สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้

Microbial Limonoate dehydrogenase : Isolation, Purification and Properties

โดย

อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QP
601
0326ร

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 32073
วัน, เดือน, ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้

ลิโมนินเป็นสารที่สำคัญที่ทำให้เกิดรสขมในน้ำผลไม้ประเภทส้ม ที่สามารถกำจัดได้โดยการใช้เอนไซม์ Limonoate dehydrogenase จากการสำรวจหาจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน พบว่าเชื้อ *Rhodococcus* sp. เป็นเชื้อที่มีความสามารถและเมแทบอลิซึมต่อลิโมนินสูงสุด นอกจากนั้นเชื้อดังกล่าวยังสามารถถูกชักนำให้มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนินเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้มีการชักนำ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหารที่มีลิโมนิน ส่วนการแยกเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase โดยการผ่านกระบวนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ไดอะไลซิส อุลตร้าฟิลเตรต และคอลัมน์ DEAD เซลลูโลส จากผลดังกล่าวพบว่า เอนไซม์ Limonoate dehydrogenase มีแอกทิวิตีสูงสุดที่พีเอช และอุณหภูมิ ในช่วง 5 ถึง 8 และ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26 มี.ค. 2547

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้สำเร็จลุล่วงลงได้ ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้งบประมาณสนับสนุนโครงงานวิจัยงบประมาณประจำปี 2540 เรื่องการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ นาย ธนากร สว่างชาติ ที่ได้ช่วยเหลือการทดลองตลอดงานวิจัยนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ได้จัดการ และอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และธุรการระหว่างการทดลอง

ผู้วิจัย

ธันวาคม 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

บทคัดย่อภาษาไทย		I
กิตติกรรมประกาศ		II
บทที่ 1	บทนำ	
	1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
	1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	2
บทที่ 2	ลิโมนิน	
	2.1 ความเป็นมาและโครงสร้างของลิโมนิน	3
	2.2 การแยกและการสกัดลิโมนิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง	9
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	
	3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	15
	3.2 ขั้นตอนการทดลอง	16
บทที่ 4	ผลการวิจัยและวิจารณ์	19
บทที่ 5	สรุปผลและข้อเสนอแนะ	24
ภาคผนวก		25
บรรณานุกรม		28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัญหาในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ตระกูลส้มนั้น คือ การเกิดรสขมในน้ำผลไม้ ซึ่งสามารถกำจัดได้โดยการใช้เอนไซม์ Limonoate dehydrogenase ซึ่งจัดเป็น intracellular enzyme ที่สกัดได้จากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Arthrobacter* sp. และ *Pseudomonase* sp. จากการทดลองพบว่า เอนไซม์นี้สามารถลดปริมาณสารลิโมนินได้จนอยู่ในระดับที่ได้รับการยอมรับภายใน 1 ชั่วโมง และเมื่อใช้เอนไซม์นี้ 200 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตรแล้ว จะสามารถลดปริมาณลิโมนินในน้ำผลไม้ได้จาก 21.3 พีพีเอ็ม ให้เหลือเพียง 3.4 พีพีเอ็ม ซึ่งปริมาณดังกล่าวจะมีค่าต่ำกว่าความขมที่สามารถทดสอบได้ทางประสาทสัมผัส ดังนั้นการศึกษาและการพัฒนาการนำเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase จากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ในอุตสาหกรรมจึงมีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากปัจจุบันการผลิตน้ำผลไม้ตระกูลส้ม จะมีการสูญเสียน้ำผลไม้ไปประมาณร้อยละ 40 ทั้งนี้ เพราะไม่สามารถคั้นน้ำผลไม้ในส่วนนี้ออกให้หมดได้ เนื่องจากน้ำส้มที่อยู่บริเวณผิวส้มนั้นมีรสขม ที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกและแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดิน ที่สามารถผลิตเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase
2. หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase
3. ศึกษาวิธีการแยก และสกัดเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase ที่ผลิตได้
4. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase ที่ผลิตได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase จะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้ในตระกูลส้ม
2. เป็นการลดการสูญเสียของน้ำผลไม้ที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ตรวจเอกสาร
2. คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase
3. ศึกษาวิธีการแยกและสกัดเอนไซม์ Limonoate dehydrogenase
4. ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ลิโมนิน

2.1 ความเป็นมาและโครงสร้างของลิโมนิน

ผลไม้ประเภทส้ม (citrus fruits) ได้แก่ ส้มโอ ส้มหวาน มะนาว เป็นต้น นั้น เมื่อนำมาคั้นน้ำผลไม้ที่คั้นได้มักจะมีรสขมเนื่องจากสารลิโมนิน(limonin) ซึ่งทำให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมในการผลิตน้ำผลไม้เหล่านี้ หรือเมื่อนำไปเป็นส่วนประกอบของอาหารประเภทอื่น เช่น เป็นสารให้รสในน้ำนม แยม สารลิโมนินนี้จัดเป็นสารลิโมนอยด์ที่มีรสขม นอกจากนี้ยังพบสารลิโมนอยด์อื่นๆอีก ทั้งที่มีรสขมและไม่มีรสขม ตัวอย่างเช่น

สารนอมิลิน (nomilin) ถูกแยกได้โดย Emerson (1948)

สารโอบาคิวโนน (obacunone) ถูกแยกได้โดย Emerson (1951)

สารดีอะซีติลนอมิลิน (deacetylnomilin) ถูกแยกได้โดย Dreyer (1965)

สารดีออกซีลิโมนิน (deoxylimonin) ถูกแยกได้โดย Dreyer (1965)

สารไอชานจิน (ichangin) ถูกแยกได้โดย Dreyer (1966)

สารไอโซโอบาคิวโนอิก แอซิด (isoobacunoic acid) สารอิพิไอโซโอบาคิวโนดิก แอซิก (epiisoobacunoic acid) สารนอมิลินิก แอซิค (nomilinic acid) และสารดีอะซีติลนอมิลินิค แอซิค (deacetylnomilinic acid) ถูกแยกได้โดย Bennett (1971) โดยชนิดของสารต่างๆเหล่านี้สามารถแสดงได้ ดังตารางที่ 1

สารในกลุ่มลิโมนอยด์มีโครงสร้างที่แสดงได้ ดังรูปที่ 1 ซึ่งลักษณะทางโครงสร้างหลักของสารในกลุ่มนี้ จะประกอบด้วย วงแหวน 4 วง คือ A B C และ D โดยวง D นี้ อาจจะมีลักษณะที่ปิดหรือเปิดก็ได้ ต่ออยู่กับวงแหวนฟูราน (furan ring)

สารลิโมนินเป็นสารหนึ่งในกลุ่มลิโมนอยด์ เป็นสารเตทตรานอร์ไตรเทอปีนอยด์ (tetranortriterpenoid) มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตไนไทร์ล (acetonitrile) ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (chloroform) หรือละลายในระบบตัวทำละลายผสม ดังรายงานของ James และ Robert (1973) ตามตารางที่ 2 สารลิโมนิน สามารถแยกได้เป็นครั้งแรกโดย Higby (1938) ซึ่งแยกได้จากส่วนของน้ำส้ม ต่อมา Arigoni และคณะ (1960) ได้เสนอโครงสร้างที่สมบูรณ์ของลิโมนิน ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยจะแสดงวงแหวน แกมมา-แลกโตน 2 วง (วง A และ D) และวงแหวนฟูราน (furan) จะเชื่อมต่อกับวงแหวน D ตรงคาร์บอนที่ 17 นอกจากนั้นยังพบหมู่ฟังก์ชันนอลที่มีออกซิเจนเกาะอยู่ตรงคาร์บอนที่ 3 4 7 16 และ 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสังเคราะห์สารที่อยู่ในกลุ่มลิโมนอยด์ ที่เกิดขึ้นภายในต้นพืชตระกูลส้มนั้น จะเกิดขึ้นขณะที่ผลของพืชเจริญเติบโต Datta และ Nicholas (1968) ได้ประยุกต์ใช้งานทางรังสี และไอโซโทปศึกษา และติดตามระบบการสังเคราะห์สารลิโมนอยด์ในเมล็ดส้มพันธ์

ตารางที่ 1 แสดงสารในกลุ่มลิโมนอยด์ที่มีรสขมและไม่ขม

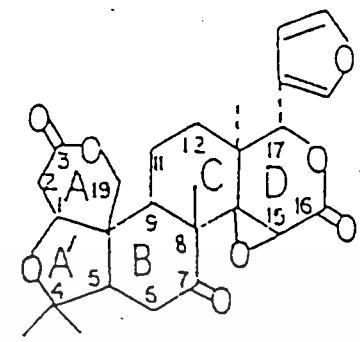
ชื่อสาร	รส	วงแหวนที่เปิด
ลิโมนิน (limonin)	ขม	ปิดทุกวง
ดีออกซีลิโมนิน (deoxylimonin)	ไม่ขม	ปิดทุกวง
โอบาคิวโนน (obacunone)	ไม่ขม	ไม่มีวง A
นอมิลิน (normilin)	ขม	ไม่มีวง A
ไอโซโอบาคิวโนอิก แอซิด (isoobacunoic acid)	ขม	A
ลิโมโนอิก แอซิด (limonic acid)	ไม่ขม	A, D
ลิโมโนอิก แอซิด เอ-ริงแลคโตน (limonic acid A-ring lactone)	ไม่ขม	D
ดีอะซีติลนอมิลิน (deacetylnomilin)	ไม่ขม	ไม่มีวง A
ไอชานจิน (ichangin)	ขม	A'
นอมิลินิก แอซิด (nomilinic acid)	ขม	A'
17-ดีไฮโดรลิโมโนอิก แอซิด-เอ-ริงแลคโตน (17-dehydrolimonoic acid-A-ring lactone)	ไม่ขม	D
ดีออกซีลิโมนิก แอซิด (deoxylimonic acid)	ไม่ขม	ปิดทุกวง
โอบาคิวโนอิก แอซิด (obacunoic acid)	ขม	A'
ลิโมนิลิก แอซิด (limonilic acid)	ไม่ขม	A'
ลิโมนอล (limonal)	ไม่ขม	ปิดทุกวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

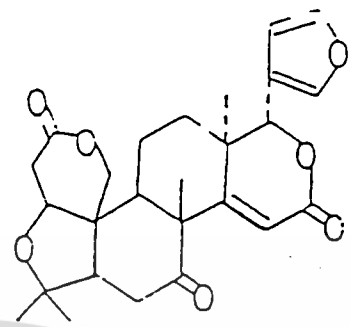
ตารางที่ 2 แสดงระบบของตัวทำละลายผสม ที่ใช้ในการสกัดแยกลิโมนิน

ระบบของตัวทำละลายผสม	สัดส่วนโดยปริมาตร
1. คลอโรฟอร์ม : กรดอะซีติก	98 : 2
2. คลอโรฟอร์ม : กรดอะซีติก	98 : 2
3. เมทิลีนคลอไรด์ : กรดอะซีติก	98 : 2
4. เมทิลีนคลอไรด์ : ไดเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก	185 : 15 : 2
5. คาร์บอนเตทตระคลอไรด์ : อะซีโตน	85 : 15
6. เบนซีน : ไดเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก : เมธานอล	180 : 20 : 2 : 6
7. เบนซีน : เมธานอล : กรดอะซีติก	190 : 5 : 5
8. เบนซีน : เฮกเซน : อะซีโตน : กรดอะซีติก	65 : 22 : 10 : 13
9. เบนซีน : เฮกเซน : อะซีโตน : กรดอะซีติก	65 : 22 : 10 : 3
10. เบนซีน : คลอโรฟอร์ม : ไดเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก	85 : 85 : 30 : 10
11. เบนซีน : คลอโรฟอร์ม : ไอเอธิลอีเทอร์ :	65 : 65 : 65 : 5
12. คลอโรฟอร์ม : ไอเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก	130 : 65 : 2
13. คลอโรฟอร์ม : ไอเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก	130 : 65 : 5
14. คลอโรฟอร์ม : ไอเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก	150 : 50 : 5
15. เบนซีน : ไดเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก : เมธานอล	180 : 20 : 4 : 2
16. เบนซีน : ไดเอธิลอีเทอร์ : กรดอะซีติก	160 : 40 : 9
17. เบนซีน : กรดอะซีติก : เมธานอล	192 : 8 : 2

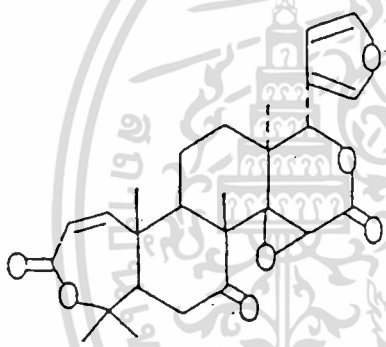
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



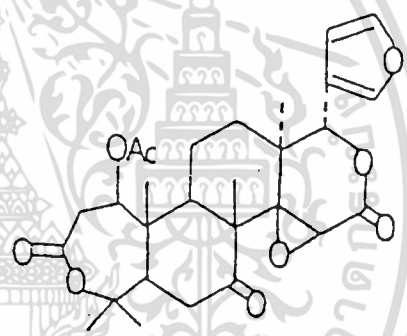
Limonin



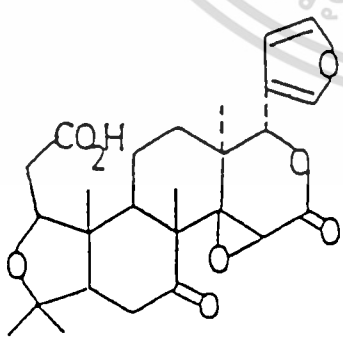
Deoxylimonin



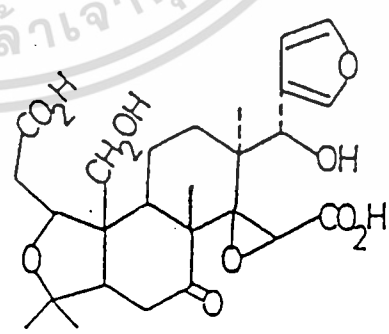
Obacunone



Nomilin



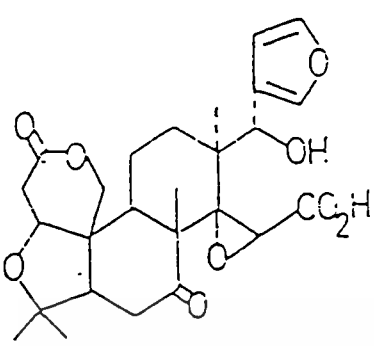
Isoobacunoic Acid



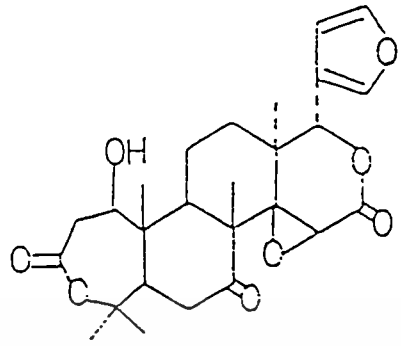
Limonoic Acid

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารในกลุ่มลิโมนอยด์

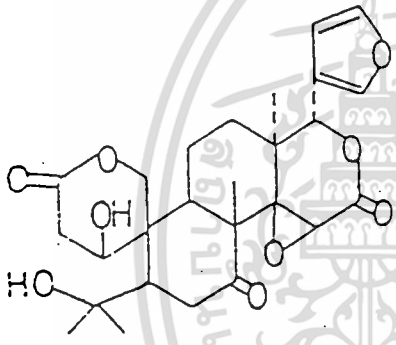
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



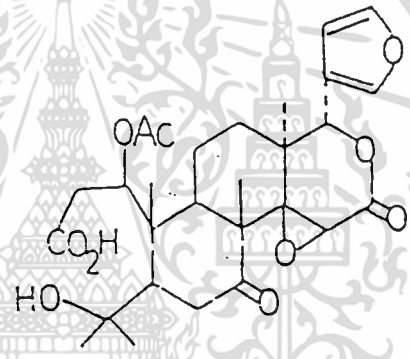
Limonoic Acid A-ring Lactone



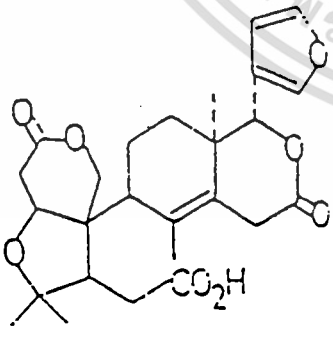
Deacetylnomilin



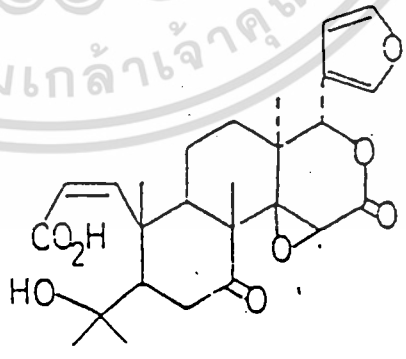
Ichangin



Nomilinic Acid



Deoxylimonic Acid

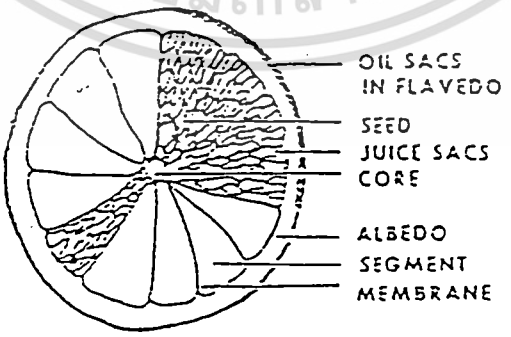


Obacunoic Acid

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารในกลุ่มลิโมนอยด์ (ต่อ)

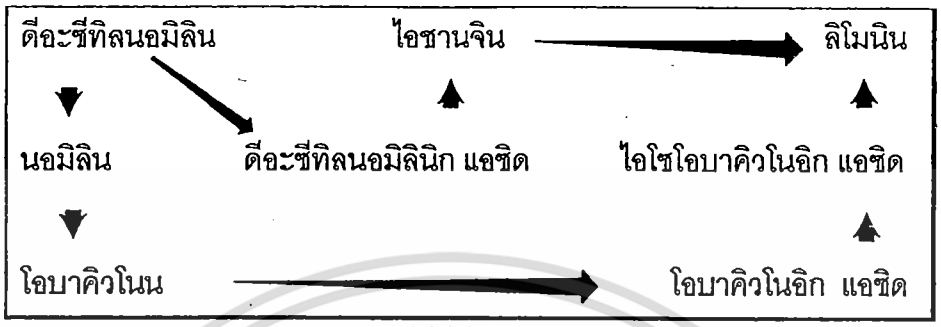
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วาเลนเซีย (valencia) โดยการใช้กรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) เป็นสารติดฉลาก เพื่อติดตามแหล่งกำเนิดของลิโมนิน และลิโมนอยด์อื่นๆที่เกี่ยวข้อง จากการศึกษาทำให้ทราบว่าแหล่งสังเคราะห์หลักของสารในกลุ่มลิโมนอยด์มิใช้เมล็ด กระทั่ง Ksfford และ Chandler (1970) ศึกษาพบว่า สารลิโมนอยด์ที่ปรากฏอยู่ในเมล็ดนั้น จะถูกสังเคราะห์ขึ้นจากเนื้อเยื่ออัลบีโดของพืชที่แสดงตำแหน่งดังรูปที่ 2 โดยก่อนหน้านี้ Dreyer (1965, 1968) ได้เสนอวิถีทางการเกิดลิโมนินตามแผนผังในรูปที่ 3 ซึ่งในรูปที่ 3 นี้ จะเห็นว่าวิถีทางหลัก จะเริ่มจาก ดีอะซีทิลนอมิลินนอมิลิน โบาคิวโนน โอบาคิวโนอิก แอซิด ไอโซโอบาคิวดนอิก แอซิด และลิโมนิน Kefford และ Chandler(1970) ยังพบว่าลิโมนินยังสามารถเกิดจากอีกวิธีทางหนึ่ง คือ จากดีอะซีทิลนอมิลินดีอะซีทิลนอมิลิกนิก แอซิด ไอชานจิน แต่เกิดได้ค่อนข้างต่ำ โครงสร้างของลิโมนินที่ปรากฏ ในเนื้อเยื่อผลไม้พวกส้ม จะมีลักษณะที่แตกต่างจากลิโมนินตามปกติในเมล็ด โดยวงแหวน A ของลิโมนิน จะเปิดออกเรียกว่า ลิโมโนเอท เอ ริง แลคโตน (limonoate A ring lactone) นอกจากนี้ Maier และ Margileth (1969) ยังรายงานเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนกลับไปมา ระหว่างลิโมนิน และลิโมโนเอท เอ ริง แลคโตน ว่าสามารถเกิดขึ้นได้ โดยการทำงานของเอนไซม์ลิโมนิน ดี ริง แลคโตน ไฮโดรเลส (limonin D-ring lactone hydrolase) ลิโมโนเอท เอ ริงแลคโตน เป็นเกลือ ที่เสถียรของลิโมโนอิก แอซิด เอ ริง แลคโตน (limonic acid A ring lactone) โดยทั่วไปลิโมโนอิก แอซิด เอ ริง แลคโตน เป็นสารที่ไม่มีรสขม และสามารถเปลี่ยนไปเป็นลิโมนินได้ โดยการไฮโดรไลซ์ของเอนไซม์ ลิโมนิน ดี ริง แลคโตน ไฮโดรเลส ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้ จะพบอยู่มากในเมล็ด นอกจากนี้สภาวะที่ทำให้ลิโมโนอิก แอซิด เอ ริง แลคโตน เปลี่ยนไปเป็นลิโมนินได้อีก เช่น-ในสภาพที่เป็นกรดของน้ำผลไม้ การคั้นและการเกิดเกล็ดน้ำแข็งจากการแช่เย็น จะทำให้เนื้อเยื่อได้รับความเสียหาย



รูปที่ 2 แสดงภาพตัดขวางของผลไม้ตระกูลส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงวิถีทางการเกิดลิโมนินในส้ม

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อปริมาณลิโมนิน ได้แก่ สายพันธุ์ของผลไม้ตระกูลส้ม ปริมาณของธาตุไนโตรเจน โปตัสเซียมและฟอสฟอรัสในแหล่งที่ปลูก รวมถึงฤดูการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาผลไม้ โดยพบว่าปุ๋ยที่มีสัดส่วนของไนโตรเจนและโปตัสเซียมที่มาก จะมีผลทำให้ปริมาณลิโมนินลดลง และการสะสมของลิโมนินนั้น จะมีอยู่มากในช่วงต้นฤดู และจะมีปริมาณที่ลดลงในช่วงปลายฤดู ส่วนปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องต่อปริมาณลิโมนินในกระบวนการแปรรูปน้ำผลไม้ ได้แก่ วิธีการคั้นน้ำจากผล ซึ่งการบีบคั้นอย่างแรงจะมีผลทำให้เกิดการเร่งการเปลี่ยนลิโมนิกแอซิด เอ ริง แลคโตน ไปเป็นลิโมนิน ตามที่ Maier และ Margileth ได้รายงานไว้

2.2- การแยกและการสกัดลิโมนิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

วิธีการที่เหมาะสมในการแยกสารในกลุ่มลิโมนอยด์นั้น คือ โครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง Basker และคณะ ได้รายงานการใช้โครมาโตกราฟฟีแบบกาซในการแยกสารลิโมนิน โดยในขั้นตอนการเปลี่ยนลิโมนินให้เป็นกรดลิโมโนอิก และเปลี่ยนต่อไปเป็นโครงสร้าง ดีริง โมโนแลคโตนที่สามารถแยกออกมา ได้แนวทางในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารลิโมโนนินนั้น จะต้องมีการสกัดลิโมนินจากตัวอย่างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อย่างคลอโรฟอร์มเสียก่อน เนื่องจากสารลิโมนินเป็นสารที่มีโมเลกุลที่มีขั้วน้อยกว่าสารอื่นที่อยู่ปนกันอย่างเช่น น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chandler และ Kefford (1966) ได้สกัดลิโมนินด้วย คลอโรฟอร์ม และได้ลิโมนินที่อยู่ในรูปของอนุพันธ์ ไดไนโตรฟีนิลไฮดราโซน (dinitrophenylhydrazone derivative) แล้วทำการแยกสารต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบแผ่นบาง และวัดปริมาณลิโมนินที่แยกได้ด้วยการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต แต่หากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ไม่ใช่น้ำ เช่น เป็นเปลือกของผล ในกรณีเช่นนี้ต้องมีการสกัดแยกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ก่อน เป็นเวลา 2 วัน ตามวิธีของ Chandler และ Hefford

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณลิโมนินของส้มพันธุ์ต่างๆ ตามแหล่งที่เพาะปลูกและระยะเวลาเก็บเกี่ยว

Type of Juice	Growing Region	Juice Source	Variables Studied or Samples Tested	Limonin Content (ppm)
Grapefruit				
Marsh	Arizona	Laboratory	Jan.-June	9-3
Marsh	California	Laboratory	Avg of 4 samples	4
Marsh	California	Laboratory	Late-season	2.2
Duncan	Florida	Pilot plant	1 sample	2
Canned	Florida	Commercial	3 samples	12, 12, 16
Canned	Florida	Commercial	17 samples	16-2
Reconstituted concentrate	California	Commercial	1 sample	9.5
Reconstituted concentrate	California	Commercial	2 samples	14, 15
Lemon				
Eureka	California	Laboratory	Avg of 4 samples	6
Meyer	Florida	Laboratory	1 sample	2
Reconstituted concentrate	Arizona-California	Commercial	5 samples	2.9, 3.7, 4.2, 6.0, 11
Reconstituted concentrate	Florida	Commercial	1 sample	2
Lime				
Key	Florida	Laboratory	1 sample	6
Persian	Florida	Laboratory	1 sample	1
Natsudaidai	Japan	Laboratory	Feb., Mar., Apr.	65, 48, 30
Orange				
Hamlin	Texas	Laboratory	Sept.-Jan.	6.6-2.0
Marrs	Texas	Laboratory	Sept.-Jan.	5.4-1.5
Murcott	Florida	Laboratory	Rootstock and Local	9.4-19
Navel	Australia	Laboratory	Own rootstock	7.5
Navel	Australia	Laboratory	Trifoliate orange rootstock	8.0
Navel	Australia	Laboratory	Sweet orange rootstock	11
Navel	Australia	Laboratory	Rough lemon rootstock	17
Navel	California	Laboratory	Dec.-March	25, 24, 12, 6
Page	Florida	Laboratory	2 seasons	2, 1
Satsuma	Florida	Laboratory	1 season	0
Temple	Florida	Laboratory	3 seasons	3, 3, 4
Valencia	California	Laboratory	Early-season	2.3
Hamlin	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	1.5-5.5
Hamlin	Florida	Pilot plant	1 sample	2.0
Navel	Florida	Pilot plant	1 sample	4.0
Navel	Australia	Pilot plant	4 samples	8, 10, 18, 21
Parson Brown	Florida	Pilot plant	1 sample	1.5
Pineapple	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	<1-38
Valencia, early	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	<1-5
Valencia, late	Florida	Pilot plant	Low and high extraction pressures	<1-7
Valencia	Florida	Pilot plant	1 sample	2.0
Canned	U.S.	Commercial	Dec.-Feb.	6, 2, 2
Canned	U.S.	Commercial	Dec.-Feb.	2, 2, 2
Chilled	Florida	Commercial	4 samples	3, 4, 5, 5
Navel	Arizona-California	Commercial	Dec.-Apr.	42-2.3
Navel, Reconstituted concentrate	Arizona-California	Commercial	Dec.-Apr.	35-6.1
Navel, Reconstituted concentrate	California	Commercial	2 samples	9.4, 11
Shamouti, Reconstituted concentrate	Israel	Commercial	Dec.-Mar.	25->2
Valencia, Reconstituted concentrate	California	Commercial	1 sample	4.6
Tangelo				
Minneola	Florida	Laboratory	1 season	2
Nova	Florida	Laboratory	2 seasons	0.4
Orlando	Florida	Laboratory	2 seasons	0.0

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wilson และ Crutchfield (1968) ได้รายงานขั้นตอนการวิเคราะห์ลิโมนิน ด้วยการเริ่มจากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และแยกสารด้วยอลูมินาคลอลัมน์ต่อจากนั้นจึงนำมาสกัดต่อด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และอะซีโตไนไตร์ล ซึ่งจะทำให้ลิโมนินถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ของกรดไฮดรอซามิก จากนั้นเติมเฟอริก ไอออน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดจากสีของสารประกอบเชิงซ้อน ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร โดยพบว่าการเกิดสีดังกล่าวเป็นคุณสมบัติทางกายภาพจำเพาะของแลคโตน และเอสเทอร์ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนั่นเอง ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมเฉพาะการตรวจวัดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มเท่านั้น เนื่องจากหากเป็นสารตัวอย่างอื่น อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้จากการรบกวนของสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถให้สีได้อย่างเดียวกับสารจำพวกแลคโตนและเอสเทอร์ได้

Kruger และ Colter ได้พัฒนาวิธีการทางโครมาโตรกราฟฟีสำหรับหาปริมาณลิโมนินขึ้นมา โดยหลังจากการสกัดลิโมนินจากสารตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม และทำให้เกิดการแยกชั้นโดยการเติมเฮกเซนและอะซิโตรไนไตร์ลลงไปแล้วนั้น จะนำสารที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีกาซโครมาโตกราฟฟี ที่มีคอลัมน์เป็น SE-30 ที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส โดยวิธีดังกล่าวจะสามารถวิเคราะห์ปริมาณลิโมนินได้ต่ำสุดเป็น 0.25 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

Fisher (1975) ได้อธิบายถึงวิธีการโครมาโตรกราฟฟีสมรรถนะสูง สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนิน โดยการสกัดลิโมนินจากสารตัวอย่างด้วยคลอโรฟอร์ม และนำส่วนใสหรือส่วนของคลอโรฟอร์ม มาวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ C18 และใช้ คลอโรฟอร์มต่ออะซีโตไนไตร์ล อัตราส่วนเป็น 95 ต่อ 5 เป็นสารละลายตัวพา และตรวจวัดปริมาณลิโมนินที่ถูกแยกได้ด้วยรีแฟรกโตมิเตอร์

Oaaki และคณะ (1990) ได้ใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีสมรรถนะสูง หาปริมาณลิโมนินและลิโมนอยด์อื่นๆ ที่มีอยู่ในเมล็ดของผลไม้ตระกูลส้มอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

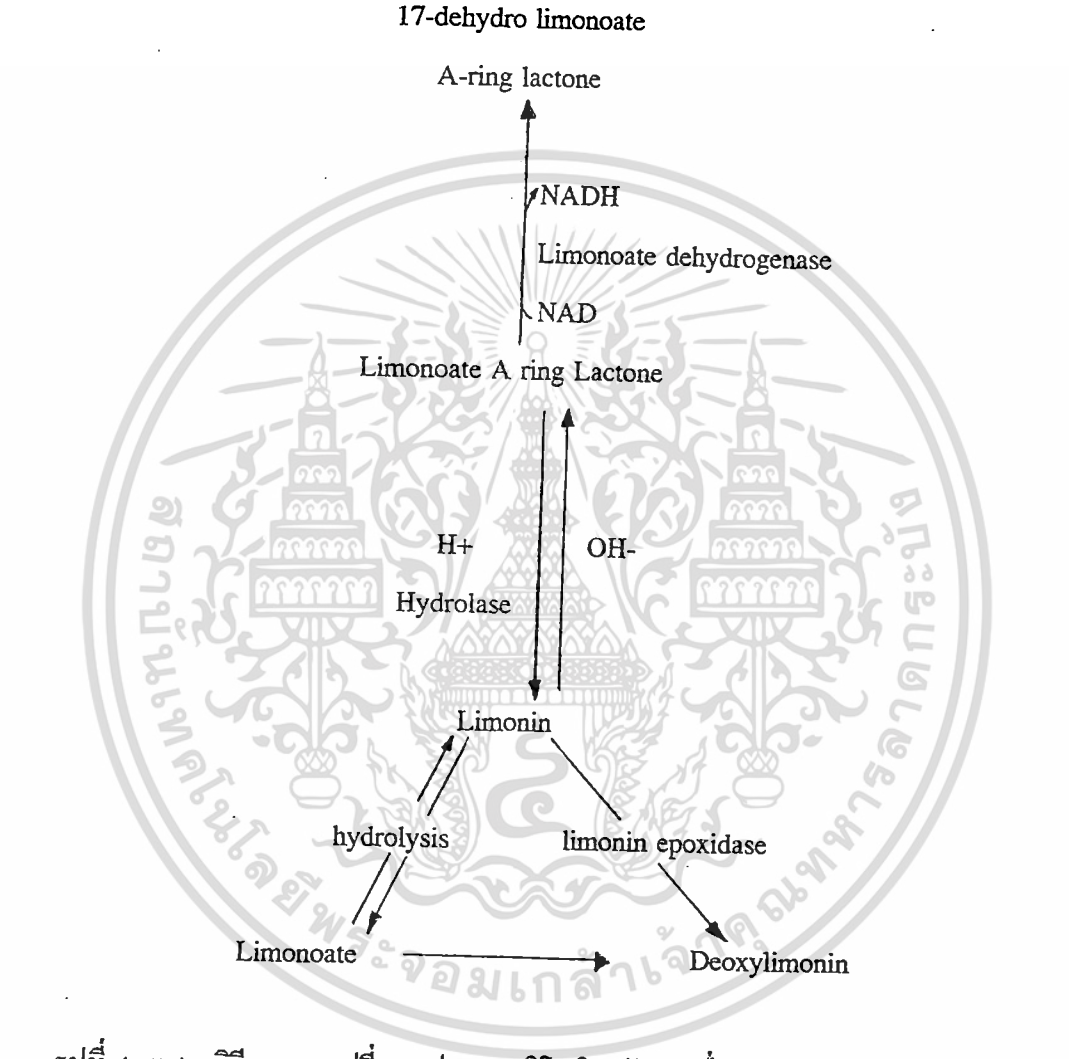
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณลิโมนินและลิโมนอยด์อื่นๆ ที่พบในเมล็ดของส้ม

ชนิดของส้ม	ลิโมนิน	นอมิลิน	โอบาคิวโนน	ไอชานจิน	ดีอะซีติลนอมิลิน	รวม
Fukuhara	9.77	3.88	0.37	น้อยมาก	2.14	15.92
Hyuganatsu	4.68	3.73	0.28	น้อยมาก	0.35	9.04
Sanbokan	3.95	1.02	0.38	0.16	1.36	6.79
Shimamikan	7.85	2.01	0.28	0.16	2.01	12.31
Grapefruit	19.06	1.84	1.86	น้อยมาก	1.10	23.86
Lemon	8.95	3.03	0.58	น้อยมาก	น้อยมาก	12.56
Valencia	10.00	2.30	0.08	1.16	1.24	14.78
Tangerine	4.10	1.37	0.35	0.38	3.11	9.31

การลดปริมาณลิโมนินโดยการใช้เอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส (limonoate dehydrogenase) ที่ Hasegawa และคณะ(1972) ซึ่งแยกได้จากเชื้อ *Arthrobacter globiformis* โดยเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนสดังกล่าวนี้ จะทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เหมาะสม คือ 9.5 ซึ่งเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส จะเร่งปฏิกิริยาที่มีลิโมนอยด์เป็นสับสเตรตโดยลิโมนอยด์นี้ จะต้องประกอบด้วยวงแหวนฟูราน หมู่อีพอกไซด์ และวงแหวน D ในลักษณะเปิด จากลักษณะของสับสเตรตแบบนี้ จึงทำให้สามารถเปลี่ยนลิโมนินไปเป็นสารอื่นที่ไม่ขมได้ นอกจากนี้ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส ยังสามารถเปลี่ยนลิโมโนเอท เอ ริง แลคโตน ไปเป็น 17 ดีไฮโดรลิโมโนเอท หรือ 17 ดีไฮโดรลิโมโนเอท เอ ริง แลคโตน ซึ่งเป็นสารที่ไม่ขมได้ คุณสมบัติอีกประการหนึ่งของเอนไซม์นี้ คือ ต้องการหมู่ SH และ Zn^{+2} เป็นโคแฟกเตอร์ และอาศัย NAD เป็นตัวรับไฮโดรเจน สำหรับเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส ที่ Hasegawa และคณะ (1974) แยกได้จากเชื้อ *Pseudomonas* sp. นั้น จะแตกต่างจากที่แยกได้จากเชื้อ *Arthrobacter globiformis* ในลักษณะที่สามารถทำงานในช่วง pH ที่กว้างกว่า มีความเสถียรที่พีเอชที่ต่ำกว่า มีโคแฟกเตอร์ได้ทั้งที่เป็น NAD และ NADP นอกจากนี้ยังมีวิถีการเปลี่ยนแปลงหลักในการทำให้ลิโมนินเปลี่ยนไปเป็นดีออกซลิโมนิน มากกว่าที่จะเปลี่ยนไปเป็น 17 ดีไฮโดรลิโมโนเอท เอ ริง แลคโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีทางการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างสารในกลุ่มลิโมนอยด์ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับลิโมนินนั้น สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงวิถีทางการเปลี่ยนแปลงของลิโมนิน กับสารอื่นในกลุ่มลิโมนอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับจุลินทรีย์อื่นที่ได้ถูกนำมาศึกษาถึงประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนิน ได้แก่ *Acetobactor* sp. *Corynebacterium fascians* ซึ่งการนำแบคทีเรียมาใช้ในบางครั้งต้องมีสารลิโมนอยด์เป็นสารชักนำให้แบคทีเรียเหล่านี้ สร้างเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส ขึ้นมาก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

เครื่องไฮเปอฟอร์มันซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ รุ่น C-R 6A ของ Shimasu

เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น 8620 ของ Unicam

เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น ZK 380 ของ Chermle

เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A-200S ของ Satorious

ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น Bio 48 ของ Faster

เครื่องระเหยแบบลดความดัน ของ Scientific Industries

เครื่องเขย่า

สารเคมี

น้ำส้มคั้นจากกากส้มสด

เมล็ดส้มใช้สกัดลิโมนิน

ลิโมนิน ของ Sigma Chemical Co.,Ltd

กลูโคส ของ Fluka Co., Ltd

ซูโครส ของ Fluka Co., Ltd

ฟรุคโตส ของ BDH Chemical Co.,Ltd

คลอโรฟอร์ม ของ Baker Chemical Co.,Ltd

ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ของ Baker Chemical Co.,Ltd

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ของ Fluka Co ., Ltd

แมกนีเซียม ซัลเฟต ของ Fluka Co., Ltd

โซเดียมคลอไรด์ ของ Fluka Co., Ltd

เฟอริกคลอไรด์ ของ Fluka Co., Ltd

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

ก.การสกัดสารลิโมนินจากเมล็ดส้ม

1. แยกเมล็ดส้มจากผลส้ม นำไปล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นลอกเอาส่วนที่เป็นเปลือกหุ้มออก ชั่งน้ำหนักของเมล็ดส้มที่จะใช้ โดยให้อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งของเมล็ดส้มต่อปริมาตรของอาหารเหลวที่ต้องการเตรียมเป็น 10 กรัม ต่อลิตร 1 ลิตร แล้วบดเมล็ดส้มนั้นให้ละเอียด
2. ละลายเอาเมล็ดส้มที่บดแล้วในน้ำกลั่น โดยอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักแห้งของเมล็ดส้มต่อปริมาตรของน้ำกลั่นเป็น 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปกรองผ่านเซลลูโลสอะซิเตท
3. นำส่วนใสที่กรองได้มาผสมกับคลอโรฟอร์มเกรดวิเคราะห์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ในหลอดทดลอง นำไปปั่นเป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงแยกเอาเฉพาะชั้นของคลอโรฟอร์มมาเก็บไว้ในขวดก้นกลมขนาด 100 มิลลิลิตร นำไประเหยคลอโรฟอร์มให้หมดโดยระเหยภายใต้สภาพสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สารที่ตกค้างอยู่จะนำไปใช้เป็นสารชักนำให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์

ข. การเตรียมสารอาหารลิโมนิน

1. เตรียมสารละลายเกลือ (ตามภาคผนวก ก) แล้วนำไปผสมกับสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.01
2. เติมสารละลายเกลือจากข้อ 1 ลงในขวดก้นกลมที่สกัดสารลิโมนินได้ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของสารละลายเกลือ ต่อน้ำหนักแห้งของเมล็ดส้มที่สกัดได้ เป็น 1 ลิตร ต่อ 10 กรัม แล้ว นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ค. การเตรียมอาหารวุ้นเอียงลิโมนิน และอาหารแข็งลิโมนินในจานเพาะเลี้ยง

1. เตรียมสารอาหารลิโมนิน ตามข้อ ข. แต่จะมีการเติมวุ้นผงลงไปในปริมาณร้อยละ 1.5 ก่อนแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที
2. ในกรณีที่เป็นการเตรียมวุ้นเอียง ให้แบ่งเทอาหารลิโมนินจากข้อ 1 ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ หลอดละ 1 ใน 3 แล้ววางหลอดในลักษณะเอียง รอให้อาหารแข็ง

ง. การแยกคัดเชื้อจุลินทรีย์จากดิน ที่สามารถเจริญในอาหารลิโมนิน

1. ใช้ตัวอย่างดินจากสวนส้ม จำนวน 5 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลวลิโมนิน 100 มิลลิลิตร ในขวดชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 150 รอบต่อนาที หลังจากนั้น 5 วัน ให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ โดยในแต่ละครั้งของการถ่ายเชื้อมาใส่ลงในอาหารใหม่ ในปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในอาหาร 100 มิลลิลิตร การถ่ายเชื้อในลักษณะดังกล่าวนี้ จะทำทั้งหมด 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2. ทำการเจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นเป็น 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ตามลำดับ เพื่อเกลี่ยเชื้อแต่ละระดับความเจือจาง ลงในอาหารแข็งลิโมนินในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของโคโลนีในแต่ละจานเพาะเลี้ยง
3. คัดเลือกจานที่มีจำนวนโคโลนีขึ้น 20-30 โคโลนี แล้วแยกเชื้อในแต่ละโคโลนีขึ้นมา เก็บไว้ในอาหารวุ้นเอียงลิโมนิน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาเชื้อที่เจริญได้ไว้ในตู้เย็น

จ. การสร้างกราฟการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และกราฟแอกทิวิตีของเชื้อจุลินทรีย์

1. เตรียมอาหารเหลวลิโมนิน จำนวน 100 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการวัดปริมาณลิโมนินเริ่มต้น จากนั้นเติมเชื้อจุลินทรีย์ ลงไปแล้ววัดปริมาณเชื้อเริ่มต้น ต่อจากนั้นนำไปเลี้ยงโดยการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง
2. วัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (ค่าการดูดกลืนแสง) และปริมาณลิโมนิน ทุกชั่วโมง
3. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (ค่าการดูดกลืนแสง) ที่เวลาต่างๆ
4. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าปริมาณลิโมนินต่อเซลล์ ที่เวลาต่างๆ

ฉ. การหาปริมาณลิโมนิน ด้วย High Performance Liquid Chromatography ตามวิธีของ Rouseff and Fisher (1980)

1. สกัดลิโมนินจากตัวอย่างน้ำส้ม 1 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นระเหยเอาคลอโรฟอร์มด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
2. เติมคลอโรฟอร์มลงไป 200 ไมโครลิตร ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ในไทร์ลขนาด 5 ไมครอน ขนาด 4.5x 250 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการไหลเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และมีสารละลายตัวพาเป็นส่วนผสมระหว่าง ไอโซโพรพานอล ต่อเฮปเทนต่อเมทานอล เป็น 12 ต่อ 11 ต่อ 2 โดยปริมาตร และตรวจวิเคราะห์ปริมาณที่ได้ด้วยยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 207 นาโนเมตร

ช. การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส ด้วย High Performance Liquid Chromatography

1. นำตัวอย่างน้ำส้ม 2 มิลลิลิตร ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนใสของน้ำส้มมากรองผ่านเยื่อเซลลูโลสอะซิเตท
2. ระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ ประกอบด้วยคอลัมน์ CLC-NH_2 ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนระบบของสารละลายตัวพา คือ อะซีโตไนไทร์ลร้อยละ 77.44 และใช้อาร์ไอดีเทคเตอร์ในการวิเคราะห์ปริมาณที่ได้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

32073

ช. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้ *Rhodococcus* sp มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน

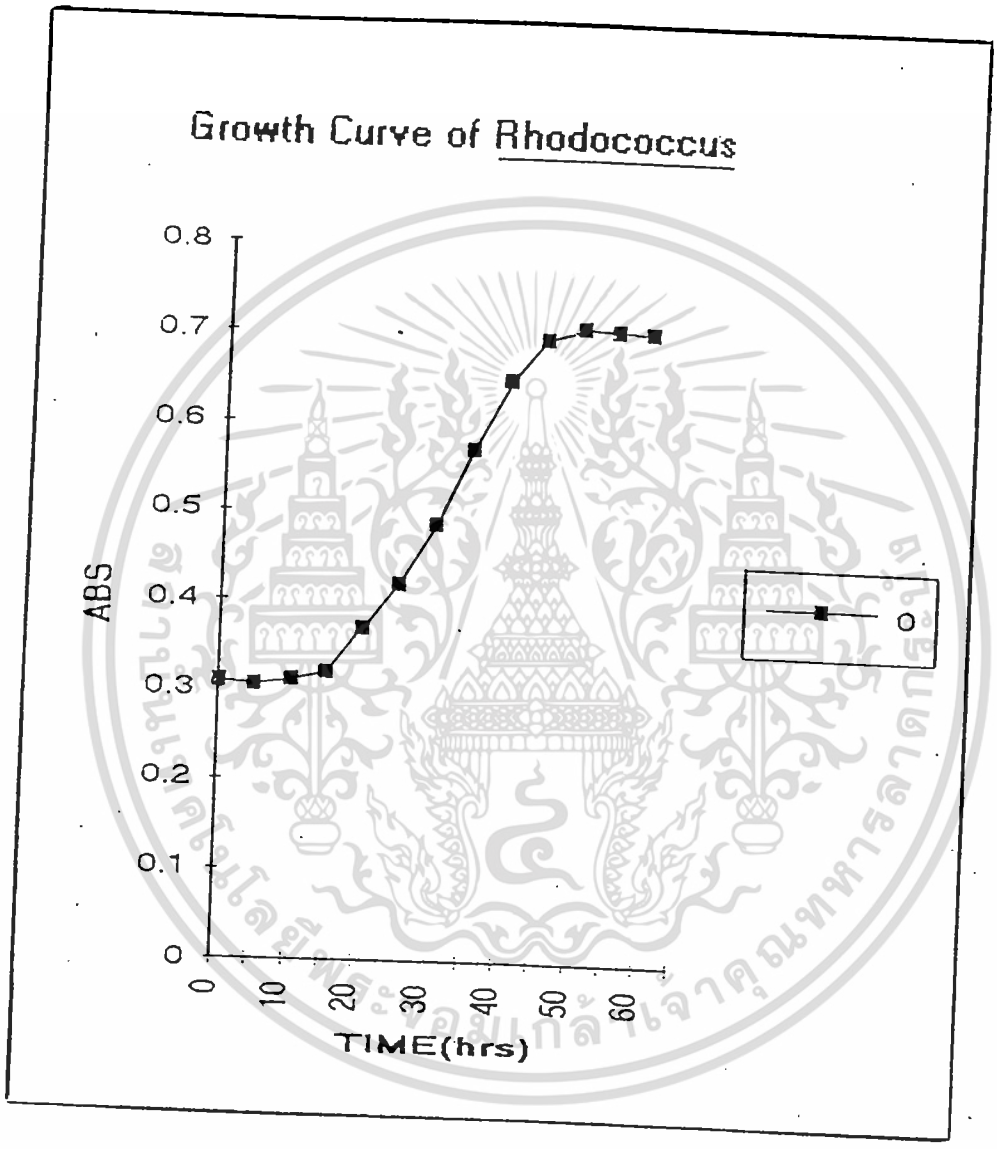
1. เลี้ยงและเก็บเกี่ยวเซลล์จุลินทรีย์จากอาหารเหลวฟรุกโตส ตามภาคผนวกก2 แล้ว นำจุลินทรีย์มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวลิโมนิน ตามภาคผนวก ก3 เป็นระยะเวลาต่างๆกัน ได้แก่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกจากอาหารลิโมนิน ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้เซลล์ 1.0 กรัม (น้ำหนักเปียก) ทำปฏิกิริยากับนำส้มที่มี พีเอชเป็น 4.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้ววัดกิจกรรมของจุลินทรีย์ ที่ผ่านการชักนำให้มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนินที่ระยะเวลาต่างๆกันดังกล่าว

ฌ. การสกัดและแยกเอนไซม์ ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส จากเชื้อ *Rhodococcus* sp

1. นำเซลล์ที่ได้จากข้อ ซ มาบดให้เซลล์แตกในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 โดยรักษาอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะเก็บสารละลายส่วนในไว้
2. นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต และเก็บส่วนตะกอนที่ได้หลังจากนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 รอบต่อนาที
3. นำตะกอนดังกล่าวมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 แล้วไดอะไลซีส ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 7
4. สารละลายที่ได้จากการไดอะไลซิส จะทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอุลตร้าฟิลเตรตชันก่อน นำไปแยกด้วยคอลัมน์ DEAE เซลลูโลส ที่มีสารละลายทรีสบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ เป็นสารละลายสำหรับชะ เก็บของเหลวที่แยกได้จากคอลัมน์ โดยแบ่งเก็บใส่หลอดทดลองละ 4 มิลลิลิตร และนำแต่ละหลอดไปหากิจกรรมของเอนไซม์

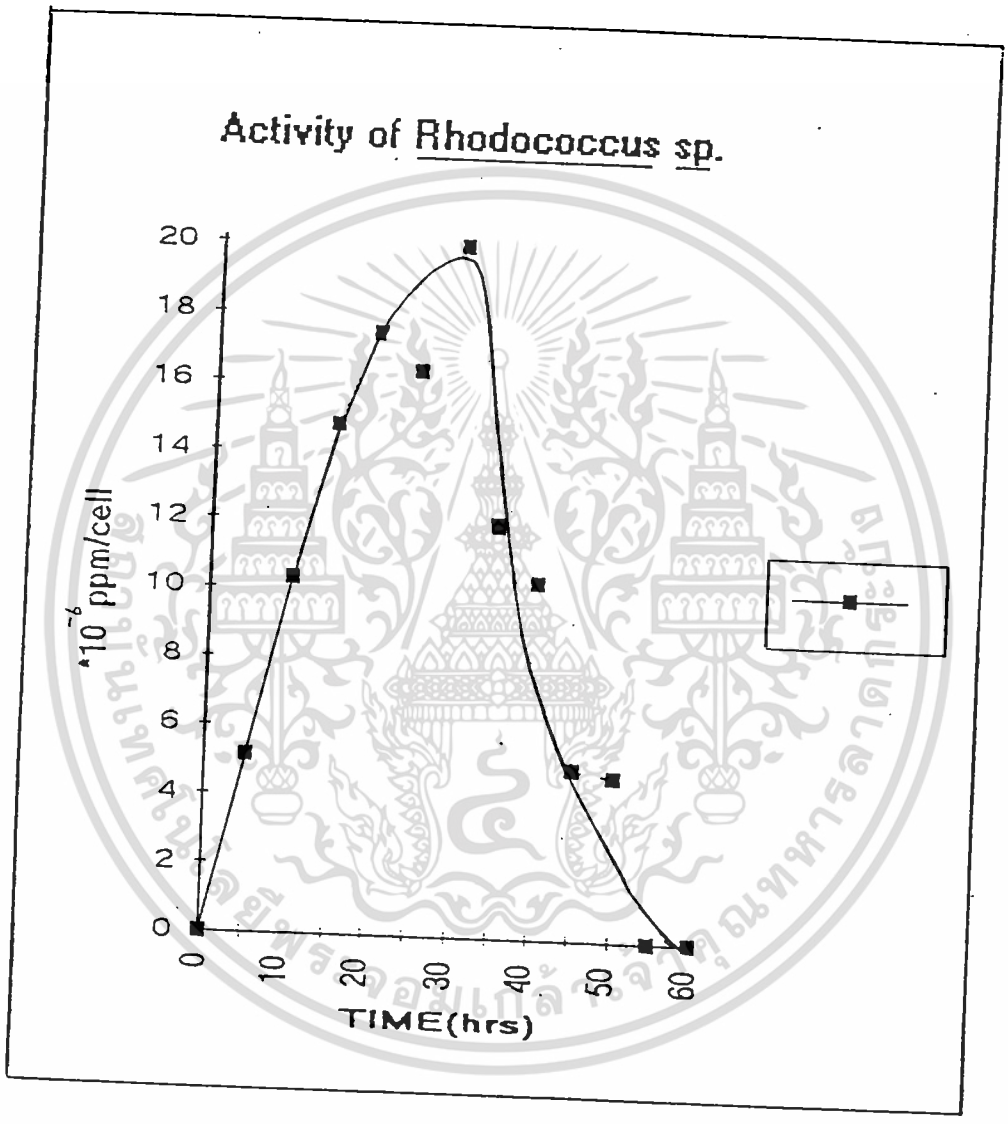
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาในการลดลงของลิโมนินเป็น 0.169 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที



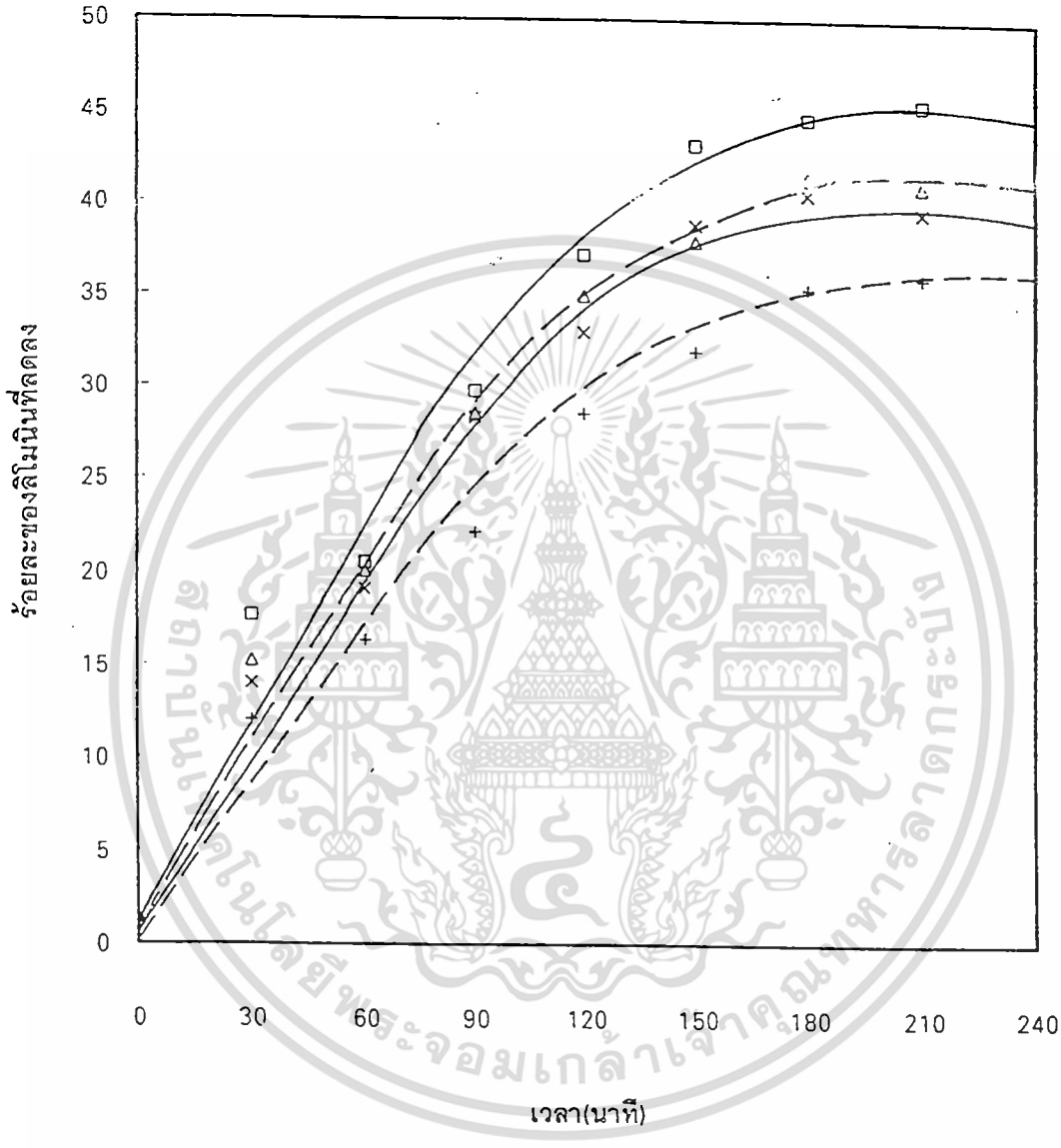
รูปที่ 5 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *Rhodococcus sp* โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แสดงแอกทิวิตีของ *Rhodococcus sp*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงกิจกรรมของเซลล์ *Rhodococcus* sp ที่ผ่านการชักนำ ในอาหารลิโมนิน ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ ไม่ผ่านการชักนำ (+) 2 ชั่วโมง (x) 4 ชั่วโมง (Δ) และ 6 ชั่วโมง (□)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การสกัดและแยกเอนไซม์ ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส จากเชื้อ *Rhodococcus* sp

ลักษณะของเอนไซม์ ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme) ในการทดลองนี้จึงต้องนำเซลล์ *Rhodococcus* sp ที่เลี้ยงได้มาแยกและบดให้เซลล์แตกก่อน และแยกเอนไซม์ที่ได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และจึงนำสารมาไดอะไลซีส เพื่อกำจัดเอาแอมโมเนียมซัลเฟตออกก่อน แล้วจึงนำเอาสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยผ่านอุลตร้าฟิลเตรตก่อนที่จะแยกเอนไซม์นี้ด้วยคอลัมน์ DEAE เซลลูโลส สารละลายที่แยกได้จากคอลัมน์ จะนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยลักษณะของเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนสนั้น จะสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นลิโมนิน ไปเป็น 17- ดีไฮโดรลิโมโนเอท วงแหวนแลคโตนเอ (17-dehydro limonoate A- ring lactone) ดังนั้นปริมาณลิโมนินที่ลดลง จึงแสดงถึงแอกทิวิตีของเอนไซม์ดังกล่าว จากการทดลองที่ได้พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส จะอยู่ในช่วง 5 ถึง 8 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นจะอยู่ในช่วง 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

1. การดัดแปลงวิธีการเตรียมอาหารลิโมนิน สามารถเตรียมได้โดยการใช้คลอโรฟอร์มเกรดวิเคราะห์เป็นตัวทำละลาย และเลือกเอาเมล็ดส้มเป็นวัตถุดิบในการสกัด เนื่องจากเป็นแหล่งที่สะสมลิโมนินมากกว่าส่วนอื่นๆของพืชตระกูลส้ม ในการสกัดนี้อาจได้สารลิโมนอยด์อื่นที่สามารถละลายได้ในคลอโรฟอร์มเช่นกัน แต่ในระบบการสกัดดังกล่าวพบว่าให้ผลในการสกัดลิโมนินได้มากกว่าสารลิโมนอยด์อื่น และวิธีการสกัดดังกล่าวก็สะดวกที่จะนำมาใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลิโมนินเป็นองค์ประกอบ ในระดับปริมาตรที่มากกว่า 500 มิลลิลิตร ซึ่งพบว่ามีปริมาณลิโมนินที่ถูกสกัดได้ 50-150 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งเพียงพอที่จะนำมาใช้ได้
2. เนื่องจากวิธีการแยกเอนไซม์ Limonoate dehydrogrnase ที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้ เป็นเพียงการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงบ้างส่วนเท่านั้น ถ้าต้องการทำเอนไซม์ที่ได้มาศึกษาทางด้านจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ ควรทำให้เอนไซม์นี้มีความบริสุทธิ์มากกว่านี้
3. การนำเอาเอนไซม์ Limonoate dehydrogrnase มาใช้งาน ควรได้ศึกษาการใช้งานในรูปของการตรึงเอนไซม์ด้วย ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในส่วนของเอนไซม์ และยังเป็นการเพิ่มความเสถียรในการทำงานของเอนไซม์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารละลายเกลือ

ชั่งสารเคมีต่างๆ ตามที่กำหนดต่อไปนี้ แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายให้ได้ 1 ลิตร

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต	0.02	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต	0.15	กรัม
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรท	2.00	กรัม
โซเดียมฟอสเฟตแอนไฮดรัส	1.50	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรท	0.60	กรัม
โซเดียมไนเตรท	3.80	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟต	0.30	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต	0.054	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดท	0.024	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟต	0.050	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.0025	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรท	0.0055	มิลลิกรัม
กรดบอริก	0.057	มิลลิลิตร

2. อาหารวุ้นสำหรับเลี้ยง *Rhodococcus* sp (ต่อปริมาตร 1 ลิตร)

สูตรอาหาร Brain Heart Infusion Agar ประกอบด้วย

Calf Brains, Infusion form	200	กรัม
Beef Heart, Infusion form	250	กรัม
Bacto Peptone	10	กรัม
Bacto Dextrose	2	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม

ปรับค่าพีเอชเป็น 7.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

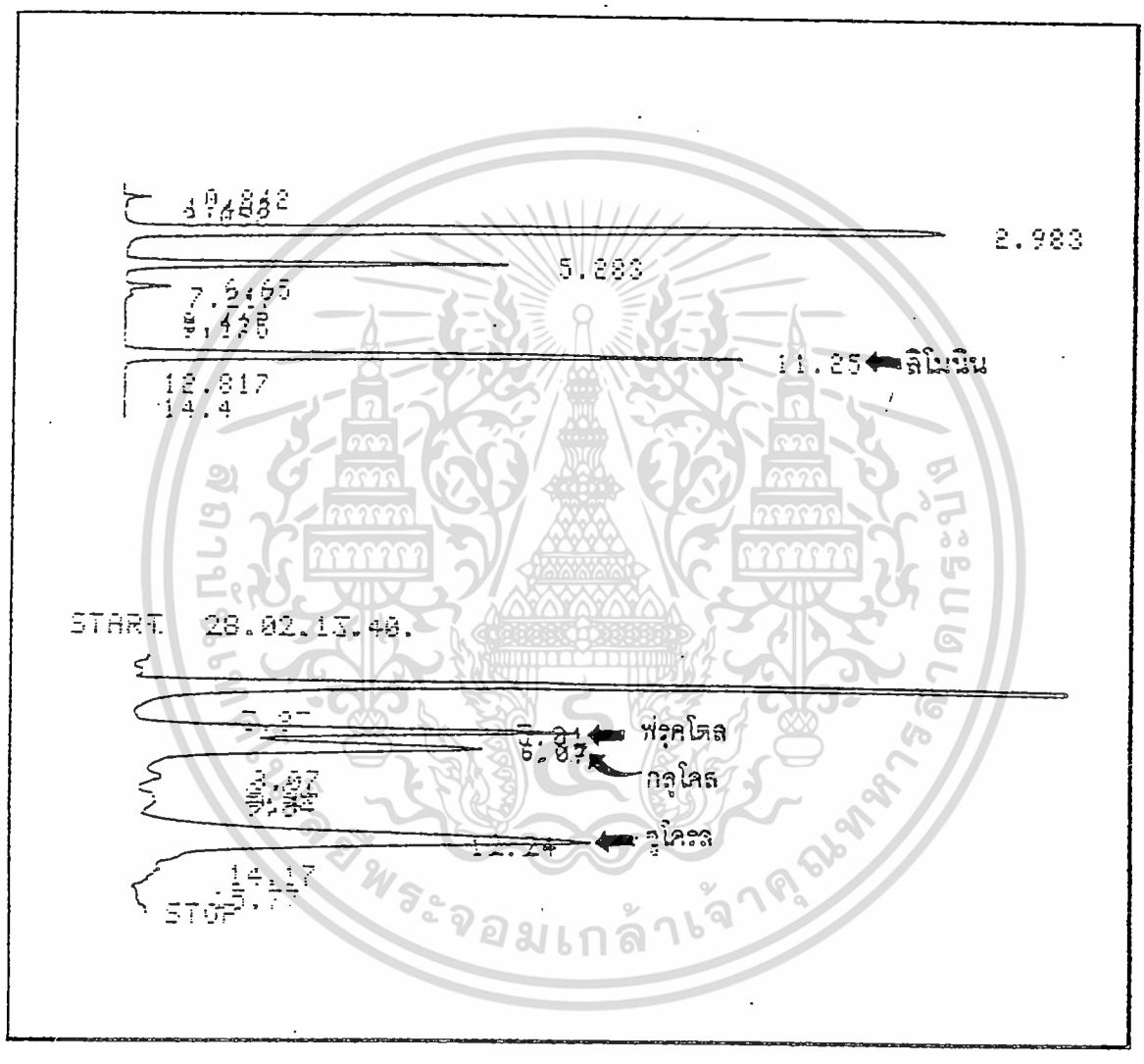
3. สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Rhodococcus* sp

ฟรุกโตส	4	กรัม
Nutrient broth	2	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
เฟอริกคลอไรด์	0.001	กรัม

ปรับให้มีพีเอชเป็น 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข



รูปที่ 8 แสดงโครมาโตแกรมของลิโมนิน กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ที่วิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตรกราฟฟีสมรรถนะสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

1. ปราณี อ่านเปรื่อง. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 2. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2534.
2. อัจฉรา ปิติปัญญากุล. เซลล์*R. fascians* ตรึงรูปสำหรับการลดความขมในน้ำมะนาวถนอม. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2532.
3. Arturo, M. J. L. Ibora., and C. M. Madrid., " pH control of limonin debittering with entrapped *Rhodococcus fascians* cells. " Appl. Microbiol. Biotechnol., 35 , 176 - 179, 1991.
4. Arturo, M. J. L. Ibora., et al., " Continuous limonin degradation by immobilized *Rhodococcus fascians* cells in K-carageenan, " Appl. Microbiol. Biotechnol., 41 , 487-493, 1994.
5. Arigoni , D. et al., " The constitution of limonin, " Experiencia., 16, 41-49, 1960.
6. Barmore, C.R., Fisher J.F. , Fellers P.J. and Rouseff R.L. , "Reduction of bitterness and tartness in grapefruit juice with florisil. " J.of Food Sci., 52, 415-416, 1986.
7. Bennett , R. D., " Acidic limonoids of grapefruit seeds, " Phytochemistry ., 10, 3065 - 3068, 1971.
8. Chandler, B.V., " Some Solubility Relationships of Limonin. Their Importance in Orange Juice Bitterness," CSIRO Food Res. Q., 31, 36-40, 1971.
9. Chandler, " Cellulose Acetate as A Selective Sorbent for Limonin in Orange Juice, " J. Sci. Food Agric., 28, 875-844, 1977.
10. Chandler, " New Sorbent Gel Forms If Cellulose Esters for Debittering Citrus Juice, " J. Sci. Food Agric., 30, 825-832, 1979.
11. Chibata, I., " Immobilized Enzyme Research and Development. " A Halsted Press

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Book, John Wiley and Son, New York, London, 1978.

12.Chibata, I., " Production of Useful Chemical Using Cells Immobilized with Poly acrylamide and Carrageenan," Enzyme Eng.,5, 393-400, 1980.

13.Datta, S. and Nicholas H.J., " Incorporation of mevalonic acid -2-^{14}C in to the triterpene limonin," Phytochemistry., 7, 955-956, 1968.

14. D, Hicks. " Production and Packaging of Non-Carbonated Fruit Juices and Fruit Baverages, " Black and Son Ltd. , Glasgaw and London , UK, 1990.

15. Dreyer, D.L. " Citrus bitter principles. III. Isolation of deacetylnomilin and deoxylimonin," J. Org. Chem., 30, 749-751, 1965.

16. Dreyer , D. L. " Citrus bitter principles VI , Ichangin , " J. Org. Chem. 2279 - 2281. 1868.

17. Dreyer , D. L. " Limonoid bitter principles, " Fortschr. Chem. Org. Naturst 26, 190 - 244 , 1968.

18. Dreyer , D. L. " Citrus bitter principles. Viii. Application of ORD and CD to stereochemical problems," Tetrahedron 24, 3273-3283. 1968.

19. Emerson , O. H. " The bitter principles of citrus fruit. I. Isolation of nomilin, a new bitter principle from the seeds of oranges and lemons, " J. Am. Chem. Soc. 70, 545 - 549. 1948.

20. Emerson , O. H. " Bitter principles of citrus. II. Relation of nomilin and obacunone, " J. Am. Chem. Soc. 73, 2621-2623. 1951.

21. Hasegawa, S., Bennett R.D., maier V.P., and King A.D. JR., " Limonoate dehydrogenase from *Arthobacter globiformis*, " J. Agric. Food Chem., 20 , 1031 - 1034, 1972

22. Hasegawa, L.C. Brewster, and V.P. Maier, "Use of Limonoate Dehydrogenase of *A. globiformis.* for The Prevention or Removal of Limonin bitterness in Citrus Products," J. of Food Sci., 38, 1153-1155,1973.

23. Hasegawa, S., Maier V.P., Border S.N., and Bennett R.D., "Metabolism of limo-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

noilds. Isolation of deoxylimonin hydrolase from *Pseudomanas sp.*" J. Agric. Food Chem., 22, 1093-1096, 1974.

24. Hasegawa, S.,"Metabolism of Limonoids. Limonin D-ring Lactone Hydrolase Activity in *Pseudomonas sp*," J. Agric. Food Chem., 24,24-26, 1976.

25. Hasegawa, and A.D.King Jr., " A Species of Bacterium Producing Constitutive Enzyme for Limonoid Metabolism," J. Agri. Food Chem., 31, 807-809, 1983.

26. Hasegawa, C.E. Vandercook, G.Y. choi, Z. Herman, and P. ou, " Limonoid Debittering of Citrus Juice Sera by Immobilized Cells of *C. fascians*.," J. Food Sci., 50, 330-332 , 1985.

27. Hasegawa, and A.D.,Jr. King, " Limonoate Dehydrogenase from *A. globiformis*. " J. Agric. Food Chem., 20, 1031-1034, 1972.

28. Hasegawa, S., M.N. Patel, and R.C. Snyder, " Reduction of Limonin in Navel Orange Juice Serum with Bacterial Cell Immobilized in Acrylaminde Gel, " J. Agric. Food Chem., 30, 509-511, 1982.

29. Hasegawa, and V.A. Pelton, and R.D Bennett, " Metabolism of Limonoid by *A. globiformis* " J. Agric. Food Chem., 31, 178-180, 1983.

30. Hasegawa, " Strain of *Corynebacterium fascians* and Use There of To Reduce Limonoid Bitterness in Citrus Products," U.S. Patent , 4 , 447 - 456, 1984.

31. Higby, R. H. " The bitter constituents of navel and Valencia oranges," Amer. Chem. Soc. 60, 3013-3018. 1938.

32. James, E. Bailey and David, F.Ollis, " Biochem Engineering Fundamentals." 2nd Edition . McGraw-Hill Book Company, 1986.

33. Johnson, R. L. and Chandler, B.V. "Kinetic studies of adsorption of bitter principles and tritratable acid from grapfruit juice," Unpublished manuscript, 1987.

34. Kefford, "The Chemical Constituents of Citrus Fruits," Advances in Food Research., Supplyment 2, C.O. Chichester (Mark, E.M., and Stewart, eds.) Academic Press, New York, 1970.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35. Kimball, D.A., " Debittering of Citrus Juice Using Supercritical CO_2." J. Food Sci., 52, 481- 482, 1987.

36. Klein, "Methods for The Immobilization of Microbial Cells, " Immobilized Microbial Cells (Chibata, I. And L.B. Wingard, eds.), pp.12-46, Academic press, London, 1983

37. Melera , A., Schaffner, K., Arigoni, D., and Jeger , O. " Constitution of limonin. I. Alkaline hydrolysis of limonin and limonol. " Chim. Acta ,40, 1420-1437. 1957.

38. Nishida, Y., T. Sato, T. Tosa, and I. Chibata, " Enzyme Microbial.,Technol." 1, 95, 1979. (Cited in Vandamme, 1980)

39. Pearson, d., " Fruit and Vegetable Products, " The Chemical Analysis of Food, 5, 161, 183, Longman Group Limited, 1976.

40. Ramstad, E. " Modern Pharmacognosy " McGraw-Hill , London-NewYork-Toronto, 48-65, 1959.

41. Rodrigo, M.I., A. Casas, and D. Mallent " Factors Influencing The Limonin Precursor Content in W. Navel II. Influence of Nitrogen, Phosphorus and Potassium Fertilization . " Revista de Agroquimicay Technologia de Alimentos, 18, 193 - 198, 1978.

42. Tosa, T., T. Sato, T. Mori, and I. Chibata, Appl. Microbiol., 27, 886,(Cited in Chibata, I., 1980).

43. Vaks, B.,and A.Lifshitz, " Debittering of Orange Juice by Bacteria Which Degrade Limonin" J. Agric. Food Chem., 29, 1258-1261, 1981.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้