกัด
16. Hydrochloric acid (HCl)	J.T. Baker Inc.
17. Sodium chloride (NaCl)	Farmitalia carlo erba
18. Alginic acid sodium salt	Sigma Chemical Co.,Ltd.
19. Calcium chloride	Merck Co.,Ltd.
20. Sodium acetate (เกรด HPLC)	BDH
21. Acetic acid (เกรด HPLC)	Merck Co.,Ltd.
22. Methanal (เกรด HPLC)	BDH
23. Acetonitrile (เกรด HPLC)	LAB-SCAN
24. Methylcobalamin	Sigma Chemical Co.,Ltd.
25. Deoxyadenosylcobalamin	Sigma Chemical Co.,Ltd.
26. Cyanocobalamin	Sigma Chemical Co.,Ltd.
27. Hydroxocobalamin	Sigma Chemical Co.,Ltd.
28. Tween 80	
29. น้ำกลั่น	

3.3 วัตถุดิบ

3.3.1 น้ำเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล จาก บริษัทพิพิธวันชัยซีฟู้ด จำกัด เลขที่ 969 ซ.เทศบาลสมมติ ถ.พิชัย ต.บ้านโจด อ.เมือง จ.ชลบุรี

- นำน้ำทิ้งมาแยกเอาตะกอนแขวนลอยออก ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 7.0 เซนติเมตร ลงในกรวยที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดอากาศ

- ใช้น้ำกลั่นฉีดกระดาษกรองให้เปียกเพื่อให้ติดแน่นกับกรวย
- เทน้ำทิ้งผ่านกระดาษกรองโดยอาศัยแรงดูดจากเครื่องดูดอากาศ
- เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาจาก (สุริย์ ทองวณิชนิยม. 2543)

Acid hydrolysate of casein	2	กรัม
Pancreatic digest of casein	3	กรัม
NaH ₂ PO ₄	1.6	กรัม
K ₃ PO ₄ ·3H ₂ O	1.6	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.4	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	มิลลิกรัม
CoSO ₄ ·7H ₂ O	12	มิลลิกรัม
Biotin	0.15	มิลลิกรัม
Pantothenic acid	2	มิลลิกรัม
Glucose	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Riboflavin	10	มิลลิกรัม
Methionine	150	มิลลิกรัม
Glycine	3	กรัม

- ส่วน Tween 80 จะใช้ค่าที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาจากข้อ 3.6.1

ปรับค่าพีเอชให้ได้ 7.0 (NH₄OH 15% หรือ HCl 15%)

- ทำการนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย

ถ่ายเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ในสภาพ Lyophilization ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปิดด้วยพาราฟิล์ม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

ใช้เข็มและเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 แล้วแทง (stab) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเตรียมกล้าเชื้อทุกๆ 2 อาทิตย์

3.5 วิธีการตรึงเซลล์ โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนท (สุริย์ ทอวงฉนิยม. 2543)

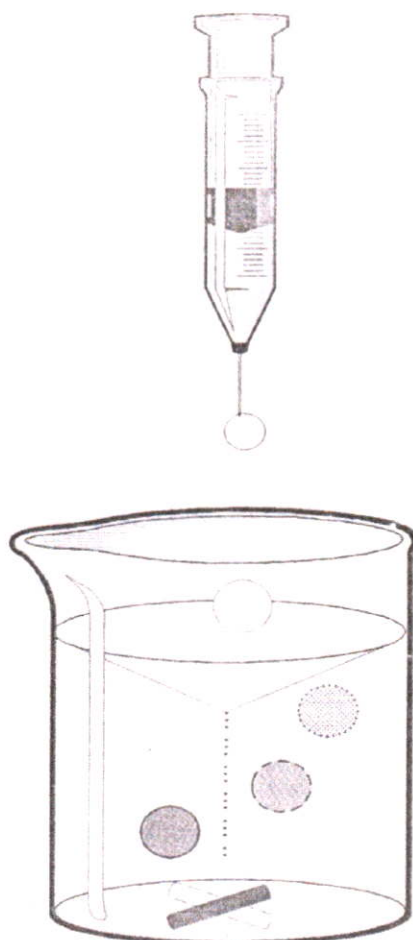
3.5.1 ใช้เข็มและเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 จาก MRS agar อายุ 2-3 วัน 1-2 needle มาใส่ใน complete medium (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน complete medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่ม เป็นเวลา 2 วัน นำไปใช้เป็นหัวเชื้อในอาหาร complete medium ปริมาตร 1.5 ลิตร ในพลาสติกขนาด 2 ลิตร บ่มเป็นเวลา 3 วัน จนได้เซลล์ปริมาณสูง จากนั้นนำไปปั่นเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.5.2 วิธีการตรึงเซลล์

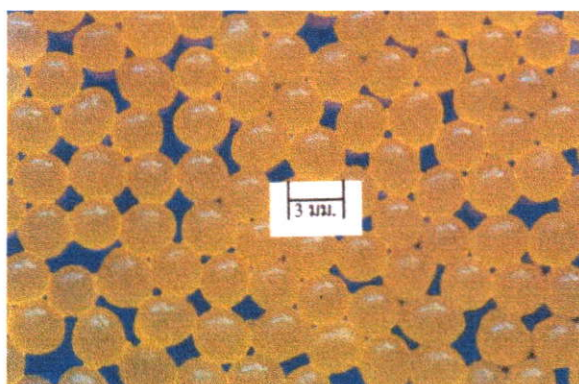
1) นำเซลล์ที่ปั่นแยกได้จำนวน 1 กรัมใส่บีกเกอร์ เติมน้ำเกลือ (sodium chloride) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมสารละลายโซเดียมแอลจิเนท ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน

2) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร คูดสารละลายผสม ฉีดผ่านรูเข็มขนาด 0.8x38 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเกลือแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เม็ดเจลจะเกิดขึ้นทันทีในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ นำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนนำไป ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการศึกษาต่อไป แสดงดังภาพที่ 3.1 และ 3.2

หมายเหตุ ทุกขั้นตอนของวิธีการตรึงเซลล์ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ



ภาพที่ 3.1 วิธีการตรึงเซลล์ โดยวิธีหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนต (Bickerstaff. 1997)



ภาพที่ 3.2 ลักษณะเม็ดเจลของเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจิเนต (สุรีย์ ทองวณิชนิม. 2543)

3.6 การศึกษาความสามารถในการผลิต และการส่งผ่านวิตามินบี 12

3.6.1 ศึกษาอิทธิพลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการส่งผ่านวิตามินบี 12 ที่ผลิตได้ภายในเซลล์สู่ภายนอก เจล โดยนำน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษากจากข้อ 3.3.1 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร (flask 250 มิลลิลิตร) ที่เติม tween 80 ในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ 0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 (สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ สารละลายกรด ไฮโดรคลอริก 15 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วเติมเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเอท จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าพีเอช และทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของวิตามินบี 12 ด้วยวิธี HPLC โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.2 การศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษากจากข้อ 3.3.1 ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

3.6.2.1 การเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

1) ใช้เซลล์อิสระ ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆกัน เลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษากจากข้อ 3.3.1 แล้วเติม Tween 80 (ปริมาณ Tween 80 ที่เหมาะสมได้จากการศึกษากจากข้อ 3.6.1) เลี้ยงในถึงหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาณ 1,400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่า 7.0 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยใบพัด 100 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศ

2) เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าพีเอช และทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของวิตามินบี 12 ด้วยวิธี HPLC โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.2.2 การเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

1) ใช้เซลล์ที่ถูกตรึง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆกัน เลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษาจากข้อ 3.3.1 แล้วเติม Tween 80 (ปริมาณ Tween 80 ที่เหมาะสมได้จากการศึกษาจากข้อ 3.6.1) เลี้ยงในถึงหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาณ 1,400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่า 7.0 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยใบพัด 100 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศ

2) เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าพีเอช และทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของวิตามินบี 12 ด้วยวิธี HPLC โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6.2.3 การเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

1) ใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึง ซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆกัน เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษาจากข้อ 3.3.1 แล้วเติม Tween 80 (ปริมาณ Tween 80 ที่เหมาะสมได้จากการศึกษาจากข้อ 3.6.1) เลี้ยงในถึงหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาณ 1,400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ค่า 7.0 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนด้วยใบพัด 100 รอบต่อนาที ไม่ต้องพ่นอากาศ

2) เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าพีเอช และทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของวิตามินบี 12 ด้วยวิธี HPLC โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

หมายเหตุ ข้อ 3.6.2.1 ถึง 3.6.2.3 ทำการทดลองพร้อมๆ กัน

3.7 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

3.7.1 การเตรียมสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐาน

เตรียม stock solution ซึ่งผลึกของสารประกอบวิตามินบี 12 คือ Methylcobalamin , Deoxyadenosylcobalamin , Cyanocobalamin และ Hydroxocobalamin อย่างละ 5 มิลลิกรัม โดยแต่ละสารประกอบวิตามินบี 12 จะละลายใน 0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จะได้สารประกอบวิตามินบี 12 ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.7.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

1) ในรูปเซลล์ที่ถูกตรึง การวิเคราะห์ในส่วนของวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ (Extracellular) จะคูดน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร ส่วนการวิเคราะห์ในส่วนของวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ (Intracellular) จะชั่งเม็ดเจลดน้ำหนัก 1 กรัม จากนั้นนำส่วนของน้ำหมัก และเม็ดเจลด มาผ่านความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการหมุนเหวี่ยง 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-20 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรนขนาดรู 0.45 ไมครอน เก็บส่วนที่กรองไว้ในขวดสีชาขนาดเล็ก ปิดฝาให้สนิท เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

2) ในรูปเซลล์อิสระ จะคูดน้ำหมักขึ้นมา 1 มิลลิลิตร ทำการหมุนเหวี่ยง 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-20 นาที เพื่อทำการแยกส่วนของ Extracellular และส่วนของ Intracellular จากนั้นนำมาผ่านความร้อนด้วยหม้อนึ่งอัดไอ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการหมุนเหวี่ยง 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15-20 นาที นำส่วนใสมากรองผ่านเมมเบรนขนาดรู 0.45 ไมครอน เก็บส่วนที่กรองไว้ในขวดสีชาขนาดเล็ก ปิดฝาให้สนิท เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

3.7.3 การไล่อากาศ

นำสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง ใส่เครื่อง ultrasonic bath เพื่อทำการไล่อากาศ เป็นเวลา 20 นาที

3.7.4 การวิเคราะห์หาชนิดของวิตามินบี 12

ใช้ syringe คูดสารละลายของสารประกอบของวิตามินบี 12 และสารละลายตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ บันทึกโครมาโทแกรม โดยเทียบ retention time ของสารละลายตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน ในสภาวะเดียวกัน ก็จะได้ชนิดของวิตามินบี 12 ของสารละลายตัวอย่าง โดยทำการฉีดครั้งละ 2 ซ้ำ

3.7.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของวิตามินบี 12

ใช้ syringe คูดสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12 และสารละลายตัวอย่างอย่างละ 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ บันทึกโครมาโทแกรม นำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12 มาพลอตกราฟระหว่าง ความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค (โดยให้แกน Y เป็นค่าพื้นที่ใต้พีค และแกน X เป็นค่าความเข้มข้น) (ภาคผนวก ข.) แล้วนำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็จะได้ค่าความเข้มข้นหรือปริมาณวิตามินบี 12 ของสารละลายตัวอย่าง โดยทำการฉีดครั้งละ 2 ซ้ำ

3.8 สภาวะการวิเคราะห์

คอลัมน์	:	Inertsil ODS-3V 5 μ m (150 x 4.6 mm. I.D.)
เฟสเคลื่อนที่	:	Acetonitrile / 0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 (10/90)
อัตราการไหล	:	1.0 มิลลิลิตร / นาที
เครื่องวัด	:	UV 265 nm.

3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

แผนการทดลอง : (Completely Randomized Design , CRD) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan ' s New Multiple Range Test โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

3.10 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

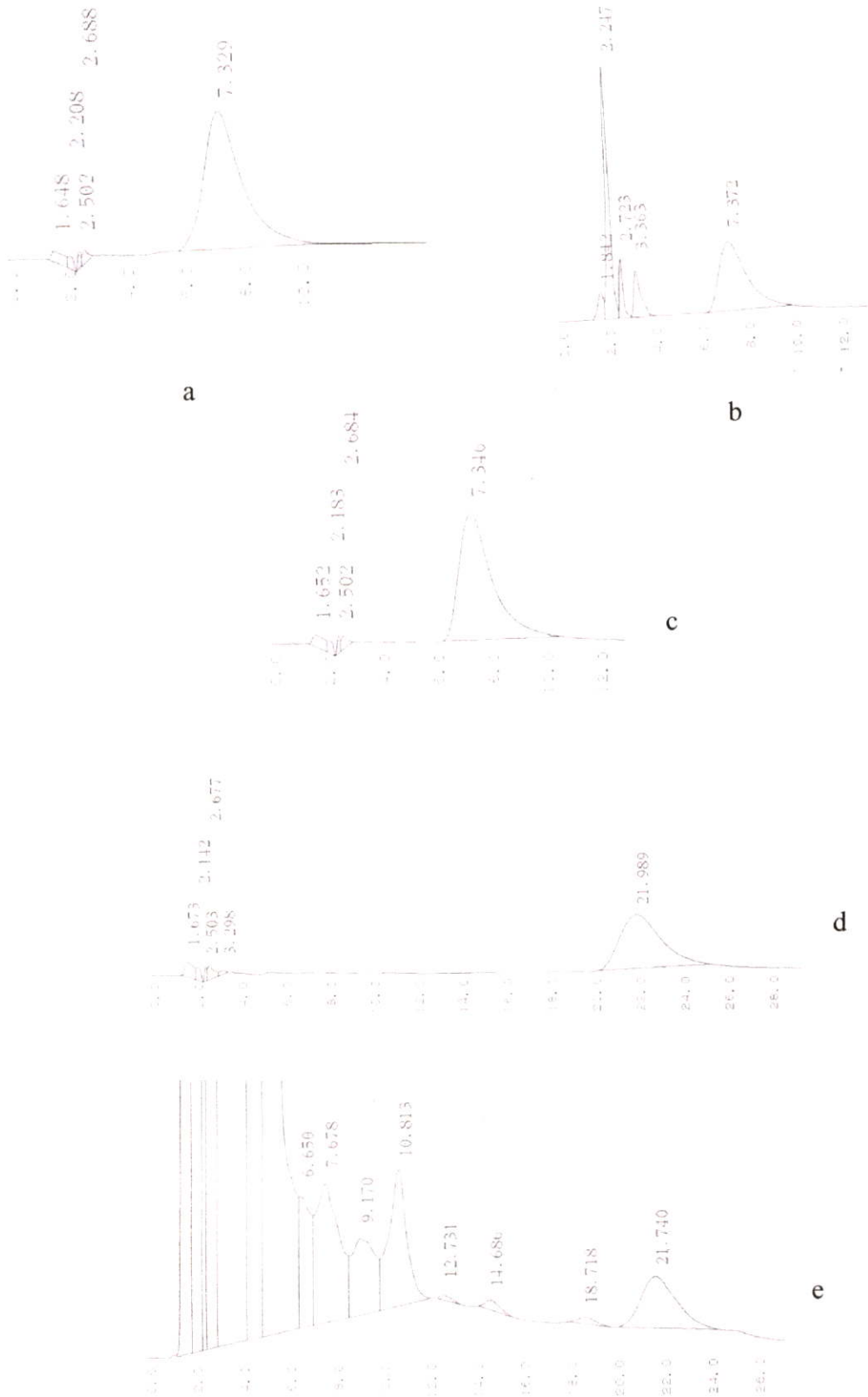
4.1 ผลการวิเคราะห์หาชนิดของวิตามินบี 12 ที่ได้จากเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ด้วยเทคนิค HPLC

ผลการวิเคราะห์ชนิดของวิตามินบี 12 ที่ได้จากเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ชนิดของวิตามินบี 12 ที่วิเคราะห์ได้อยู่ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน โดยมีค่า retention time ซึ่งใกล้เคียงกับค่า retention time ของไซยาโนโคบาลามินมาตรฐาน คือ 21.989 นาที ในสภาวะเดียวกัน แสดงดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า retention time ของสารประกอบมาตรฐานวิตามินบี 12 ต่างๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน*

สารประกอบของวิตามินบี 12	ค่าเฉลี่ย retention time (นาที)
Hydroxocobalamin	7.329
Methylcobalamin	7.346
Deoxyadenosylcobalamin	7.372
Cyanocobalamin	21.989

* ความเข้มข้นเดียวกันที่ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



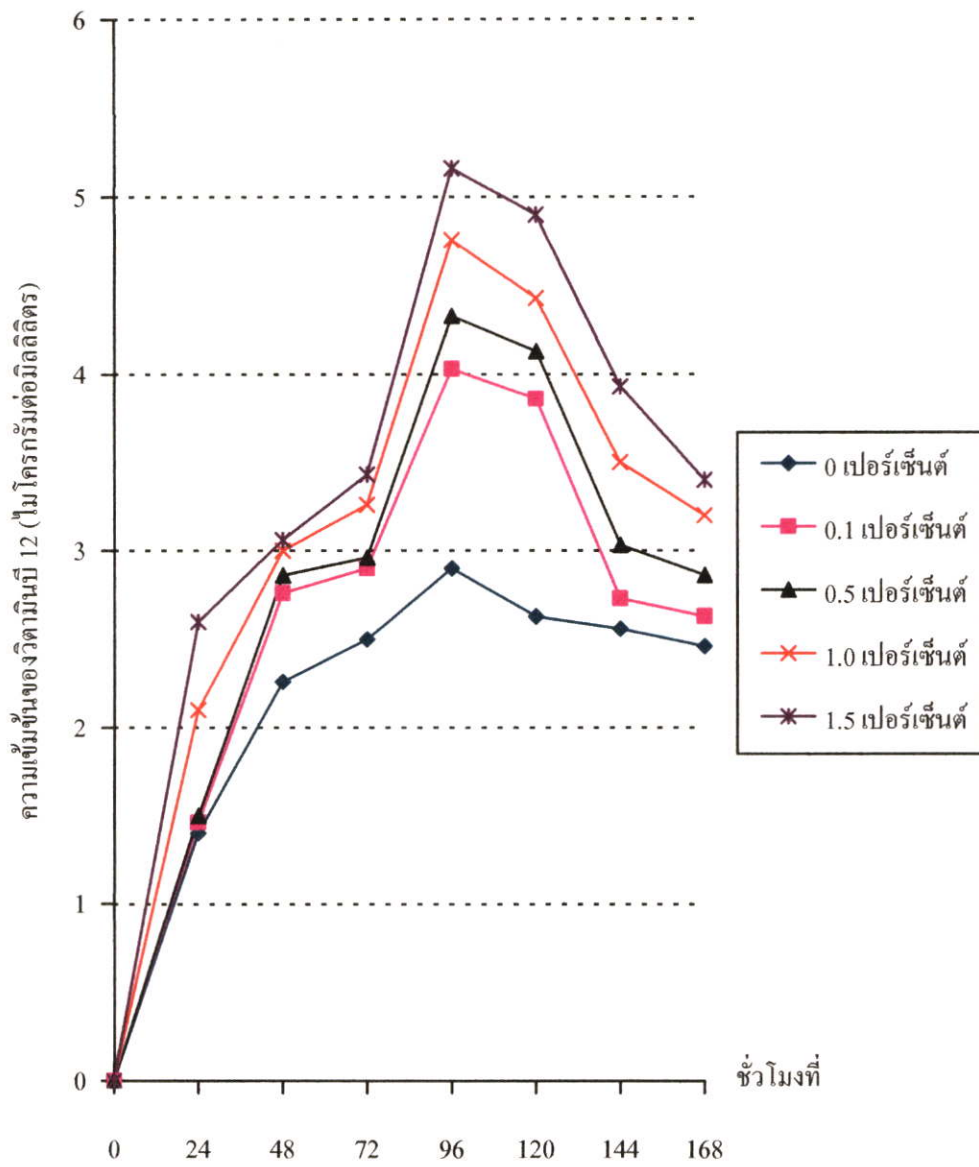
ภาพที่ 4.1 แสดงค่า retention time ของสารมาตรฐานวิตามินบี 12 ต่างๆ (a) Hydroxocobalamin , (b) Deoxyadenosylcobalamin , (c) Methylcobalamin , (d) Cyanocobalamin , (e) สารละลายตัวอย่าง

4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12

ผลการทดลอง เมื่อเติม Tween 80 ปริมาณต่างๆ คือ 0 , 0.1 , 0.5 , 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 จากการทดลองพบว่า ในชั่วโมงที่ 96 จะมีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์มากที่สุด คือ 2.90 , 4.03 , 4.33 , 4.76 และ 5.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.2

น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 แล้วเติม Tween 80 ตั้งแต่ 0.1-1.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงกว่าน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่ไม่เติม Tween 80 น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ใกล้เคียงกัน คือ 4.03 และ 4.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 96 น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 1.0-1.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงสุดคือ 4.76 และ 5.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ตามลำดับ

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่ไม่เติม Tween 80 มีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่เติม Tween 80 ตั้งแต่ 0.1-1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 1.0-1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยที่น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษามาก่อน 3.3.1 ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 1.0-1.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 แสดงกราฟความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติ ผลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12

ในชั่วโมงที่ 96	ความเข้มข้นของ Tween 80 ปริมาณต่าง ๆ (เปอร์เซ็นต์)				
	0	0.1	0.5	1.0	1.5
ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	2.900 ^c	4.033 ^b	4.333 ^b	4.766 ^a	5.166 ^a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ
ตัวอักษรไม่เหมือนกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณของ Tween 80 ที่เติมในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษาจากข้อ 3.3.1 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ใกล้เคียงกับ Tween 80 ปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพราะฉะนั้นจึงเลือก Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง เพราะใช้ปริมาณของ Tween 80 น้อยกว่า โดยมีรายงานว่า การเติม Tween 80 ปริมาณเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มการเจริญของ *Propionibacterium* spp. ได้ด้วย (Buchaman *et. al.* 1974 ; Nanba *et. al.* 1983) และการเติม Tween 80 ในปริมาณสูงกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (สมใจ ภัสสัตตยงกูร. 2527 ; น้อย ทองสกุลพานิชย์. 2527) ดังนั้นในการทดลองลำดับต่อไป จึงเลือกเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตลอดการทดลอง

Tween 80 (polyxyethylene (20) sorbitan monooleate) ซึ่งเป็น non-ionic surfactant ชนิดหนึ่ง สามารถกระตุ้นการจับ extracellular protein ของเชื้อ *Pseudomonas butanovara* sp. nov. (Takahashi. 1983) และยังพบว่า Tween 60 ซึ่งก็เป็น nonionic surfactant ชนิดหนึ่งด้วย จะช่วยเพิ่มการส่งผ่านกรดกลูตามิกซึ่งผลิตได้จาก *Brevibacterium flavum* โดยกลไกการส่งผ่านสันนิษฐานว่าเกิดจาก สาร surfactant ไปลดความตึงผิวของ cell membrane ในชั้นที่สัมผัสกับอาหาร ทำให้ cell permeability เปลี่ยนแปลงไป (Shiio *et. al.* 1963)

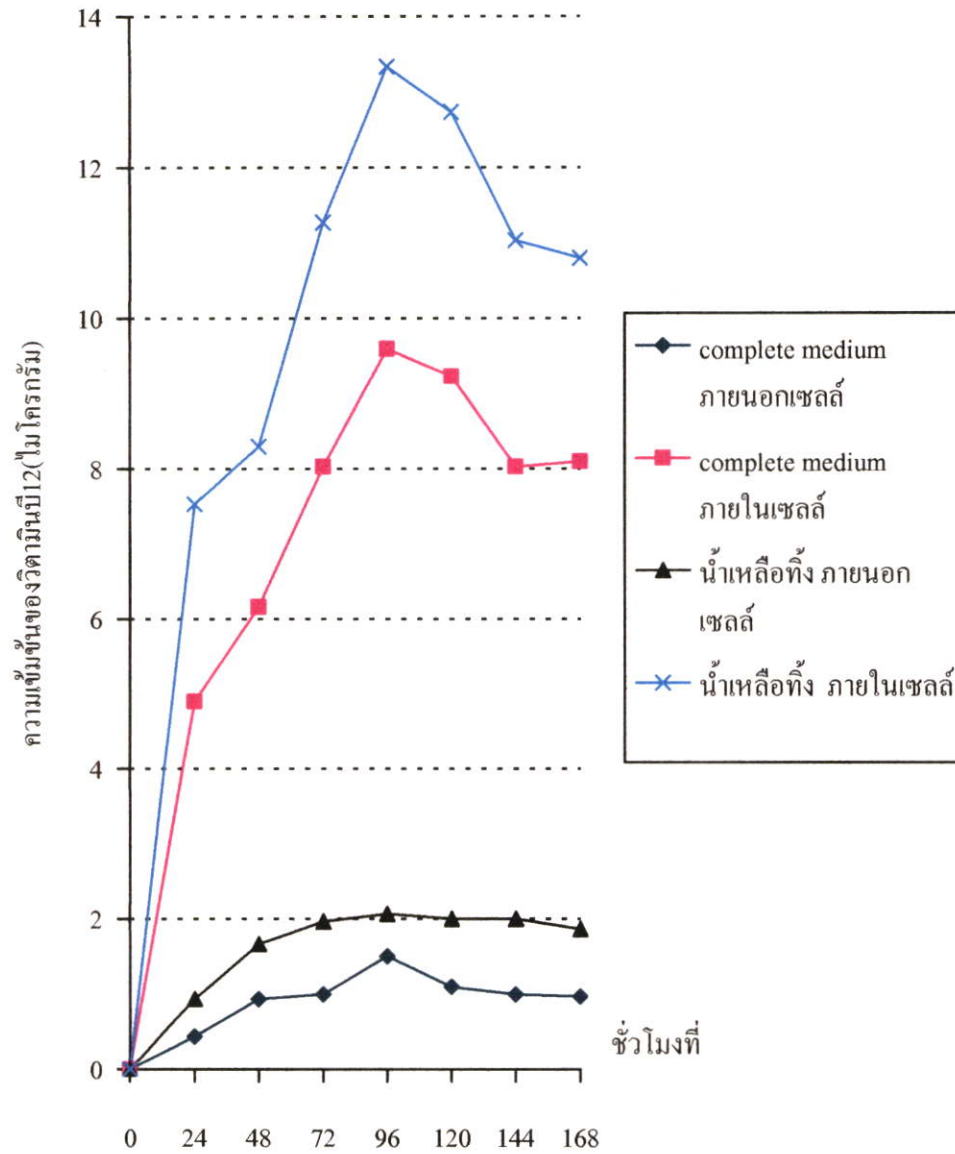
4.3 ผลการศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารปริมาณเหมาะสม ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

4.3.1 ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆกัน เลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษาจากข้อ 3.3.1 แล้วเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า เซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหาร complete medium จะมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงสุดเป็น 1.500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และภายในเซลล์สูงสุดเป็น 9.600 ไมโครกรัมต่อกรัม ในชั่วโมงที่ 96 ส่วนเซลล์อิสระที่เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร จะมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงสุดเป็น 2.066 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และภายในเซลล์สูงสุดเป็น 13.333 ไมโครกรัมต่อกรัม ในชั่วโมงที่ 96 แสดงดังภาพที่ 4.3

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.05 พบว่าในชั่วโมงที่ 96 ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ทั้งหมดของเซลล์อิสระ ที่เลี้ยงใน complete medium และในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ศึกษาจากข้อ 3.3.1 แล้วเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.3 และเซลล์อิสระที่เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารจะมีค่าวิตามินบี 12 (ทั้งหมด)สูงกว่าเซลล์อิสระที่เลี้ยงใน complete medium เป็น 27.92 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.5

ถ้าหากเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์จะพบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ของเซลล์อิสระ ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร กับ ในอาหาร complete medium จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ พบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ของเซลล์อิสระในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร จะมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระที่เลี้ยงในอาหาร complete medium 28.00 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.5 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.3 แสดงกราฟเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติผลของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ทั้งหมด) ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ใน complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่ 96	complete medium เซลล์อิสระ	complete medium เซลล์ที่ถูกตรึง	น้ำเกลือที่ เซลล์อิสระ	น้ำเกลือที่ เซลล์ที่ถูกตรึง
วิตามินบี 12 ทั้งหมด (total)	11.100 ^c	12.933 ^b	15.400 ^a	15.967 ^a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ
ตัวอักษรไม่เหมือนกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของเซลล์อิสระ ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่ 96	complete medium ภายนอกเซลล์	น้ำเกลือที่ ภายนอกเซลล์	complete medium ภายในเซลล์	น้ำเกลือที่ ภายในเซลล์
ความเข้มข้น วิตามินบี 12	1.500 ^c	2.066 ^c	9.600 ^b	13.333 ^a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ
ตัวอักษรไม่เหมือนกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของเซลล์อิสระ ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

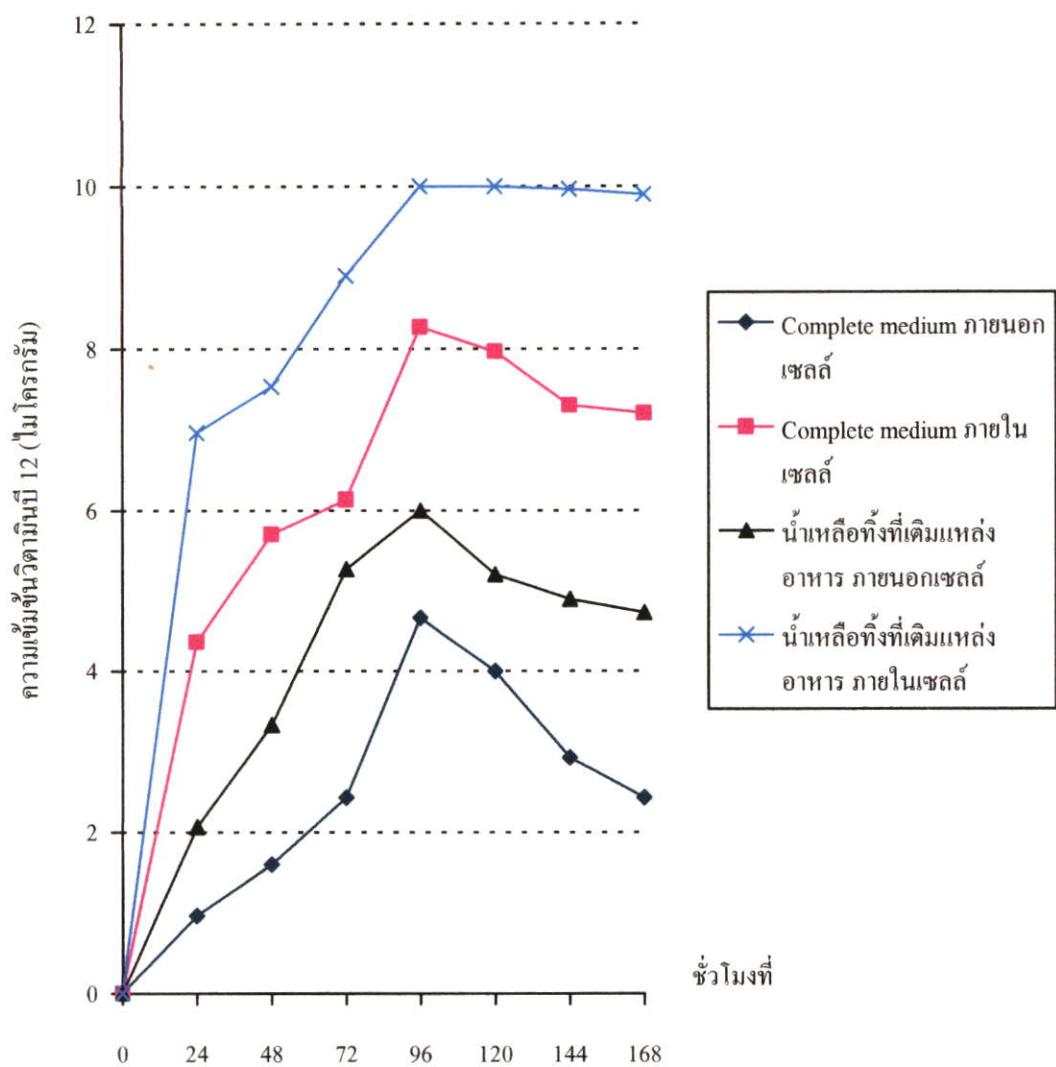
ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 (ชั่วโมงที่ 96)	ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่าง complete medium และ น้ำเกลือที่ (เปอร์เซ็นต์)
ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ภายนอกเซลล์)	ไม่แตกต่างกัน
ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ภายในเซลล์)	28.00
ค่าความเข้มข้นวิตามินบี 12 ทั้งหมด (ภายนอก และ ภายในเซลล์)	27.92

4.3.2 ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆกัน เลี้ยงในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษาจากข้อ 3.3.1 แล้วเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า เซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหาร complete medium จะมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงสุดเป็น 4.666 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และภายในเซลล์สูงสุดเป็น 8.266 ไมโครกรัมต่อกรัม ในชั่วโมงที่ 96 ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร จะมีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงสุดเป็น 6.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และภายในเซลล์สูงสุดเป็น 10.000 ไมโครกรัมต่อกรัม ในชั่วโมงที่ 96 แสดงดังภาพที่ 4.4

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ทั้งหมด) ของเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.3 และเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร จะมีค่าวิตามินบี 12 (ทั้งหมด) สูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงใน complete medium เป็น 19.00 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.7

ถ้าหากเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ จะพบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ของเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร มีค่าสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงเลี้ยงใน complete medium เป็น 22.23 เปอร์เซ็นต์ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ พบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ของเซลล์ที่ถูกตรึงเลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร มีค่าสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงเลี้ยงใน complete medium เป็น 17.34 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.7 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.6



ภาพที่ 4.4 แสดงกราฟเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของเซลล์ที่ถูกตรึง ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่ 96	complete medium ภายนอกเซลล์	complete medium ภายในเซลล์	น้ำเกลือที่ ภายนอกเซลล์	น้ำเกลือที่ ภายในเซลล์
ความเข้มข้น วิตามินบี 12	4.666 ^d	8.266 ^c	6.000 ^b	10.000 ^a

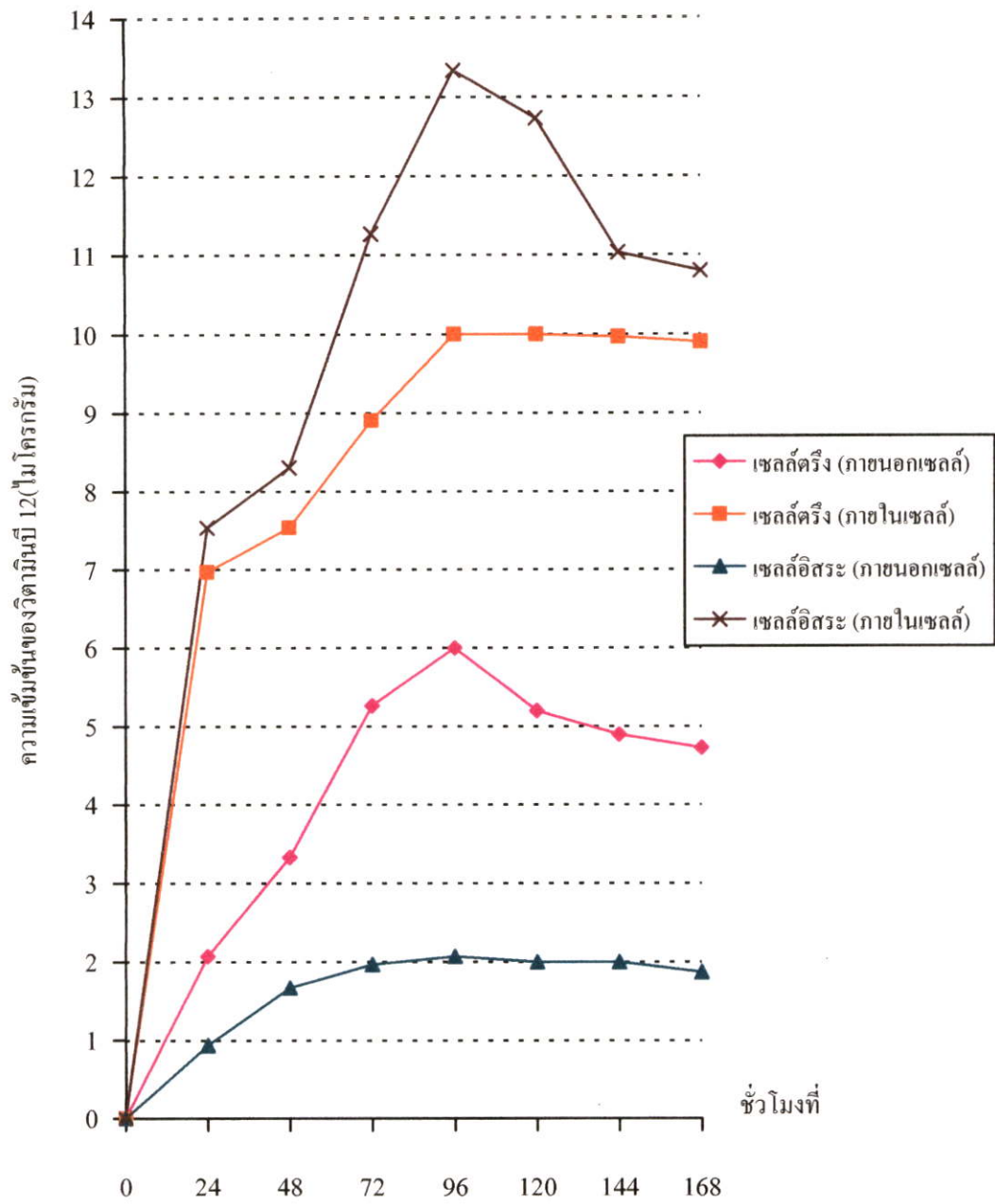
กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ
ตัวอักษรไม่เหมือนกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของเซลล์ที่ถูกตรึง ระหว่างอาหาร complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 (ชั่วโมงที่ 96)	ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่าง complete medium และ น้ำเกลือที่ (เปอร์เซ็นต์)
ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ภายนอกเซลล์)	22.23
ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ภายในเซลล์)	17.34
ค่าความเข้มข้นวิตามินบี 12 ทั้งหมด (ภายนอก และ ภายในเซลล์)	19.00

4.3.3 ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ผลการเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆกัน เลี้ยงในน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า เซลล์อิสระได้ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงสุดเป็น 2.066 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และภายในเซลล์สูงสุดเป็น 13.333 ไมโครกรัมต่อกรัม ในชั่วโมงที่ 96 ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงได้ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงสุดเป็น 6.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และภายในเซลล์สูงสุดเป็น 10.000 ไมโครกรัมต่อกรัม ในชั่วโมงที่ 96 แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 แสดงกราฟเปรียบเทียบการผลิตวิตามินบี 12 ระหว่างเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกครึ่งใน น้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมัก ขนาด 2 ลิตร

เมื่อนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.05 พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ทั้งหมดของเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึง ที่เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมัก ขนาด 2 ลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.3

ถ้าหากเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์จะพบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ของเซลล์ที่ถูกตรึง ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าสูงกว่า เซลล์อิสระในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร 65.56 เปอร์เซ็นต์ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ พบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ของเซลล์อิสระ ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าสูงกว่า เซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารเป็น 25.00 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.9 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติของเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึง ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่ 96	เซลล์อิสระ ภายนอกเซลล์	เซลล์ที่ถูกตรึง ภายนอกเซลล์	เซลล์ที่ถูกตรึง ภายในเซลล์	เซลล์อิสระ ภายในเซลล์
ความเข้มข้น วิตามินบี 12	2.066 ^d	6.000 ^c	10.000 ^b	13.333 ^a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ตัวอักษรไม่เหมือนกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึง ในน้ำเกลือที่
ที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

ความเข้มข้นของวิตามินบี 12 (ชั่วโมงที่ 96)	ค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างระหว่าง เซลล์อิสระ และ เซลล์ที่ถูกตรึง (เปอร์เซ็นต์)
ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ภายนอกเซลล์)	65.56
ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ภายในเซลล์)	25.00
ค่าความเข้มข้นวิตามินบี 12 ทั้งหมด (ภายนอก และ ภายในเซลล์)	ไม่แตกต่างกัน

การที่ได้ค่าความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ของเซลล์ที่ถูกตรึงสูง เป็น
ข้อดีเพราะวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ สามารถแยกผลผลิตออกจากเซลล์ที่ถูกตรึงได้โดยการกรอง
ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย และสะดวกกว่าการแยกของระบบการใช้เซลล์อิสระ ซึ่งต้องใช้เครื่องมือเพียง
นอกจากนั้นยังสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ในการผลิตวิตามินบี 12 ได้อีก เป็นการช่วยลด
ต้นทุนการผลิตในช่วงการเตรียมเซลล์ (น้อย ทองสกุลพานิชย์. 2527)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์หาชนิดของวิตามินบี 12 ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าอยู่ในรูปของ cyanocobalamin โดยมีค่า retention time ของสารละลายตัวอย่างใกล้เคียงกับค่า retention time ของ cyanocobalamin มาตรฐาน คือ 21.989 นาที ในสภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน

จากการศึกษาอิทธิพลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12 โดยเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินัท ในน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณต่างๆ เป็น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า Tween 80 ที่ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่เติมลงในน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร เป็นปริมาณเปอร์เซ็นต์ของ Tween 80 ที่เหมาะสมต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง โดยมีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหารโดยไม่เติม Tween 80 แต่จะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 ปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 สภาพเซลล์อิสระ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆ กัน ระหว่าง complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร แล้วเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า ในช่วงเวลาที่ 96 เซลล์อิสระที่เลี้ยงใน complete medium และน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหาร มีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงเป็น 1.500 และ 2.066 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ เซลล์อิสระที่เลี้ยงในน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหารและใน complete medium มีค่าสูงเป็น 13.333 และ 9.600 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ โดยเซลล์อิสระที่เลี้ยงในน้ำที่เติมแหล่งอาหารมีค่าสูงกว่าใน complete medium เป็น 28.00 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณวิตามินบี 12 ทั้งหมดของเซลล์อิสระในน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหารและ complete medium มีค่าเป็น 15.400 และ 11.100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณวิตามินบี 12 ทั้งหมดของเซลล์อิสระที่เลี้ยงในน้ำเกลือที่เติมแหล่งอาหารมีค่าสูงกว่าใน complete medium เป็น 27.92 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากเซลล์ที่ถูกตรึงปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆ กัน เลี้ยงระหว่าง complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร แล้วเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 เซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารและ complete medium มีค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงเป็น 6.000 และ 4.666 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารมีค่าวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์สูงกว่า ใน complete medium เป็น 22.23 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์สูงเป็น 10.000 และ 8.266 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ โดยเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารมีค่าวิตามินบี 12 ภายในเซลล์สูงกว่าใน complete medium เป็น 17.34 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณวิตามินบี 12 ทั้งหมดมีค่าเป็น 15.967 และ 12.933 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณวิตามินบี 12 ทั้งหมดของเซลล์ที่ถูกตรึงในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารมีค่าสูงกว่า complete medium เป็น 19.00 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์อิสระกับเซลล์ที่ถูกตรึง ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่าๆ กัน ในน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร พบว่า ในชั่วโมงที่ 96 ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ของเซลล์ที่ถูกตรึงมีค่าเป็น 6.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์อิสระมีค่าเป็น 2.066 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเซลล์ที่ถูกตรึงมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระเป็น 65.56 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายในเซลล์ของเซลล์อิสระมีค่าเป็น 13.333 ไมโครกรัมต่อกรัม และเซลล์ที่ถูกตรึงมีค่าเป็น 10.000 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยเซลล์อิสระมีค่าสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงเป็น 25.00 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณวิตามินบี 12 ทั้งหมดของเซลล์อิสระมีค่าเป็น 15.400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเซลล์ที่ถูกตรึงมีค่าเป็น 15.967 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการวิจัยครั้งนี้มีข้อเสนอแนะในการวิเคราะห์หาชนิดของวิตามินบี 12 ด้วยเทคนิค HPLC จากผลการทดลองจะได้อยู่ในรูปของ cyanocobalamin ซึ่งชนิดสารประกอบวิตามินบี 12 อื่นๆ เช่น methylcobalamin , deoxyadenosylcobalamin และ hydroxocobalamin จะมีค่า retention time ใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกให้เด่นชัดได้ จึงควรมีการปรับปรุงสภาวะการวิเคราะห์การหาชนิดของสารประกอบวิตามินบี 12 โดยเทคนิค HPLC ในครั้งต่อไป

บรรณานุกรม

- กอบชัย พรคุชฎีกุล และเกศินี ชื่นปิยะวาจา. 2538. “การวิเคราะห์ผลจากการศึกษาปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่.” โครงการงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กิจจา ช.ยิ่งเจริญ และคณะ. 2536. “การผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* (ATTC) จากน้ำทิ้งโรงงานฆ่าไก่.” โครงการงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ณัฐวุฒิ สุรณัฐกุล และคณะ. 2536. “การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมปลาหมึกกระป๋อง เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยใช้เชื้อ *Propionibacterium freudenreichii*.” โครงการงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เทพสิทธิ์ ผดุงโยธี และคณะ. 2540. “การศึกษาผลของปัจจัยในการผลิตวิตามินบี 12 จากน้ำทิ้งโรงงานผลิตชอส์ถั่วเหลืองโดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* (TISTR 446).” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- น้อย ทองสกุลพานิชย์. 2527. “ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของแบคทีเรียโพรพิโอนิคที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจินเนท.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นุชบา ยงสมิทธิ์. 2540. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- แม่น อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม. 2534. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.
- สมทรง เลขะกุล. บรรณาธิการ. 2543. ชีวเคมีของวิตามิน. พิมพ์ครั้งที่ 2.
- สมใจ ภัสสัถยางกูร. 2527. “การศึกษาวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์และการนำไปปรับใช้ในการผลิตสารเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียโพรพิโอนิค.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุริย์ ทอวงฉนิยม. 2543. “การใช้ประโยชน์น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเล เพื่อผลิตวิตามินบี 12 โดยเชื้อ *Propionibacterium freudenreichii* TISTR 446 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนท.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- Abbott, J.B. 1977. Immobilized cells. In Perlman, D., editor. 1977. **Annual reports on fermentation processes**. vol. 1. New York : Academic Press.
- Adjalla, C. et. al. 1994. "Forms of cobalamin and vitamin b₁₂ analogs in maternal plasma , milk and cord plasma." **Journal of Nutritional Biochemistry**. 5 : 406-410.
- Armstrong, B.K. et. al. 1974. "Hematological vitamin B₁₂ and folate studies on seventh day adventist vegetarians." **American Journal of Clinical Nutrition**. 27 : 712-718.
- Ball, G.F.M. 1994. **Water-Soluble Vitamin Assays in Human Nutrition**. London : Chapman and Hall.
- Baron, A. 1962. Use of thickening agent. In Noyes, R. 1969. **Vitamin B₁₂ manufacture**. New Jersey : Noyes Development Corp.
- Becher, E. et. al. 1962. "Use of precursors." **U.S patent**. No. 3043750.
- Bickerstaff, G.F., edited. 1997. **Immobilization of enzymes and cells**. New jersey : Humana Press Inc.
- Blanche, F. et. al. 1990. "Identification and quantitation of corrinoid precursors of cobalamin from *Pseudomonas denitrificans* by high performance liquid chromatography." **Analytical Biochemistry**. 189 : 24-29.
- Boretti, G. et. al. 1960. Biochem Biology Acata. In Rainbow, C. and Rose, A.H. 1963. **Biochemistry of industrial microorganisms**. New York : Academic Press.
- Brodelius, P. et. al. 1979. "Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products." **FEBS Letters**. 103 : 93-97.
- Brody, T. 1994. **Nutritional biochemistry**. ACADEMIC PAGES INC. 376-382.
- Buchanan, R.E. et. al. 1974. **Bergey's manual of determine bacteriology**. 8th ed. Baltimore : William and Wilkins Company.
- Casida, L.E. Jr. 1968. **Industrial microbiology**. New York : John Wiley & Son.
- Chaplin, M. 2003. **Alginate**. [Online].

- Cheetham, P.S.J. 1980. Developments in the immobilization of microbial cells and their application. In Wiseman, A., editor. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. 4 : 189-242.
- Cheetham, P.S.J. et. al. 1979. "Physical studies in cell immobilization using calcium alginate gels." **Biotechnology and Bioengineering**. 21 : 2155-2168.
- Chibata, I. and Tosa, T. 1977. "Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells." **Advances in Applied Microbiology**. 22 : 1-25.
- Chibata, I. et. al. 1978. **Immobilized enzymes**. Tokyo : Kodansha Press.
- Castle, W.B. 1975. **Biochemistry and Physiology**. New York : John Wiley and Sons.
- Cox, E.V. and White, A.M. 1962. "Methylmalonic acid excretion : an index of vitamin B₁₂ deficiency." **Lancet**. 2 : 853-856.
- David, H. 2000. **Modern analytical chemistry**. Boston : McGraw-Hill.
- Djalali, M. et. al. 1990. "High performance liquid chromatographic separation and dual competitive binding assay of corrinoids in biological material." **Jouranal of Chromatography**. 529 : 81-91.
- Ellenbogen, L. and Cooper, B.A. 1991. Vitamin B₁₂. In Machlin, L.J., editor. **Handbook of vitamins** . 2nd ed. New Jersey : Marsel Dekker.
- Florent, J. and Ninet, L. 1979. Vitamin B₁₂. In Pepler, H.J. and Perlman, P., editor. **Microbial Technology**. Vol. 1. New York : Academic Press.
- Grasbeck, R. 1984. "Biochemistry and clinical chemistry of vitamin B₁₂ transport and the related diseases." **Clinical Biochemistry**. 17 : 99-107.
- Groff, J.L. et. al. 1995. "Vitamin B₁₂ (cobalamins)." **Advances in Nutrition and Human Metabolism**. West Publishing : St. Pul. 270-276.
- Hastings, J.J.H. 1971. Development of the fermentation industries in Great Britain . In Peoman, D. **Advance in Applied Microbiology**. Vol. 14. New York : Academic Press.
- Jackson, W.G. et. al. 1951. "The isolation of vitamin B₁₂ from neomysin fermentations." **Journal of the American Chemical Society**. 73 : 337-341.
- Kierstan, M. and Bucke, C. 1977. "The immobilization of microbial cells , subcellular organelles and enzymes in calcium alginate gels." **Biotechnology and Bioengineering**. 19 : 387-397.

- Koshcheenko, K.A. 1981. "Living immobilized cells as biocatalysts of transformation and biosynthesis of organic compounds." **Applied Microbiology and Biochemistry**. 17(4) : 351-365.
- Kucheras, A.G. 1972. "Effect of amino acids on cobamide synthetic activity of *Propionibacterium shermanii*." *R.V.Biochem.Microbial*. 8 : 341-346. **Microbial Abstracts**. 7A : 784.
- Levtion, A. and Hargrove, R.E. 1952. "Microbiological synthesis of vitamin B₁₂ by propionic acid bacteria." **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 44 : 2651-2655.
- Lindenbaum, J. et. al. 1988. "Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anaemia or macrocytosis." **New England Journal of Medicine**. 318 : 1720-1728.
- Marks, D.B. et. al. 1996. Vitamin B₁₂. In Velker, J., editor. **Text book of Basic Medical Biochemistry : a clinical approach International ed**. Baltimore : Williams & Wilkins.
- Maynard, L.A. et. al. 1979. **Animal Nutrition**. 7th ed. New York : McGraw – Hill.
- McDonald, P.R.A. and Greenhalgh, J.F.D. 1973. **Animal nutrition**. 2nd ed. London : Longman Group Limited.
- Mitchell, F. 1998. **Alginate**. [Online]. Available : <http://www.botany.uwc.ac.za>.
- Nanba, A. et. al. 1983. "Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*." **Journal of Fermentation Technology**. 61 : 551-556.
- Noyes, R. 1969. **Vitamin B₁₂ manufacture**. New Jersey : Noyes Development Crop.
- Osman, H.G. and Chenouda, M.S. 1968. "Biosynthesis of vitamin b₁₂ by *Propionibacterium shermanii* II : The suitability of different carbon and nitrogen sources as well as the effect of vitamins , purines and pyrimidines on the growth and vitamin b₁₂ synthesis." *J.Chem.URA*. 11 : 353-361. **Abstract in Microbial. Abstract Section A Industrial Microbiology**.
- Paul, F. and Vignais, P.M. 1980. *Enz. Microb. Technol*. 2 : 281-287. In Bucke, C. 1982. *Immobilized Cells*. In UNESCO workshop on immobilized microbial enzymes and cells. 13-17 December 1982. Nahidol University Bangkok : Thailand.
- Petty, M.A. 1948. "Animal nutrition." **U.S. Patent**. 2 : 515,135.
- Pierce, J.V. et. al. 1950. "Studies of some characteristics of vitamin B₁₂." **Journal of the American Chemical Society**. 72 : 2615-2616.
- Pouwels, P.H. et al. 1999. **Propionibacterium vector. WO1999EP0004416**. [Online].

- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. "The production of Vitamin B₁₂." **In Industrial Microbiology**. New York : McGraw – Hill Book Company. 520.
- Renz, P. 1970. "Riboflavin as precursor in the biosynthesis of the 5,6-dimethylbenzimidazole moiety of vitamin B₁₂." **FEMS Letters**. 6(3) : 187-189.
- Rose, R.C. et. al. 1984. "Transport and metabolism of water soluble vitamins in intestine and kidney." **Federation Proceedings**. 43 : 2423-2429.
- Sato, K. et. al. 1997. "A modified form of a vitamin b₁₂ compound extracted from whey ferment by *Lactobacillus halveticus*." **Journal of Dairy Science**. 80 : 2701-2705.
- Seetharam, B. and Alpers, D.H. 1982. "Absorption and transport of cobalamin (vitamin B₁₂)."
Annual Review. 2 : 343-369.
- Seetharam, B. and Alpers, D.H. 1985. "Cellular uptake of cobalamin." **Nutriton Review**.
43 : 97-102.
- Settle, F.A., editor. 1997. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**.
New Jersey : Prentice-Hall, Inc.
- Shiio, I. et. al. 1963. Cellular permeability and extracellular formation glutamic acid in
Brevibacterium flavum. **Journal Biochemistry**. 53(5) : 330-340.
- Skoog, D.A. 1996. **Fundamentals of Analytical Chemistry 7 ed**. Philadelphia : Saunders
College Publishing
- Smith, E.L. and Ball, S. 1953. Nitrous acid treatment for separating impurities from
antipermeious anemia active material. **U.S. Patent**. 2 , 630 , 401.
- Spallholz, J.E. et. al . 1999. **Nutrition Chemistry and Biology. Second edition**. CRC press LLC.
- Speedie , J.D. and Hull, G.W. 1960. "Vitamin B₁₂ production by *Propionibacterium
shermannii* ." **U.S. Patent**. 2 : 017 , 251.
- Takahashi, J. 1983. Production of extracellular protein by *Pseudomonas butanovara* sp.nov. at
the expense of n butane. **Microbial Utilization of Renewable Resources on Agro-
Industrial Including Microbial Technology**. 3 : 122-129
- Wardlaw, G.M. 1999. **Perspectives in Nutrition , Fourth edition**. Boston : McGraw-Hill
- Wardlaw, G.M. 2000. **Contemporary Nutrition : Issues and Insights , Fourth edition**.
Iowa McGraw-Hill

Zodrow, K. et. al. 1963. Infouence of Ca-pantothenate and biotin on the growth and biosynthesis of corrinoids by Propionibacteria. Acta Microbiol. Pol. 12 : 263-266.

In Hettings, D.H. and. Ueinbold, G.W. 1972. **Journal of Milk and Food Technology**. 35(5) : 295-301.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร MRS

Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิกรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tri-ammonium citrate	2	กรัม
$MgSO_4$	0.2	กรัม
$MnSO_4$	0.2	กรัม
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. สูตรอาหาร Complete medium

Acid hydrolysate of casein	1	กรัม
Pancreatic digest of casein	1.5	กรัม
NaH ₂ PO ₄	1.6	กรัม
K ₃ PO ₄ ·3H ₂ O	1.6	กรัม
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.4	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10	มิลลิกรัม
CoSO ₄ ·7H ₂ O	12	มิลลิกรัม
Biotin	0.3	มิลลิกรัม
Pantothenic acid	4	มิลลิกรัม
Glucose	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบ	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.0

นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

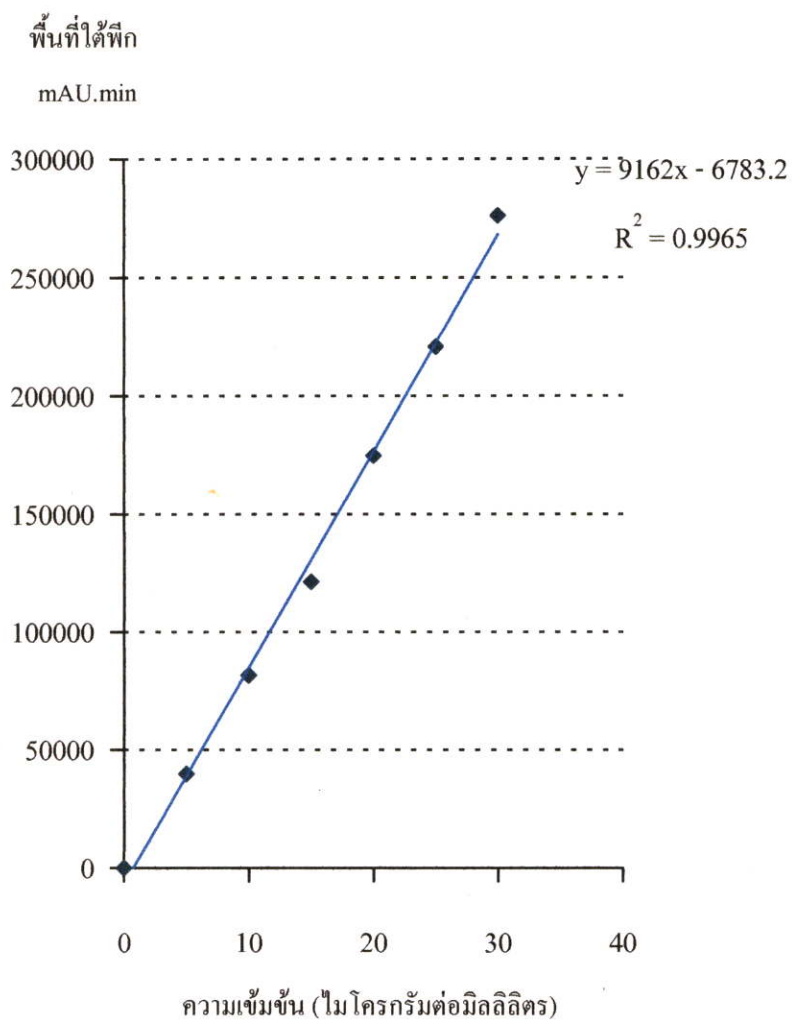
ภาคผนวก ข.
การวิเคราะห์

1. กราฟมาตรฐานของวิตามินบี 12 ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน

1.1 กราฟมาตรฐานของวิตามินบี 12 ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน ใช้เปรียบเทียบการศึกษาอิทธิพลของ Tween 80 ต่อการส่งผ่านวิตามินบี 12 ข้อ 3.6.1

ตารางที่ ข.1 ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12 ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ฉีดตัวอย่างๆ ละ 20 ไมโครลิตร)

ค่าความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	retention time (นาที)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค
0	21.958	0
5	21.886	39,826
10	21.764	81,739
15	21.449	121,444
20	21.419	174,902
25	21.580	220,673
30	21.482	275,939

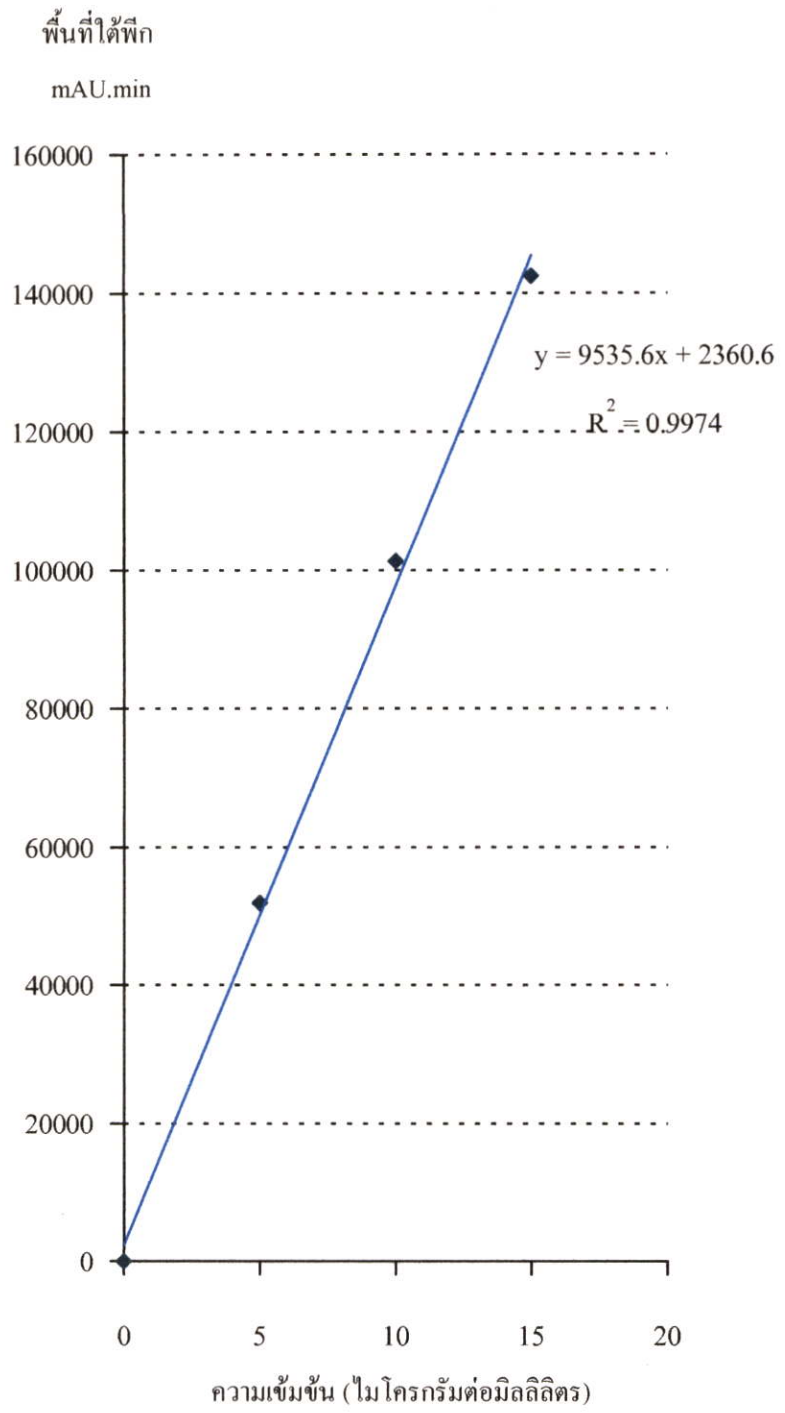


ภาพ ข.1 กราฟมาตรฐานวิตามินบี 12

1.2 กราฟมาตรฐานของวิตามินบี 12 ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน ใช้เปรียบเทียบ การศึกษาหาปริมาณการผลิตวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในอาหาร complete medium และน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหารที่ทำการศึกษาจากข้อ 3.3.1 ในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร ข้อ 3.6.2

ตารางที่ ข.2 ค่าพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12 ในรูปของไซยาโนโคบาลามิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ฉีดตัวอย่างๆ ละ 20 ไมโครลิตร)

ค่าความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	retention time (นาที)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค
0	21.477	0
5	21.421	51,804
10	21.648	101,268
15	21.495	142,439
30	21.929	252,286



ภาพ ข.2 กราฟมาตรฐานวิตามินบี 12

ภาคผนวก ก.

ข้อมูล

ตารางที่ ก.1 แสดงค่า retention time* ของสารละลายตัวอย่างน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารที่
และเติม Tween 80 ปริมาณต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึง

ความเข้มข้น Tween80(%)	ชั่วโมงที่						
	24	48	72	96	120	144	168
0	21.463	21.217	21.133	21.927	21.648	21.755	21.515
0.1	21.497	21.840	21.778	21.825	21.208	21.350	21.228
0.5	21.740	21.228	21.033	21.769	21.502	21.270	21.263
1.0	21.214	21.248	21.343	21.845	21.688	21.354	21.355
1.5	21.334	21.334	21.492	21.964	21.329	21.247	21.269

* retention time เป็นนาที

ตารางที่ ก.2 แสดงค่า retention time* ของสารละลายตัวอย่างอาหาร complete medium ที่เติม Tween 80
0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้เลี้ยงเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงในระดังกังหมัก 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	เซลล์อิสระ		เซลล์ที่ถูกตรึง	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	21.673	21.524	21.404	21.528
48	21.412	21.517	21.363	21.590
72	21.503	21.960	21.395	21.396
96	21.677	21.739	21.402	21.474
120	21.829	21.730	21.609	21.563
144	21.899	21.838	21.411	21.467
168	21.761	21.809	21.430	21.680

* retention time เป็นนาที

ตารางที่ ก.3 แสดงค่า retention time* ของสารละลายตัวอย่างน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้เลี้ยงเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกตรึงในระดับตั้งหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	เซลล์อิสระ		เซลล์ที่ถูกตรึง	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	21.603	21.438	21.458	21.827
42	21.102	21.569	21.305	21.629
72	21.508	21.405	21.611	21.654
96	21.652	21.669	21.732	21.643
120	21.297	21.487	21.614	21.651
144	21.279	21.479	21.709	21.461
168	21.580	21.322	21.422	21.737

* retention time เป็นนาที

ตารางที่ ก.4 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ปริมาณ Tween 80 เปอร์เซ็นต์ ต่างๆกัน

ปริมาณของ Tween80(%)	ชั่วโมงที่						
	24	48	72	96	120	144	168
0	1.40	2.26	2.50	2.90	2.63	2.56	2.46
0.1	1.46	2.76	2.90	4.03	3.86	2.73	2.63
0.5	1.50	2.86	2.96	4.33	4.13	3.03	2.86
1.0	2.10	3.00	3.26	4.76	4.43	3.50	3.20
1.5	2.60	3.06	3.43	5.16	4.90	3.93	3.40

ตารางที่ ก.5 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระ ในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหารและเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	complete medium		น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	0.433	4.900	0.933	7.533
48	0.933	6.166	1.667	8.300
72	1.000	8.033	1.967	11.270
96	1.500	9.600	2.066	13.333
120	1.133	9.233	2.000	12.733
144	1.000	8.033	2.000	11.033
168	0.966	8.100	1.867	10.800

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ภายในเซลล์ (ไมโครกรัมต่อกรัม)

ตารางที่ ก.6 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึง ในอาหาร complete medium และน้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับถึงหมักขนาด 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	complete medium		น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	0.966	4.366	2.066	6.966
48	1.600	5.700	3.333	7.533
72	2.433	6.133	5.266	8.900
96	4.666	8.266	6.000	10.000
120	4.000	7.966	5.200	10.000
144	2.933	7.300	4.900	9.966
168	2.433	7.200	4.733	9.900

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ภายในเซลล์ (ไมโครกรัมต่อกรัม)

ตารางที่ ก.7 แสดงค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึง
 ในน้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 , 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับ
 ถังหมัก 2 ลิตร

ชั่วโมงที่	เซลล์อิสระ		เซลล์ที่ถูกตรึง	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	0.933	7.533	2.066	6.966
48	1.667	8.300	3.333	7.533
72	1.967	11.270	5.266	8.900
96	2.066	13.333	6.000	10.000
120	2.000	12.733	5.200	10.000
144	2.000	11.033	4.900	9.966
168	1.867	10.800	4.733	9.900

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นวิตามินบี 12 ภายนอกเซลล์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
 ภายในเซลล์ (ไมโครกรัมต่อกรัม)

ตารางที่ ก.8 แสดงค่าเฉลี่ยพีเอชของตารางที่ ก.4

ความเข้มข้น Tween80(%)	ชั่วโมงที่						
	24	48	72	96	120	144	168
0	4.4	4.3	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
0.1	4.3	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
0.5	4.1	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
1.0	4.1	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
1.5	4.1	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8

ตารางที่ ก.9 แสดงค่าเฉลี่ยพีเอชของตารางที่ ก.5

ชั่วโมงที่	complete medium		น้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	4.1	4.1	4.1	4.0
48	4.0	4.0	4.1	3.9
72	4.0	3.9	4.1	3.8
96	4.0	3.9	4.1	3.8
120	4.0	3.9	4.1	3.8
144	4.0	3.9	4.1	3.8
168	4.0	3.9	4.1	3.8

ตารางที่ ก.10 แสดงค่าเฉลี่ยพีเอชของตารางที่ ก.6

ชั่วโมงที่	complete medium		น้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	4.0	4.1	4.0	4.0
48	3.9	4.0	4.0	3.8
72	3.9	4.0	3.9	3.8
96	3.9	4.0	3.9	3.8
120	3.9	4.0	3.9	3.8
144	3.9	4.0	3.9	3.8
168	3.9	4.0	3.9	3.8

ตารางที่ ก.11 แสดงค่าพื้นที่ใต้พีค (ค่าเฉลี่ย) จากการฉีดสารละลายตัวอย่างที่เติมปริมาณ Tween 80
เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากตารางที่ ก.4

ช.ม.	ความเข้มข้น Tween 80(%)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
24	0	11,636	11,579	10,141
	0.1	11,854	11,924	11,139
	0.5	11,625	12,117	12,151
	1.0	16,823	15,528	16,971
	1.5	20,774	20,226	19,552
48	0	18,020	15,425	19,549
	0.1	21,547	21,579	20,299
	0.5	21,973	21,888	21,578
	1.0	23,225	23,413	22,725
	1.5	22,942	23,654	23,966
72	0	19,695	18,463	20,263
	0.1	22,247	22,497	22,671
	0.5	23,716	23,740	21,138
	1.0	26,982	25,214	24,176
	1.5	27,220	27,334	25,817
96	0	22,918	21,217	22,778
	0.1	31,824	31,840	29,839
	0.5	35,002	35,228	31,231
	1.0	38,653	37,246	35,277
	1.5	41,724	39,334	38,110
120	0	20,489	21,133	19,398
	0.1	30,238	29,778	28,628
	0.5	32,145	32,033	32,817
	1.0	35,893	34,343	32,938
	1.5	39,807	39,492	35,121

ตารางที่ ค.11 (ต่อ)

ช.ม.	ความเข้มข้น Tween 80(%)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
144	0	19,423	20,927	20,444
	0.1	21,625	21,025	21,412
	0.5	24,015	24,769	22,174
	1.0	26,692	26,845	26,902
	1.5	30,116	30,964	30,407
168	0	18,506	20,131	20,220
	0.1	21,020	19,854	20,673
	0.5	29,678	22,140	22,067
	1.0	24,752	25,136	25,475
	1.5	27,910	25,138	27,939

ตารางที่ ค.12 ค่าพื้นที่ใต้พีค (ตารางที่ ค.11) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานวิตามินบี 12 (ภาพ ข.1) ได้เป็นค่าความเข้มข้นวิตามินบี 12 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่วโมง	24			48			72			96			120			144			168		
tween80*	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	1.5	1.4	1.3	2.3	2.0	2.5	2.5	2.4	2.6	3.0	2.7	3.0	2.6	2.7	2.6	2.4	2.7	2.6	2.4	2.5	2.5
0.1	1.5	1.5	1.4	2.8	2.9	2.6	2.8	2.9	3.0	4.1	4.1	3.9	3.9	3.9	3.8	2.8	2.7	2.7	2.7	2.5	2.7
0.5	1.5	1.5	1.5	2.8	2.9	2.9	3.1	3.1	2.7	4.5	4.5	4.0	4.1	4.1	4.2	3.1	3.2	2.8	3.0	2.8	2.8
1	2.2	2.0	2.1	3.0	3.0	3.0	3.5	3.2	3.1	5.0	4.8	4.5	4.6	4.4	4.3	3.5	3.5	3.5	3.2	3.2	3.2
1.5	2.7	2.6	2.5	3.0	3.1	3.1	3.5	3.5	3.3	5.4	5.2	4.9	5.2	5.0	4.5	3.9	4.0	3.9	3.6	3.2	3.6

* หมายถึง เปอร์เซนต์

ตารางที่ ก.17 แสดงข้อมูลคิบั ค่าเฉลี่ยพื้นที่ได้ฟัก (การฉีด 2 ซ้ำ) ของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในอาหาร complete medium ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในระดับถึงหมัก

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	9,973	44,683	10,100	46,510	10,248	44,106
48	16,000	57,119	16,437	57,891	16,823	56,912
72	24,571	62,281	26,004	62,893	24,000	62,952
96	48,146	82,102	46,983	82,263	47,931	86,112
120	41,747	80,917	41,972	80,016	41,837	80,150
144	29,881	75,100	31,026	75,974	29,540	72,138
168	25,611	72,910	25,007	73,108	24,883	71,571

ตารางที่ ก.18 ค่าพื้นที่ได้ฟัก (ตารางที่ ก.17) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานวิตามินบี 12 (ภาพ ข.2) ได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในอาหาร complete medium ที่เติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	0.9	4.5	1.0	4.5	1.0	4.3
48	1.6	5.7	1.6	5.7	1.6	5.7
72	2.4	6.1	2.5	6.2	2.4	6.1
96	4.7	8.2	4.6	8.1	4.7	8.5
120	4.0	8.0	4.0	7.9	4.0	8.0
144	2.9	7.4	3.0	7.4	2.9	7.1
168	2.5	7.3	2.4	7.3	2.4	7.0

ตารางที่ ค.13 แสดงข้อมูลคิบั ค่าเฉลี่ยพื้นที่ได้ฟัก (การฉีด 2 ฆ่า) ของเซลล์จุลินทรีย์อิสระในอาหาร complete medium ที่เติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในระดับถังหมัก

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	9,432	49,871	9,500	51,873	9,400	51,037
48	9,900	63,000	9,910	63,117	10,000	62,994
72	11,000	81,638	11,121	81,724	11,091	81,439
96	15,237	96,010	14,996	96,424	15,000	95,998
120	10,998	90,879	12,999	93,521	11,540	93,623
144	11,104	81,520	11,009	81,003	11,110	81,101
168	9,913	81,704	10,945	81,112	10,876	81,525

ตารางที่ ค.14 ค่าพื้นที่ได้ฟัก (ตารางที่ ค.13) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานวิตามินบี 12 (ภาพ ข.2) ได้เป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระในอาหาร complete medium ที่เติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	0.4	4.8	0.5	5.0	0.4	4.9
48	0.9	6.2	0.9	6.2	1.0	6.1
72	1.0	8.0	1.0	8.1	1.0	8.0
96	1.5	9.6	1.5	9.6	1.5	9.6
120	1.0	9.1	1.3	9.3	1.1	9.3
144	1.0	8.1	1.0	8.0	1.0	8.0
168	0.9	8.1	1.0	8.1	1.0	8.1

ตารางที่ ค.15 แสดงข้อมูลดิบ ค่าเฉลี่ยพื้นที่ได้ฟัก (การฉีด 2 ซ้ำ) ของเซลล์จุลินทรีย์อิสระใน
น้ำเหลือทิ้งที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงใน
ระดับถังหมัก

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	8,830	77,595	11,970	75,770	8,443	76,378
48	17,934	81,357	15,352	84,946	18,761	83,382
72	19,331	109,746	21,251	108,257	21,322	117,855
96	23,820	131,609	21,553	127,936	21,194	120,171
120	21,941	124,631	21,732	117,261	19,819	124,367
144	21,482	114,947	21,506	100,178	21,150	108,225
168	18,089	100,240	19,911	110,167	19,335	112,930

ตารางที่ ค.16 ค่าพื้นที่ได้ฟัก (ตารางที่ ค.15) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานวิตามินบี 12 (ภาพ ข.2)
ได้เป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ของเซลล์อิสระในน้ำเหลือทิ้งที่เติม
แหล่งอาหาร และเติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	0.9	7.6	1.1	7.5	0.8	7.5
48	1.7	8.1	1.5	8.5	1.8	8.3
72	1.9	11.2	2.0	10.3	2.0	12.3
96	2.2	13.9	2.0	13.5	2.0	12.6
120	2.1	13.0	2.0	12.2	1.9	13.0
144	2.0	11.9	2.0	10.1	2.0	11.1
168	1.8	10.1	1.9	10.8	1.9	11.5

ตารางที่ ค.19 แสดงข้อมูลคืบ ค่าเฉลี่ยพื้นที่ได้พิก (การฉีด 2 ซ้ำ) ของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงใน
น้ำเหลืองที่เติมแหล่งอาหาร และเติม Tween 80 ปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงใน
ระดับถึงหมัก

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	27,910	72,400	18,225	69,576	19,835	71,745
48	33,800	76,538	39,455	76,734	32,120	77,385
72	52,220	93,389	57,685	86,771	55,627	91,467
96	59,557	100,101	61,440	109,644	64,671	99,822
120	52,745	104,610	55,808	102,172	55,989	101,453
144	50,560	99,425	52,122	100,408	42,248	101,239
168	50,175	100,651	49,913	98,626	47,918	99,624

ตารางที่ ค.20 ค่าพื้นที่ได้พิก (ตารางที่ ค.19) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานวิตามินบี 12 (ภาพ ข.2)
ได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของวิตามินบี 12 ของเซลล์ที่ถูกตรึงที่เลี้ยงในน้ำเหลืองที่เติม
แหล่งอาหาร และเติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์

ช.ม.	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์	ภายนอกเซลล์	ภายในเซลล์
24	2.6	7.1	1.7	6.8	1.9	7.0
48	3.2	7.5	3.8	7.5	3.0	7.6
72	5.0	9.2	5.5	8.5	5.3	9.0
96	5.8	10.0	6.0	10.0	6.2	9.9
120	5.0	10.0	5.3	10.0	5.3	10.0
144	4.8	9.9	5.0	10.0	4.9	10.0
168	4.8	10.0	4.9	9.8	4.5	9.9

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายสมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์
วัน เดือน ปีเกิด	8 มีนาคม 2519
ภูมิลำเนา	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ปีการศึกษา 2540
ที่อยู่ปัจจุบัน	36/15 หมู่ 14 ซ. สวนอ้อย ถ. เพชรเกษม 46 อ. ภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10160