การตรึงเซลล์ *Rhodococcus fascians* ในท่อปฏิกรณ์สำหรับลดความขมจากลิโมนินในน้ำส้ม

Rhodococcus fascians CELL IMMOBILIZATION IN COLUMN REACTOR FOR LIMONIN DEBITTERING IN ORANGE JUICE

T 0 2 9 0 8 8

นายธนากร สว่างชาติ
MR. THANAKORN SWANGCHART

เลขหมู่.......
เลขทะเบียน 29088
วัน, เดือน, ปี 18 พ.ย. 2540

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2540

ISBN 974-622-045-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rhodococcus fascians CELL IMMOBILIZATION IN COLUMN REACTOR FOR LIMONIN DEBITTERING IN ORANGE JUICE

THANAKORN SWANGCHART

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
1997

ISBN 974-622-045-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรึงเซลล์ *Rhodococcus fascians* ในท่อปฏิกรณ์สำหรับลดความขมจากลิโมนินในน้ำส้ม
นักศึกษา	นายธนากร สว่างชาติ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรไท สุขเจริญ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์เอก แสงวิเชียร
ระดับการศึกษา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.	2540

บทคัดย่อ

การศึกษาวิธีการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม โดยการใช้เซลล์ *Rhodococcus fascians* NRRL-B-15096 ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่น ซึ่งพบว่าเชื้อ *R. fascians* สามารถถูกชักนำให้มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนินได้ด้วยการเลี้ยงเชื้อในอาหารลิโมนินเป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการตรึงเซลล์ และผลจากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเซลล์และความคงทนของเม็ดเจลระหว่าง อะการ์ อะกาโรส แอลจิเนต อะคริลาไมด์ และแคปปาคาราจีแนน พบว่าแคปปาคาราจีแนนจะให้ผลดีที่สุด ดังนั้นจึงใช้แคปปาคาราจีแนนเป็นวัสดุตรึงสำหรับการตรึงเซลล์โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์ *R. fascians* และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก เม็ดเซลล์ตรึงรูปที่มีขนาดเหมาะสมจะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร และความเข้มข้นของโปตัสเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์ *R. fascians* เป็น 0.5 โมลาร์ และพบว่า ค่า K_m ของเซลล์ *R. fascians* อิสระมีค่าเท่ากับ 14.726 มิลลิโมล ส่วนค่า K_m ของเซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปที่มีค่าเท่ากับ 3.404 มิลลิโมล และค่า V_{max} ของเซลล์ *R. fascians* อิสระมีค่าเท่ากับ 66.006 มิลลิโมลต่อนาที ขณะที่ค่า V_{max} ของเซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปมีค่าเท่ากับ 13.149 มิลลิโมลต่อนาที สำหรับค่าครึ่งชีวิตของ *R. fascians* ตรึงรูปที่ถูกเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจะมีค่ามากกว่า 80 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการลดปริมาณลิโมนินโดยการใช้ท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นนั้น พบว่าอุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 20 - 35 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 4 - 7 ที่อัตราการไหลเป็น 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยการใช้ปริมาณน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์เป็น 48 มิลลิลิตรต่อปริมาณเม็ดเซลล์*R. fascians* ตรึงรูป 60 มิลลิลิตร ที่ภาวะดังกล่าวจะทำให้ปริมาณลิโมนินลดลงจาก 14.51 ส่วนในล้านส่วน เหลือ 9.76 ส่วนในล้านส่วน หรือลดลงเป็นร้อยละ 32.74 โดยน้ำหนัก ซึ่งทำให้ฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส กรดซิตริก และวิตามินซีในน้ำส้มลดลงร้อยละ 10.39 2.46 4.88 14.81 และ 13.81 ตามลำดับ และสามารถใช้ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ได้ 2 ครั้งติดต่อกัน โดยที่ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของ *R. fascians* ตรึงรูปในครั้งที่สองมีค่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของค่ากิจกรรมในครั้งแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	*Rhodococcus fascians* Cell Immobilization in Column Reactor for Limonin Debittering in Orange Juice
Student	Mr.Thanakorn Swangchart
Thesis Advisor	Assistant ProfessorOratai Sukcharoen
Thesis Co-advisor	Mr. Ek Seangwichian
Level of Study	Master of Science in Biotechnology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
Year	1997

ABSTRACT

The study of the method of limonin degradation in orange juice by immobilized *Rhodococcus fascians* NRRL-B-15096 cell in a packed-bed column reactor. *R. fascians* cell was able to be induced to metabolise limonin by treatment with limonin medium for 2 hours before immobilization. The results of comparison in activity and stability of gel bead among agar, agarose, alginate, acrylaminde and kappa-carageenan, found that kappa-carageenan had the highest achievement. Therefore, kappa-carageenan was used as a carrier for cell immobilization. The optimal content of cells and kappa-carageenan was determined to be in the ratio of 1 : 3 by weight. The appropriate diameter of immobilized cell bead and concentration of potassium chloride used for immobilization were 4 mm and 0.5 M, respectively. The values of K_m of the free cells was found to be 14.726 mM while that of immobilized cells was 3.404 mM. And the values of V_{max} of the free cells was 66.006 mM/min while that of immobilized cells was 13.149 mM/min. The half life of immobilized cells stored at 4 $^{\circ}$C was longer than 80 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The optimal conditions for the reduction of limonin content in packed-bed column reactor were in the range of 20-35 $^{\circ}C$, pH 4-7 , and the flow rate of 25 ml/h by using the volume of 48 ml of orange juice per 60 ml of immobilized cell beads. Under the conditions , the limonin content was reduced from 14.51 ppm to 9.76 ppm , or 32.74 % by weight . This was caused by the loss of 10.37 % fructose , 2.46 % glucose , 4.88 % sucrose , 14.81 % citric acid , and 13.81 % ascorbic acid . In addition , the operation of immobilized cells could be continued twice , the relative activity of immobilized cells of the second operating time was over than a half of the first operating time .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เพราะได้รับคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ตลอดจนทุนทรัพย์ในระหว่างการทำวิจัย จาก ผศ.อรไท สุขเจริญ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบ พระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ. โอกาสนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต และ อาจารย์เอก แสงวิเชียร ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ โดยเฉพาะในขั้นตอนการเรียบเรียงวิทยานิพนธ์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง และ รศ.สุนันทา ภิญญาวัธน์ และคณาจารย์ทุกท่านของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบใจน้องชายที่ช่วยสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดมา

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คุณจงกลณี เจริญสุข คุณพยอม เกียรติกำจร และขอขอบคุณ คุณวิทยา เขียวเขิน และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ได้ช่วยจัดการและอำนวยความสะดวกในด้าน อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และธุรการ ระหว่างทำวิทยานิพนธ์

ธนากร สว่างชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	IX
สารบัญภาพ	XII
บทที่	
1 บทนำ	1
แนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์	1
วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์	2
ขอบเขตของวิทยานิพนธ์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
ลักษณะของผลส้มและส่วนประกอบของน้ำส้ม	3
ลักษณะของสารลิโมนินและสารลิโมนอยด์	6
การลดปริมาณลิโมนินโดยใช้เอนไซม์และจุลินทรีย์	11
3 วิธีการทดลอง	20
วัสดุ เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ	20
วัสดุและเคมีภัณฑ์	20
เครื่องมือและอุปกรณ์	21
การวิเคราะห์และการทดลอง	22
การเลี้ยงและการตรึงเซลล์จุลินทรีย์	22
การวิเคราะห์	24
การศึกษาผลของอากาศที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม	25
การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ชักนำให้ *R. fascians* มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

การเปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับ
ตรึงเซลล์ *R. fascians*.. 26
การศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูป
สำหรับลดปริมาณลิโมนินแบบกะ(Batch).. 26
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของ *R. fascians* ตรึงรูป................................ 28
การศึกษาภาวะดำเนินการในการใช้ *R. fascians* ตรึงรูป
สำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม แบบต่อเนื่องในท่อปฏิกรณ์.... 30

4 ผลการทดลองและอภิปราย
การเพาะเลี้ยงเซลล์ *R. fascians* 32
การศึกษาผลของอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม.............. 35
การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ชักนำให้ *R. fascians* มีเมแทบอลิซึม
ต่อสารลิโมนิน.. 37
การเปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ *R. fascians* 40
การศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปสำหรับ
ลดปริมาณลิโมนินแบบกะ (Batch).. 46
การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์ *R. fascians* และ
แคปปาคาราจีแนน.. 46
การหาขนาดที่เหมาะสมของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป............................. 49
การศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* ตรึงรูป................ 52
การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ 54
การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ *R. fascians* ของแคปปาคาราจีแนน 57
การศึกษาโครงสร้างของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยเปรียบเทียบกับ
โครงสร้างของวัสดุตรึง.. 60
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระแบบกะ 63
การศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
pH ระดับต่าง ๆ	63
การศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ	66
การศึกษาค่า K_m และ V_{max} ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ	69
การศึกษาเสถียรภาพในการเก็บ *R. fascians* ตรึงรูป และหาค่าครึ่งชีวิต	71
การศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้ *R. fascians* ตรึงรูปสำหรับลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มแบบต่อเนื่องในท่อปฏิกรณ์	73
การศึกษาอัตราการไหลของน้ำส้มที่เหมาะสม	73
การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม	76
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม	79
การศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยา	82
การศึกษาการนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกัน	84
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก กรดแอสคอบิคและ pH ของน้ำส้มหลังกระบวนการลดลิโมนิน	86
5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	88
สรุปผลการวิจัย	88
ข้อเสนอแนะ	91
บรรณานุกรม	92
ภาคผนวก	96
ภาคผนวก ก	97
ภาคผนวก ข	99
ภาคผนวก ค	109
ประวัติผู้เขียน	118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้ำส้ม	4
2	แสดงส่วนประกอบตามลักษณะทางโภชนาการในน้ำส้ม	5
3	แสดงรายชื่อสารลิโมนอยด์ต่างๆ	8
4	แสดงแนวทางการลดความขมจากลิโมนินในน้ำส้ม	10
5	แสดงรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้ *R. fascians* ตรึงรูปในการลดปริมาณลิโมนิน	19
6	แสดงความคงรูปของเม็ดเจลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ที่ขึ้นรูปด้วยวัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และวัสดุตรึงเป็น 1:3 โดยน้ำหนักปริมาณวัสดุตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	44
7	แสดงค่าร้อยละการลดลงของลิโมนินและค่าคงที่การดูดซับลิโมนินของวัสดุตรึงชนิดต่างๆ ที่ปราศจากเซลล์ *R. fascians* โดยปริมาณของวัสดุตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง	45
8	แสดงการเปลี่ยนแปลงของกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก กรดแอสคอบิค และ pH ของน้ำส้มหลังผ่านกระบวนการลดลิโมนินด้วย *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตรและทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง	87
9	แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาผลของอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์(Randomized complete block design) หรือ RCB	99
10	แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ชักนำให้ *R. fascians* มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์หรือ RCB	99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

11 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการเปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึง *R. fascians* ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์หรือ RCB........ 100

12 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์ *R. fascians* และวัสดุตรึง ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์หรือ RCB 100

13 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาขนาดที่เหมาะสมของเม็ด *R. fascians* ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์หรือ RCB......... 101

14 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* ด้วยวิธี Duncan' s new multiple range test หรือ DMRT.......... 101

15 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) หรือ CRD........ 102

16 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มของแคปปาคาราจีแนน ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดหรือ CRD............... 102

17 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่ pH ระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT 103

18 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่อุณหภูมิระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT 104

19 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาเสถียรภาพในการเก็บ*R. fascians* ด้วยวิธี DMRT 105

20 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาอัตราการไหลของน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์ ด้วยวิธี DMRT 106

21 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ที่ pH ระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT 107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

22 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT 108

23 แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาการเติมอากาศที่เหมาะสมในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยาในท่อปฏิกรณ์ ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดหรือ CRD..... 108

24 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลิโมนินและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC....... 109

25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC....... 111

26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซูโครสและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC........ 113

27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟรุคโตสและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC..... 115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
1	แสดงโครงสร้างภาคตัดขวางของผลส้ม	3
2	แสดงโครงสร้างของลิโมนิน	8
3	แสดงวิถีทางการเกิดลิโมนิน	9
4	แสดงการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรเลส	9
5	แสดงการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส	11
6	แสดงการทำงานของเอนไซม์ต่อสารลิโมโนเอท	12
7	แสดงแผนภูมิการสกัดเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจาก *Arthobacter globiformis*	12
8	แสดงการทำงานของเอนไซม์ลิโมโนเอท-NAD(P)-ออกซิโดรีดักเทส	13
9	แสดงการทำงานของเอนไซม์ดีออกซีลิโมนินไฮโดรเลส	14
10	แสดงวิถีทางการเปลี่ยนแปลงของลิโมนินไปเป็นสารลิโมนอยด์อื่นที่เกิดใน *Pseudomonas* sp. 321-18	14
11	แสดงเมแทบอลิซึมของ *Corynebacterium fascians*	18
12	แสดงลักษณะโคโลนีของ *Rhodococcus fascians* ที่เจริญบนอาหาร Brain Heart Infusion Agar	33
13	แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ที่เจริญในอาหารเหลวที่มีฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีนิวเทรียนบรอท................	34
14	แสดงผลของการเติมอากาศ (Δ) และไม่เติมอากาศ (□) ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้มโดยการเติมอากาศจะควบคุมด้วยการกวนของแท่งแม่เหล็ก ที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง	36
15	แสดงกิจกรรมของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ที่ผ่านการชักนำในอาหารเหลวลิโมนิน ที่ระยะเวลาต่างๆ คือ ไม่ผ่านการชักนำ (+) 2 ชั่วโมง (X) 4 ชั่วโมง (Δ) และ 6 ชั่วโมง (□) โดยใช้ปริมาณเซลล์ 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) ทำปฏิกิริยา กับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง.....................................	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

16 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึงชนิดต่างๆ คือ คาราจีแนน (*) อะการ์ (Δ) อะกาโรส (X) อะไคร์ลาไมด์ (□) และ แอลจิเนต (+) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และวัสดุตรึงเป็น1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณวัสดุตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อมิลลิลิตร)และเม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง............. 43

17 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และคาราจีแนนต่างๆกันคือ 1 : 3 (+) 1 : 5 (Δ) 1 : 7 (X) และ1 : 9 (□)โดยน้ำหนัก โดยปริมาณแคปปาคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2(กรัมต่อ100 มิลลิลิตร)เม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรจำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง... 48

18 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกันคือ 2 มิลลิเมตร(Δ) 3 มิลลิเมตร (X) 4 มิลลิเมตร(+)และ 5 มิลลิเมตร(□)โดยอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ และคาราจีแนนเป็น1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณแคปปาคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2(กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง... 51

19 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป(Δ) และ *R. fascians* อิสระ(□) ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยปริมาณของ *R. fascians* ตรึงรูปและปริมาณของ *R. fascians* อิสระเป็น 1.2 กรัม 53

20 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปที่เตรียมจากโปตัสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างกันคือ 0.25 โมลาร์ 0.50 โมลาร์ 1.0 โมลาร์ และ 2.0 โมลาร์ 56

21 แสดงประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ *R. fascians* ของแคปปาคาราจีแนนโดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจจีแนนเป็น1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณของแคปปาคาราจีแนน เข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)และเม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 4 มิลลิเมตร ที่ขึ้นรูปในโปตัสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

22 แสดงลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่ไม่มีเซลล์ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ก) และลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่มีเซลล์ *R. fascians* ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ข)........ 61

23 แสดงลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่ไม่มีเซลล์ที่กำลังขยาย 10000 เท่า (ก)และลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่มีเซลล์ *R. fascians* ที่กำลังขยาย 10000 เท่า (ข)........ 62

24 แสดงกิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูป(Δ) และ *R. fascians* อิสระ(□) ที่ pH ระดับต่าง ๆ 65

25 แสดงกิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูป(Δ) และ *R. fascians* อิสระ(□) ที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ 68

26 แสดงกราฟไลน์วีฟเฟอเบิร์กของ *R. fascians* ตรึงรูป(Δ) และ *R. fascians* อิสระ(□) แบบกะ 70

27 แสดงเสถียรภาพในการเก็บ *R. fascians* ตรึงรูปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลาต่างๆ โดยอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และคาราจีแนนเป็น 1:3 โดยน้ำหนัก ปริมาณของคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อมิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยา กับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 72

28 แสดงการดำเนินการลดปริมาณลิโมนินด้วย *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่น อย่างต่อ เนื่อง โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง........ 74

29 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ น้ำส้มเข้มข้นร้อยละ100(Δ) น้ำส้มเข้มข้นร้อยละ 75(X) และน้ำส้มเข้มข้นร้อยละ 50(□) ที่อัตราการไหลต่างๆกันในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง โดยท่อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยบรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง........ 75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

30 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มที่มี pH ระดับต่าง ๆ ในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่มีอัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง.. 78

31 แสดงการดำเนินการลดปริมาณลิโมนินด้วย *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่องที่ควบคุมอุณหภูมิของท่อปฏิกรณ์ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร 80

32 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง 81

33 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่องด้วยการเติมอากาศ ในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยา ที่การกวนระดับต่างๆ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.. 83

34 แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่องที่นำมาใช้ติดต่อกัน โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง 85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

35 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณลิโมนินด้วยเครื่อง เอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล (nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm.อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตร และใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร............................ 110

36 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล(nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm. อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1มิลลิลิตรต่อนาที และเฟส เคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตรโดยใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร............................ 112

37 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟรุคโตสด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล(nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm. อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1มิลลิลิตรต่อนาที และเฟส เคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตรโดยใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร............................ 114

38 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณซูโครสด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล(nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm. อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1มิลลิลิตรต่อนาที และเฟส เคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตรโดยใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร............................ 116

39 แสดงโครมาโตแกรมของลิโมนิน กลูโคส ซูโครส และฟรุคโตส......................... 117

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

แนวคิดในการทำวิทยานิพนธ์

พืชตระกูลส้ม (Citrus plants) เป็นพืชที่มีแหล่งกำเนิดมาจากทวีปเอเชีย ต่อมาได้มีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของโลก ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่สามารถเพาะปลูกพืชตระกูลส้มได้ เนื่องจากเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อน (Tropical zone) และมีสภาพของดินที่มีลักษณะชื้นแฉะและร่วนซุย พืชตระกูลส้มที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ มะนาว มะกรูด ส้มหวาน ส้มโอ สำหรับฤดูกาลที่เหมาะสมต่อการผลิตพืชตระกูลส้มนั้นจะเป็นในช่วงฤดูฝน เนื่องจากพืชตระกูลส้มเป็นพืชที่ต้องการน้ำมาก อย่างไรก็ตามพืชประเภทนี้ก็สามารถให้ผลผลิตได้ในฤดูร้อน หากมีระบบการให้น้ำอย่างเพียงพอ

ผลไม้ตระกูลส้ม เช่น ส้มหวาน (*Citrus sinensis*) จัดเป็นสินค้าทางการเกษตรที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมาก ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะไม่ใช่แหล่งที่มีการปลูกส้มมากในอันดับต้นๆก็ตาม แต่ลู่ทางการส่งส้มและผลิตภัณฑ์จากส้ม เป็นสินค้าออกก็เป็นหนทางหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากคุณภาพในด้านรสชาติของส้มที่มีเอกลักษณ์เฉพาะ หากมีการแปรรูปส้มให้เป็นน้ำส้มคั้นบรรจุภาชนะแล้ว จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยพยุงราคาของส้มในภาวะการณ์ที่ส้มล้นตลาด ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีในการแปรรูปผลส้มไปเป็นน้ำส้มจะก้าวหน้าไปมากแล้วก็ตาม แต่วิธีการที่จะเก็บน้ำส้มไว้ในลักษณะที่ไม่เติมสารใดๆลงไป และการฆ่าเชื้อก็ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากน้ำส้มมีรสชาติและกลิ่นเฉพาะ ซึ่งรสชาติที่เปลี่ยนไป (Off - flavor) ในระหว่างกระบวนการแปรรูปนั้นมักเกิดขึ้นได้ หากมีการใช้ความร้อนสูงในการฆ่าเชื้อก่อนบรรจุ และปัญหาอีกประการหนึ่งของน้ำส้มที่คั้นจากผลส้มสดคือ ความขมซึ่งเกิดจากสารลิโมนิน (Limonin) โดยสารลิโมนินจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในน้ำส้มที่คั้นได้ในช่วงที่น้ำเกือบจะหมดจากเนื้อส้ม จึงทำให้ประสิทธิภาพของการคั้นไม่สามารถทำได้เต็มที่และต้องทิ้งน้ำส้มส่วนนั้นไปกับกากส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการเพิ่มมูลค่าของน้ำส้มที่คั้นได้จากกากส้ม โดยการปรับปรุงคุณภาพ ด้วยการใช้เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปที่มีประสิทธิภาพในการลดความขมอันเนื่องมาจากสารลิโมนิน งานวิจัยครั้งนี้มีขอบเขตอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะเกี่ยวข้องกับรูปแบบของการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ และการใช้งานของ *R. fascians* ตรึงรูปในรูปแบบที่เหมาะสมในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่น (Packed-bed column reactor)

วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

1. ศึกษาปัจจัยของอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณลิโมนินที่มีในน้ำส้ม
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้จุลินทรีย์มีเมแทบอลิซึม (Metabolism) ต่อสารลิโมนิน
3. เปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์
4. ศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปสำหรับลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม โดยดำเนินการแบบกะ
5. ศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปสำหรับลดปริมาณลิโมนิน ในน้ำส้ม โดยดำเนินการแบบต่อเนื่องในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่น

ขอบเขตของวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้จะศึกษาวิธีดำเนินการในการใช้เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูป สำหรับลดความขมที่มีสาเหตุมาจากลิโมนิน โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จะเป็นการตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้วัสดุตรึงเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเกรดอาหาร โดยมีขั้นตอนการเตรียมที่ไม่ยุ่งยากและไม่รุนแรงต่อเซลล์จุลินทรีย์ มีราคาถูก และเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเพื่อนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพของน้ำส้ม เพื่อลดความขม อันเนื่องมาจากสารลิโมนินในน้ำส้มประเภทอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาความขมอันเนื่องมาจากสารลิโมนินในน้ำส้มที่คั้นจากผลส้มจะมีผลอย่างมากต่อความ พึงพอใจในรสชาติของผู้บริโภค นอกจากนี้ลักษณะทางโครงสร้างและเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของสารในกลุ่มลิโมนอยด์ (Limonoids group) ยังมีความสำคัญต่อการพิจารณาชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะเปลี่ยนลิโมนินซึ่งเป็นสารที่ขม ไปเป็นสารลิโมนอยด์อื่นที่ไม่ขม

ลักษณะของผลส้มและส่วนประกอบของน้ำส้ม

จากภาพตัดขวางของผลส้มดังภาพที่ 1 แสดงเนื้อเยื่อชั้นต่างๆของเปลือกได้แก่ เนื้อเยื่อชั้นนอกสุดที่เรียกว่า คิวติเคิล (Cuticle) เนื้อเยื่อชั้นกลางคือ ฟลาวีโด (Flavedo) ซึ่งจะมีถุงน้ำมันแทรกอยู่ และเนื้อเยื่อชั้นที่อยู่ติดกับเนื้อส้มคือ อัลบีโด (Albedo) จะมีลักษณะเป็นปุยสีขาวและเป็นส่วนหนาของเปลือกส้ม สำหรับในส่วนของเนื้อส้มจะประกอบด้วยถุงส้ม (Juice vesicles) จำนวนมากอยู่ชิดติดกัน ภายในถุงส้มจะบรรจุของเหลวที่มีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) กรดอินทรีย์(Organic acids) กรดอะมิโน (Amino acids) และอื่นๆ

ภาพที่ 1

แสดงโครงสร้างภาคตัดขวางของผลส้ม (ที่มา D.Hicks, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบทางเคมีหลักๆ ของน้ำส้มแสดงดังตารางที่ 1 และส่วนประกอบที่มีคุณค่าทางโภชนาการแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1

แสดงส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญในน้ำส้ม (ที่มา D.Hicks, 1989)

ส่วนประกอบ	ร้อยละของน้ำหนักต่อปริมาตร
คาร์โบไฮเดรต	76.0
กรดอินทรีย์	9.6
กรดอะมิโนอิสระ	5.4
อิออนอนินทรีย์	3.2
วิตามิน	2.5
ไขมัน	1.2
ไนโตรเจนเบสและกลูตาไธออน	0.9
ฟลาโวนอยด์	0.8
สารระเหย	0.38
แคโรทีนอยด์	0.013

คาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในน้ำส้มได้แก่ น้ำตาลซึ่งคิดเป็นร้อยละ 80 ของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในน้ำส้ม น้ำตาลดังกล่าวจะประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ร้อยละ 49 - 59 และน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ซึ่งได้แก่ น้ำตาลกลูโคส(Glucose) ร้อยละ 20 - 25 และ น้ำตาลฟรุคโตส (Fructose) ร้อยละ 20 - 25 ซึ่งปริมาณของน้ำตาลต่างๆเหล่านี้ จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฤดูกาล และพื้นที่การเพาะปลูก โดยทั่วไปอัตราส่วนของ ซูโครส : กลูโคส : ฟรุคโตส จะเท่ากับ 2: 1: 1 ส่วนรงควัตถุที่ทำให้น้ำส้มมีสี คือสารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid pigment) ได้แก่ เบต้า-แคโรทีน (β-carotene) รงควัตถุนี้สามารถพบได้ทั่วไป ทั้งในส่วนของฟลาวีโด (Flavedo) และถุงส้ม (Juice sacs) ส่วนกรดอินทรีย์ที่พบว่ามีปริมาณมากที่สุดในน้ำส้ม คือกรดซิตริก (Citric acid) สำหรับกรดมาลิก(Malic acid)นั้นพบในปริมาณเล็กน้อย จึงทำให้การหาค่าความเป็นกรดที่สามารถไตเตรทได้ (Titratable acidity) มีค่าใกล้เคียงกับค่าปริมาณกรดซิตริก (D.Hicks, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2

แสดงส่วนประกอบตามลักษณะทางโภชนาการในน้ำส้ม (ที่มา D.Hicks,1989)

	พิสัย(ต่อ100กรัม)	ค่าเฉลี่ย(ต่อ100กรัม)
โปรตีน(ไนโตรเจนรวม x 6.25)(กรัม)	0.58-1.29	0.91
ไนโตรเจนในกรดอะมิโน (กรัม)	0.029-0.07	0.047
ไขมัน (กรัม)	0.0-0.56	0.2
ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (กรัม)	8.1-17.7	12.3
น้ำตาลทั้งหมด (กรัม)	6.32-14.3	9.15
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม)	2.25-8.83	4.60
น้ำตาลซูโครส (กรัม)	2.98-6.24	4.37
กรด (ทั้งหมด) (กรัม)	0.58-1.73	1.09
กรดมาลิก (กรัม)	0.10-0.17	0.15
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	6.3-29.4	15
คลอไรด์ (มิลลิกรัม)	3.6-13.2	6
ฟลูออรีน (มิลลิกรัม)	0.11-0.19	0.14
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.1-0.8	0.3
แมกนีเซียม (มิลลิกรัม)	9.8-17.1	12
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	8.0-30.0	20
โปตัสเซียม (มิลลิกรัม)	116-265	196
โซเดียม (มิลลิกรัม)	0.2-0.4	0.5
กำมะถัน (มิลลิกรัม)	3.5-11.3	8
กรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัม)	26-84	56.6
เบตาอีน (มิลลิกรัม)	41-47	44
ไบโอติน (มิลลิกรัม)	0.0001-0.00037	0.00024
เบต้า-แคโรทีน (มิลลิกรัม)	0.23-0.28	0.12
ไพริดอกซิน (B_6) (มิลลิกรัม)	0.023-0.094	0.038
ไรโบฟลาวิน (B_2) (มิลลิกรัม)	0.013-0.059	0.021
ไทอามีน (B_1) (มิลลิกรัม)	0.057-0.106	0.077
วิตามิน B_{12} (ไมโครกรัม)	0.0011-0.0012	0.0011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ แต่สลายตัวได้ง่าย เมื่อได้รับความร้อนจากกระบวนการฆ่าเชื้อ เช่น การพาสเจอไรส์ (Pasteurization) ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วง 195- 200 องศาฟาเรนไฮต์ การแก้ปัญหาเกี่ยวกับปริมาณวิตามินซีที่หายไปหลังกระบวนการฆ่าเชื้อสามารถกระทำได้โดยการเติมวิตามินลงไปหลังกระบวนการฆ่าเชื้อ สำหรับวิตามินอื่นพบว่ามีในปริมาณน้อย

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นสารที่พบได้ในส่วนของผลส้ม และมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้ม นารินจิน (Naringin) เป็นฟลาโวนอยด์ที่มีรสขม ซึ่งพบอยู่ในน้ำส้มที่คั้นจากส้มประเภทเกรปฟรุต(Grapefruit juice) สำหรับฟลาโวนอยด์ที่สำคัญที่ทำให้เกิดความขมในน้ำส้มสดที่คั้นจากส้มหวาน คือ สารลิโมนิน (Limonin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มลิโมนอยด์ (Limonoid groups) โดยสารในกลุ่มลิโมนอยด์นี้เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชตระกูลส้ม

สารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ จะมีกลุ่มของคาร์บอนมาต่อกันเป็นโครงร่างของโมเลกุล (Skeleton) ซึ่งจะเรียงต่อกันเป็น C_6-C_3-C_6 โดย C_6 เป็นกลุ่มของคาร์บอนที่ต่อกันเป็นวงแหวนเบนซีน (Benzene ring) และ C_3 เป็นกลุ่มของคาร์บอนที่ทำให้สารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์มีการจัดแยกได้เป็นสารกลุ่มย่อยที่แตกต่างกัน เช่น ลิโมนอยด์

<u>ลักษณะของสารลิโมนินและสารลิโมนอยด์</u>

สารลิโมนิน (Limonin) เป็นสารที่พบในผลไม้ตระกูลส้มพวกส้มหวาน มะนาว มะกรูด ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณลิโมนินในผลส้มนั้น จะเกี่ยวข้องกับ ลักษณะของการเพาะปลูก จนกระทั่งถึงการเก็บเกี่ยว ได้แก่ สายพันธุ์และแหล่งปลูกที่แตกต่างกันนั้น จะมีผลต่อปริมาณลิโมนินที่แตกต่างกันไปด้วย จากรายงานของ Rodrigo และคณะ (1978) พบว่า ในแหล่งดินที่มีปริมาณธาตุไนโตรเจนและโปตัสเซียมสูงทำให้ปริมาณลิโมนินลดลง ส่วนช่วงเวลาต่างๆในระหว่างการเพาะปลูกจนกระทั่งการเก็บเกี่ยว พบว่า ปริมาณลิโมนินในช่วงแรกจะสูงกว่าในช่วงปลาย หรือช่วงก่อนระยะการเก็บเกี่ยว ซึ่งลิโมนิน จะมีปริมาณน้อยในช่วงใกล้ระยะเวลาการเก็บเกี่ยว

สารลิโมนินเป็นสารในกลุ่มลิโมนอยด์ (Limonoids) หรือสารเททระนอร์ไตรเทอร์ปีนอยด์ (Tetranortriterpenoid) ที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น

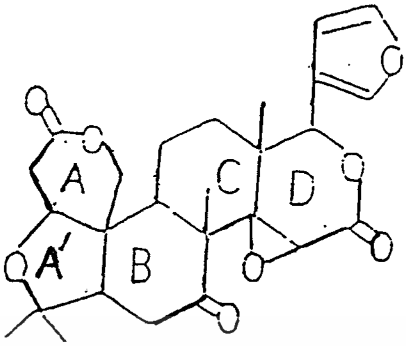
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะซีโตไนไทร์ล (Acetonitrile) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) สารลิโมนินถูกแยกได้เป็นครั้งแรกโดย Higby (1938) ซึ่งแยกได้จากซีรั่ม (sera) ของน้ำส้ม ต่อมา Arigoni และคณะ (1960) ได้เสนอโครงสร้างที่สมบูรณ์ของสารลิโมนิน ดังแสดงในภาพที่ 2 โครงสร้างของลิโมนินจะประกอบด้วยวงแหวนแกมมาแลคโตน (γ-Lactone) จำนวน 2 วง คือ วง A และ วง D โดยมีวงแหวนฟูราน (Furan) มาเชื่อมต่อกับวงแหวนแกมมาแลคโตน D ตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 17 นอกจากนี้ยังพบหมู่ที่มีออกซิเจนอยู่ร่วมด้วย (Oxygen containing functional groups) เช่นหมู่ออกซีเมทิลลีน (Oxymethylene group) และหมู่อิพอกไซด์ (Epoxide group) สำหรับสารลิโมนอยด์อื่นนอกจากลิโมนินแล้ว พบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและสลายของลิโมนิน ซึ่งได้มีผู้ศึกษาและแยกไว้ ดังแสดงในตารางที่ 3 สารลิโมนอยด์ต่างๆ รวมทั้งลิโมนินนั้น สามารถพบได้ทั่วไปตามส่วนต่างๆ แต่จะพบมากในส่วนเมล็ด

งานวิจัยที่ศึกษาการเกิดลิโมนิน เริ่มโดย Datta และ Nicholas (1968) ได้ศึกษาการสังเคราะห์สารลิโมนอยด์ในเมล็ดของส้มหวานพันธุ์วาเลนเซีย (Valencia) โดยการใช้กรดเมวาโลนิก (Mevalonic acid) เป็นสารติดฉลากกัมมันตภาพ (Label) ติดตามแหล่งกำเนิดของลิโมนินและลิโมนอยด์อื่นที่เกี่ยวข้อง และพบว่าแหล่งสังเคราะห์ของสารลิโมนอยด์ไม่ใช่เมล็ด โดยสารลิโมนอยด์ที่ปรากฏอยู่ในเมล็ดนั้น แท้จริงแล้วมาจากเนื้อเยื่ออัลบีโด นอกจากนี้ Dreyer (1965 และ1968) ยังได้เสนอวิถีทางการเกิดลิโมนินไว้ โดยเริ่มจากดีอะซีทิลนอมิลิน (Deacetylnomilin) เป็น นอมิลิน(Nomilin) โอบาคิวโนน (Obacunone) โอบาคิวโนอิก แอซิด (Obacunoic acid) และ ลิโมนิน ตามลำดับ ซึ่งเป็นแนวทางหลักที่สำคัญของการเกิดลิโมนินต่อมา Kefford และ Chandler (1970) ได้ศึกษา พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากดีอะซีทิลนอมิลิน (Deacetylnomilin) ไปเป็น ดีอะซีทิลนอมิลินิก แอซิด (Deacetylnomilinic acid) ไอชานจิน (Ichangin) และลิโมนิน ตามลำดับ แต่แนวทางนี้เกิดได้ค่อนข้างต่ำ วิถีทางที่กล่าวมานี้สามารถสรุปเป็นแผนผังดังภาพที่ 3 ซึ่งวิถีทางการเกิดลิโมนิน ทั้งสองแนวทางนี้จะเกิดขึ้นในส่วนของใบพืชตระกูลส้มก่อน แล้วจึงเคลื่อนย้ายไปสู่เนื้อเยื่อต่างๆในผลและเมล็ดในที่สุด จึงทำให้ในช่วงต้นฤดูเก็บเกี่ยว ผลไม้จะมีรสขมมากกว่าในช่วงปลายฤดูเก็บเกี่ยว และในช่วงที่ผลไม้แก่เต็มที่จะพบปริมาณลิโมนินอยู่มากในเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2



แสดงโครงสร้างของลิโมนิน

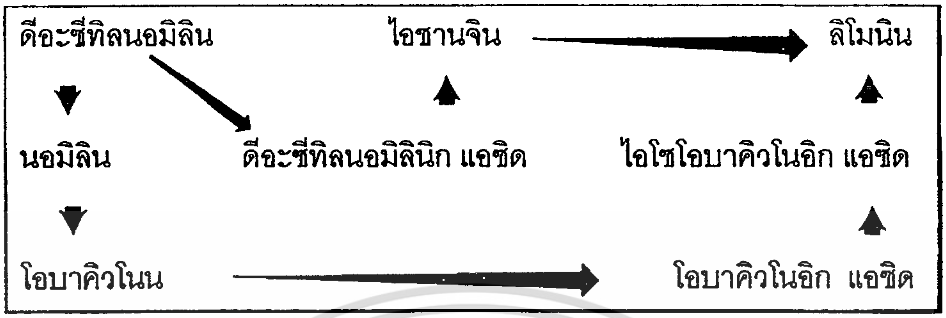
ตารางที่ 3

แสดงรายชื่อสารลิโมนอยด์ต่าง ๆ

สารลิโมนอยด์	รส	ถูกแยกโดย
นอมิลิน (Nomilin)	ขม	Emerson (1948)
โอบาคิวโนน (Obacunone)	ไม่ขม	Emerson (1951)
ดีอะซีทิลนอมิลิน (Deacetylnomilin)	ไม่ขม	Dreyer (1965)
ดีออกซีลิโมนิน (Deoxylimonin)	ไม่ขม	Dreyer (1965)
ไอชานจิน (Ichangin)	ขม	Bennett (1971)
ไอโซโอบาคิวโนอิกแอซิด (Isoobacunoic acid)	ขม	Bennett (1971)
อิพิไอโซโบอาคิวโนอิก แอซิด(Epiisoobacunoic acid)	-	-
นอมิลินิก แอซิด (Nomilinic)	ขม	Bennett (1971)
ดีอะซีทิลนอมิลินิก แอซิด (Deacetylnomilinic acid)	-	Bennett (1971)
ลิโมนิก แอซิด (Limonic acid)	ไม่ขม	-
ลิโมนิกแอซิดวงแหวนแลคโตนเอ(Limonic acidA-ringLactone)	ไม่ขม	-
17-ดีไฮโดรลิโมโนอิกแอซิด วงแหวนแลคโตนเอ (17-Dehydrolimonoic acid A-ring Lactone)	ไม่ขม	-
ดีออกซีลิโมนิก แอซิด (Deoxylimonic acid)	ไม่ขม	-
โอบาคิวโนอิก แอซิด (Obacunoic acid)	ขม	
ลิโมนินิก แอซิด (Limonilic acid)	ไม่ขม	-
ลิโมนอล (Limonol)	ไม่ขม	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3

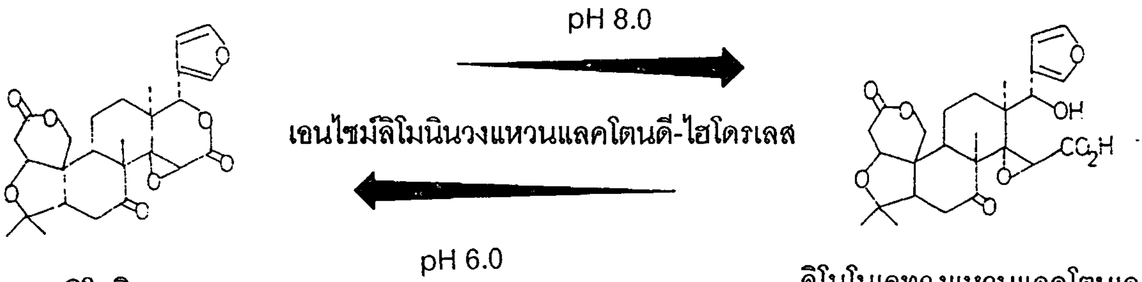


แสดงวิถีทางการเกิดลิโมนิน

(ที่มา Dreyer 1965,1968 และ Kefford และ Chandler 1970)

ลิโมนินที่ปรากฏอยู่ในเมล็ด จะมีโครงสร้างตามภาพที่ 2 ซึ่งเป็นลักษณะการเกิดลิโมนินที่สมบูรณ์ แต่รูปแบบของลิโมนินที่ปรากฏในเนื้อเยื่อของผลส้มจะแตกต่างจากที่ปรากฏในเมล็ด โดยวงแหวนแลคโตน A ของลิโมนินจะเปิดออก ได้เป็นลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ (Limonoate A-ring lactone) ดังในภาพที่ 4 Maier และ Margileth (1969) ได้รายงานถึงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงระหว่างลิโมนินและลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ(Reversible reaction)นั้น สามารถเกิดขึ้นได้โดยการไฮโดรไลซ์ของเอนไซม์ลิโมนินวงแหวนแลคโตนดี-ไฮโดรเลส (Limonin D-ring lactone hydrolase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะพบอยู่มากในเมล็ด สำหรับการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรเลสแสดงได้ดังภาพที่ 4

ภาพที่ 4



ลิโมนิน ลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ

แสดงการทำงานของเอนไซม์ลิโมนิน วงแหวนแลคโตนดีไฮโดรเลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอที่อยู่ในเนื้อเยื่อของผลส้ม สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นลิโมนินได้ เมื่อสภาพของน้ำผลไม้ขณะนั้นเป็นกรดและมีสภาวะการคั้นที่รุนแรง หรือเนื้อเยื่อได้รับความเสียหาย เนื่องจากเกล็ดน้ำแข็งจากการแช่แข็งก็ส่งผลต่อการเร่งให้เกิดลิโมนินได้เช่นกัน วิธีการลดลิโมนินสามารถทำได้หลายวิธีดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4

แสดงแนวทางการลดความขมจากลิโมนินในน้ำส้ม

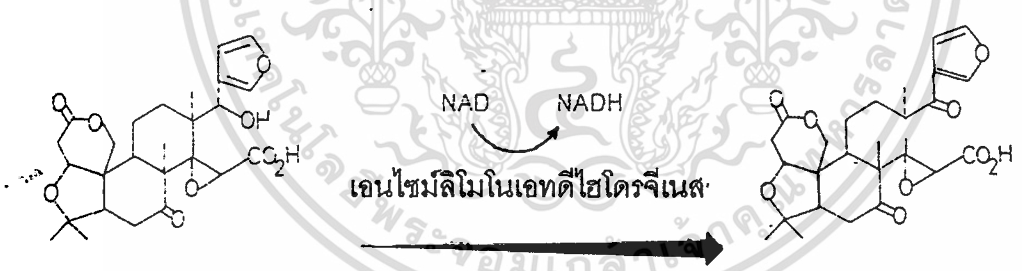
วิธีการ	ลักษณะ	ข้อดีและข้อเสีย
1.วิธีทางกายภาพ		
1.1 การตกตะกอน Chandler (1971)	ลิโมนินตกตะกอนพร้อมๆกับการกำจัดความขุ่นในน้ำผลไม้	ข้อดี เป็นผลพลอยได้ร่วมกัน ข้อเสีย ประสิทธิภาพต่ำ
1.2 การดูดซับ		
-ถ่านกัมมันต์ Barmoreและ คณะ (1986)	ดูดซับลิโมนินและสารตั้งต้นของลิโมนิน	ข้อดี ไม่มีการสูญเสียรสชาติ ข้อเสีย สีจะซีดและอาจมีคาร์บอนปะปน
-เซลลูโลสเอสเทอร์ Chandler (1977)	ดูดซับลิโมนิน	ข้อเสีย ต้องแยกเฉพาะส่วนใสของน้ำส้ม
-เซลลูโลสอะซีเตท Chandler และ Johnson (1979)	ดูดซับลิโมนิน	ข้อดีคือไม่ต้องแยกเฉพาะส่วนใสของน้ำส้ม ข้อเสีย มีการสูญเสียวิตามินซี
1.3 การใช้ก๊าซ CO_2 ในสภาพจุดวิกฤติยิ่งยวด (Super critical CO_2) Kimball (1987)	ควบคุมความดันในช่วง 3000-6000 ปอนด์ต่อตารางนิ้วที่ 30-60 องศาเซลเซียสแล้วพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงไป	ข้อเสีย ลงทุนสูง
1.4 การบดบังความขม	เป็นการเพิ่มความหวานโดยเติมน้ำตาลซูโครสลงไป	ข้อเสีย มีการยอมรับได้ต่ำจากผู้บริโภค
2. วิธีทางเอนไซม์และจุลินทรีย์	จะมีผลต่อกระบวนการสร้างและสลายลิโมนิน	ข้อเสีย ลงทุนสูงจึงต้องมีการพัฒนาโดยการใช้แบบตรึงรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การลดปริมาณลิโมนินโดยใช้เอนไซม์และจุลินทรีย์</u>

Hasegawa และคณะ (1972) ได้แยกเชื้อ *Arthrobacter globiformis* จากดิน พบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้สามารถสร้างเอนไซม์ลิโมโนเอท-เอ็นเอดี-ออกซิโดรีดักเทส (Limonoate - NAD-oxidoreductase) หรือเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส(Limonoate dehydrogenase) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) เอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ (สารต้นตอของลิโมนิน) ไปเป็น17-ดีไฮโดรลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ(17-Dehydro limonoate A-ring Lactone) ซึ่งแสดงดังภาพที่ 5 โดยโมเลกุลของสารตั้งต้นจะมีลักษณะดังนี้คือ 1) มีวงแหวนฟูราน (Furan ring) 2) มีหมู่อีพอกไซด์ (Epoxide group) และ 3) วงแหวนแลคโตนดีต้องเปิด ส่วนลิโมโนเอท (Limonoate) เป็นโมเลกุลที่มีลักษณะเดียวกับลิโมโนเอทวงแหวนแลค โตนเอ โดยที่ Hasegawa และคณะ(1972) ได้รายงานถึงเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนสดังกล่าวสามารถเปลี่ยนลิโมโนเอทไปเป็น 17-ดีไฮไดรลิโมโนเอท (17-Dehydrolimonoate)ตามภาพที่ 6 ซึ่งปฏิกิริยานี้จะอาศัย NAD โดยมีช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 9.5 โดยมี Zn^{2+} ร่วมด้วย

ภาพที่ 5



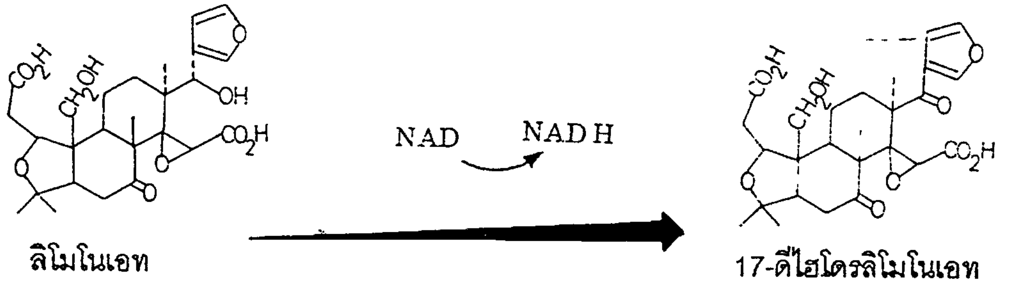
ลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ 17- ดีไฮโดรลิโมโนเอทวงแหวน แลคโตนเอ

แสดงการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส

การสกัดเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส จากเชื้อ *A. globiformis.* ตามรายงานของ Hasegawa และคณะ (1972,1973) โดยการทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์แตก แล้วตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นจึงแยกเอนไซม์ออกโดยการใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส (Diethylaminoethyl-cellulose) ซึ่งแสดงขั้นตอนดังภาพที่ 7 โดยเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส จากเชื้อ *A. globiformis.* ดังกล่าวมีช่วงการทำงานที่เหมาะสมที่ pH 9.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 6



แสดงการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสต่อสารลิโมโนเอท

แผนภูมิที่ 7

เลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเหลวในขวดรูปชมพู่และให้อากาศด้วยการเขย่าเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
▼
บดให้เซลล์แตกแล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ที่มีไดไทโอทรีไทออล 10^{-3} โมลาร์ หมุนเหวี่ยงที่ 20,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวส่วนใสไว้
▼
นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดยมีการกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิโดยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเก็บส่วนตะกอนไว้
▼
ละลายตะกอนด้วยทรีสบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ที่มีไดไทโอทรีไทออล 10^{-3} โมลาร์ แล้วทำไดอะไลซีสด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 7 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเฉพาะส่วนที่อยู่ในถุงไดอะไลซีสไว้
▼
นำของเหลวที่ได้จากการทำไดอะไลซีสมาแยกด้วยคอลัมน์ DEAE เซลลูโลส ที่สมดุลด้วยทรีสบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ pH 8 และชะด้วยตัวทำละลายทรีสบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ เก็บของเหลวที่แยกได้จากคอลัมน์ โดยแบ่งเก็บใส่หลอดทดลอง หลอดทดลองละ 4 มิลลิลิตรและนำแต่ละหลอดไปหากิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์

แสดงแผนภูมิการสกัดเอนไซม์ไฮโดรจีเนสจาก *Arthrobacter globiformis.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hasegawa และคณะ (1974) ได้ศึกษาเชื้อ *Pseudomonas* sp. 321-18 โดยทำการสกัดแยกเอนไซม์ลิโมโนเอท-เอ็นเอดี(พี)-ออกซิโดรีดักเทส (Limonoate - NAD(P) - oxidoreductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ที่สามารถใช้ได้ทั้ง NADและ NAD(P) เป็นโคเอนไซม์ (Co - enzyme) และต้องการ Zn^{2+} และซัลไฟดริล (Sulfhydryl) ร่วมในปฏิกิริยา เอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสนี้จะเปลี่ยนลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ (Limonoate A-ring lactone) ไปเป็น 17 - ดีไฮโดรลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ (17 - Dehydrolimonoate A-ring lactone) โดยมีค่า pH 8 เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แสดงดังภาพที่ 8 นอกจากนี้ยังพบว่าช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสจาก *Pseudomonas* sp 321-18 จะกว้างกว่าช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสจาก *A. globiformis* สำหรับการแยกเอนไซม์ลิโมโนเอท-เอ็นเอดี-(พี)-ออกซิโดรีดักเทสนั้น สามารถแยกได้โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และสกัดต่อด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส เช่นเดียวกับการสกัดเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสจาก *A. globiformis.*

ภาพที่ 8

ลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ 17-ดีไฮโดรลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ

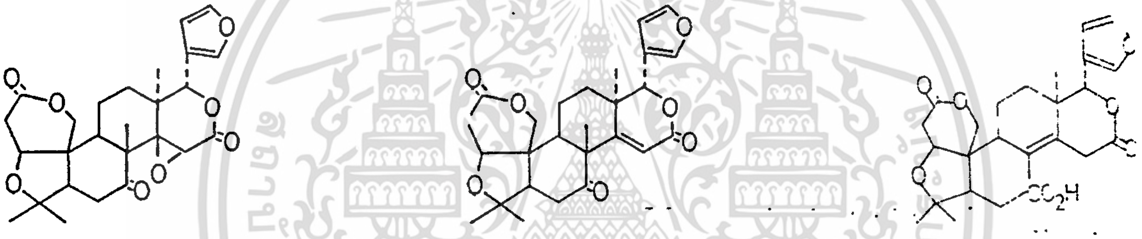
แสดงการทำงานของเอนไซม์ลิโมโนเอท-NAD(P)-ออกซิโดรีดักเทส

Hasegawa (1976)ได้แยกเอนไซม์ลิโมนินวงแหวนแลคโตนดี-ไฮโดรเลส (Limonin-D-ring lactone hydrolase) จากเชื้อ *Pseudomonas* sp. 321-18 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและแยกต่อด้วยคอลัมน์ DEAE เซลลูโลส เอนไซมืไฮโดรเลสนี้จะไฮโดรไลซ์ลิโมนินไปเป็นลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอหรือเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) โดยปฏิกิริยานี้จะทำงานได้ที่ pH 8.0 แต่หาก pH ลดลงเป็น pH 6.0 จะทำให้ปฏิกิริยาผันกลับได้คือเกิดปฏิกิริยาสร้างวงแหวนแลคโตน(Lactonization) โดยลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอจะเปลี่ยนกลับมาเป็นลิโมนิน ซึ่งเอนไซม์ไฮโดรเลสจาก *Pseudomonas* sp. 321-18 นี้ จะทำงานคล้ายกับเอนไซม์ไฮโดรเลสที่สกัดจากเมล็ดส้มเกรปฟรุต (Grapefruit seeds) ตามที่ Maier และคณะ (1969) ได้รายงานไว้ในภาพที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไฮโดรเลสจาก *Pseudomonas* sp. 321-1 และจากเมล็ดส้มเกรปฟรุต ยังสามารถไฮโดรไลซ์ โอบาคิวโนน นอมิลิน และไอชานจิน ได้ในอัตราที่เท่ากันกับการไฮโดรไลซ์ลิโมนิน แต่ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ดีออกซีลิโมนิน (Deoxy limonin) และเอนไซม์ไฮโดรเลสที่สกัดจากเมล็ดเกรปฟรุตจะมีความเสถียรต่อความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ที่สูงกว่าเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ได้จาก *Pseudomonas* sp. 321-18 ซึ่งมีเสถียรภาพต่อ ความร้อนที่ 53 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Hasegawa ยังได้รายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ดีออกซีลิโมนินไฮโดรเลสจาก *Pseudomonas* sp. 321-18 ที่สามารถไฮโดรไลซ์ดีออกซีลิโมนินไปเป็นดีออกซีลิโมนิก แอซิด ในสภาวะที่เป็นด่าง ดังภาพที่ 9 และสามารถสรุปเมแทบอลิซึมของ *Pseudomonas* sp.321-18 ที่ศึกษาวิจัยโดย Hasegawa และคณะ ได้เป็นแนววิถีทางดังแสดงในภาพที่ 10

ภาพที่ 9



ลิโมนิน → ดีออกซีลิโมนิน → ดีออกซีลิโมนิก แอซด

เอนไซม์ดีออกซีลิโมนินไฮโดรเลส

แสดงการทำงานของเอนไซม์ดีออกซีลิโมนินไฮโดรเลส

ภาพที่ 10

ลิโมนิน → ดีออกซีลิโมนิน → ดีออกซีลิโมนิก แอซิด

เอนไซม์ดีออกซีลิโมนินไฮโดรเลส

H^+ ↑↓ OH^- เอนไซม์ลิโมนินวงแหวนแลคโตนดี-ไฮโดรเลส

ลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ → 17-ดีไฮโดรลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ

เอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส

แสดงวิถีทางการเปลี่ยนแปลงของลิโมนินไปเป็นลิโมนอยด์อื่นที่เกิดใน *Pseudomonas* sp. 321-18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแบคทีเรียที่สามารถลดปริมาณลิโมนินได้ นอกจากเชื้อ *Pseudomonas sp.* แล้ว เชื้อ *Acinetobacter* sp. *Corynebacterium fascians.* และ *Rhodococcus fascians.* ก็มีความสามารถในการลดปริมาณลิโมนินได้เช่นกัน ในการนำแบคทีเรียดังกล่าวไปใช้ลดความขมในน้ำส้ม น้ำมะนาว งานวิจัยส่วนใหญ่จะประยุกต์วิธีการห่อหุ้มมาใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์เนื่องจากมีข้อดีกว่าวิธีการดูดซับในด้าน กิจกรรม (Activity) ความจำเพาะต่อสาร (Substrate specificity) ประสิทธิภาพการจับกัน (Binding efficiency) ค่าใช้จ่าย (Cost) และการประยุกต์ใช้กับอาหาร (Food grade) นอกจากนี้วิธีการห่อหุ้มยังดีกว่าวิธีการเชื่อมพันธะ ในด้านความจำเพาะต่อสารตั้งต้น การประยุกต์ใช้กับอาหาร ค่าใช้จ่าย และที่สำคัญคือ ความรุนแรงของปฏิกิริยาในการเตรียมน้อยกว่า วิธีการห่อหุ้มเซลล์ให้อยู่ภายในช่องของตาข่ายพอลิเมอร์โดยสับสเตรท (Substrate) สามารถแพร่ซึมผ่านเข้าไปในตาข่ายพอลิเมอร์ได้นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี โดยแบ่งตามลักษณะ ของการห่อหุ้ม ได้แก่ การห่อหุ้มแบบตาข่าย (Lattice type) และการห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (Microcapsule type)

การห่อหุ้มแบบตาข่ายจะอาศัยการเกิดพอลิเมอร์จากสารธรรมชาติ เช่น แป้ง (Starch) แอลจิเนต (Alginate) คาราจีแนน (Karrageenan) วุ้น (Agar) และ อะกาโรส (Agarose) เป็นต้น หรือจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น พอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinylalcohol) เป็นต้น

การห่อหุ้มแบบแคปซูล จะอาศัยวัสดุที่มีคุณสมบัติยอมให้สารผ่านเข้าไปภายในได้ แต่เซลล์จุลินทรีย์จะถูกขังรวมอยู่ไว้ภายในวัสดุที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เช่น ไนล่อน (Nylon) ไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose) ถุงไดอะไลซีส (Dialysis sac) เป็นต้น

ในกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ของแคปปาคาราจีแนนจะอาศัยความร้อน โดยขณะที่สารละลายแคปปาคาราจีแนนได้รับความร้อน แคปปาคาราจีแนนจะมีโครงสร้างแบบเฮลิกซ์ (Helix structure) หลังจากที่อุณหภูมิลดลงเท่ากับหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง แคปปาคาราจีแนนจะมีช่องว่างอยู่ภายใน คล้ายโครงร่างตาข่าย ซึ่งเซลล์สามารถถูกกักขังไว้ภายในได้ สำหรับวิธีการสกัดคาราจีแนนนั้นพบว่าสามารถสกัดได้จาก ไอริชมอสส์ (Irish moss) ซึ่งเป็นสาหร่ายสีแดง *Chondrus crispus* คาราจีแนนประกอบด้วยพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) อย่างน้อย 5 ชนิด โดยมีพอลิแซคคาไรด์ที่สำคัญคือ Kappacaragenan (แคปปาคาราจีแนน) Iotacaragenan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ไอโอตาคาราจีแนน) และAlphacaragenan(แอลฟาคาราจีแนน) นอกจากนี้คาราจีแนนยังประกอบด้วยหมู่ซัลเฟต (Sulphate group) ในปริมาณที่สูงกว่าอะการ์ (Agar) ทำให้สารละลายคาราจีแนนแข็งตัวได้ยากกว่าสารละลายอะการ์ที่อุณหภูมิและความเข้มข้นเดียวกัน แคปปาคาราจีแนนเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ส่วนใหญ่ถูกสกัดให้เหลือเฉพาะคาราจีแนนชนิดแคปปา Ramstad E.(1959)

กลไกในการเกิดเป็นพอลิเมอร์ของ อะการ์ และ อะกาโรส จะเป็นลักษณะเดียวกันกับแคปปาคาราจีแนน จากรายงานของ Ramstad E.(1959) พบว่า อะการ์ เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลสีแดง ซึ่งอยู่ในสกุล *Gelidium pterocladi* และ *Gracilaria* sp. โดยการนำสาหร่ายมาตากให้แห้ง ฟอกสีด้วยน้ำ ตากแห้งหลายๆครั้ง และนำไปต้มเดือด ซึ่งอะการ์จะมีพอลิแซคคาไรด์ 2 ชนิด คืออะกาโรส (Agarose) และอะกาโรเพคติน (Agaropectin) โดยอะกาโรสเป็นพอลิเมอร์ของกาแลคโตส (Galactose) ที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นส่วนสำคัญในการที่ทำให้อะการ์แข็งตัวเมื่ออุณหภูมิลดลง สำหรับอะกาโรเพคตินจะประกอบด้วยกาแลคโตสและกรดยูโรนิค (Uronic acid) ซึ่งบางส่วนจะถูกเอสเทอริฟาย (esterify) ด้วยกรดกำมะถัน (Sulfuric acid) ในระหว่างการสกัด

กลไกการเกิดพอลิเมอร์ของแอลจิเนตที่รายงานโดย Chibata (1978) พบว่าจะเป็นแบบไอโอโนโทรปิค (Ionotropic gelatinization) ซึ่งจะต้องมีอิออนที่มีประจุสูงอยู่ในสารละลายในระหว่างการเกิดพอลิเมอร์ของพอลิอิเลคโทรไลต์(โซเดียมแอลจิเนต) ไอออนที่มีประจุสูง ได้แก่ แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) แบเรียมอิออน (Ba^{2+}) และอะลูมิเนียมอิออน(Al^{3+}) และมักนิยมเลือกสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เนื่องจากเป็นอันตรายต่อเซลล์น้อยที่สุดและเป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยทั่วไป สำหรับการเกิดเป็นเจลจะมีการจับยึดกันระหว่างแคลเซียมอิออนกับออกซิเจนในโมเลกุลของแอลจิเนตนั้น โดยมีแคลเซียมอิออนเป็นตัวเชื่อมโมเลกุลของพอลิเมอร์ต่างสายกันและเกิดเป็นโครงร่างตาข่าย Ramstad E. (1959) ได้รายงานว่าแอลจิเนตเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่ (Giant kelp) เช่น *Laminaria digitait* ที่ขึ้นอยู่ตามฝั่งทะเลในยุโรป และ *Macrocystis pysifera* และ *Nereocystis luetkeana* ในสหรัฐอเมริกา โดยการสกัดด้วยด่างเจือจางให้อยู่ในรูปของเกลือที่ละลายน้ำได้คือโซเดียมแอลจิเนตแอลจิเนต ซึ่งเป็น พอลิเมอร์ร่วม (co-polymer) ของอนุมูลน้ำตาล 2 ชนิด คือกรดแมนนูโรนิคชนิดดี (D-mannuronic acid)และกรดกูลูโรนิคชนิดแอล (L-guluronic) ทำให้สมบัติของเจลที่ได้ มีส่วนสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายตัวของกรดทั้งสองชนิด อนุมูลน้ำตาลทั้งสองจะเชื่อมต่อกันที่คาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตำแหน่งที่ 4 แล้วจัดเรียงตัวเป็นสารพอลิเมอร์ 3 ชนิดคือ 1)พอลิแมนนูโรเนท(Polymannuronate) ที่มีกรดแมนนูโรนิคมาเรียงต่อกันอย่างเดียว 2) พอลิกูลูโรเนท (Poly guluronate) ที่มีกรดกูลูโรนิค มาเรียงต่อกันอย่างเดียว และ 3) พอลิกาแลคทูโรเนท (Polygalacturonate) ที่มีกรดแมนนูโรนิค เรียงสลับกับกรดกูลูโรนิค

Chibata (1978) รายงานเกี่ยวกับกลไกการเกิดเป็นพอลิเมอร์ของอะคริลาไมด์ พบว่าอะคริลาไมด์ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีกระบวนการสร้างพอลิเมอร์ (Polymerization) โดยใช้สารเชื่อมขวางคือ บีสอะคริลาไมด์ (N,N- methylene-bis-acrylamide) โดยสารเชื่อมขวางนี้จะเชื่อมระหว่างสายพอลิเมอร์อะคริลาไมด์ และมีแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดเป็นลักษณะโครงร่างตาข่าย

การใช้เซลล์ตรึงรูปโดยวิธีการห่อหุ้มจะทำให้กิจกรรมของเซลล์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการทำงานของเซลล์โดยอิสระ ซึ่งสาเหตุของการทำให้กิจกรรมของเซลล์ลดลง ได้แก่ 1) ข้อจำกัดในด้านการแพร่ผ่านของสารเข้าออกระหว่างภายนอกวัสดุและภายในวัสดุ ทำให้เซลล์มีโอกาสสัมผัสกับลิโมนินได้น้อยลง 2) การอยู่รวมกันอย่างหนาแน่นเกินไปของเซลล์ภายในตาข่ายหรือภายในแคปซูลทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพการทำงานลดลง และ 3) ขั้นตอนการทำให้เกิดตาข่ายในระหว่างการตรึงเซลล์ เช่นกระบวนการเกิดพอลิเมอร์ (Polymerization) อาจรุนแรงทำให้เซลล์ได้รับผลกระทบ

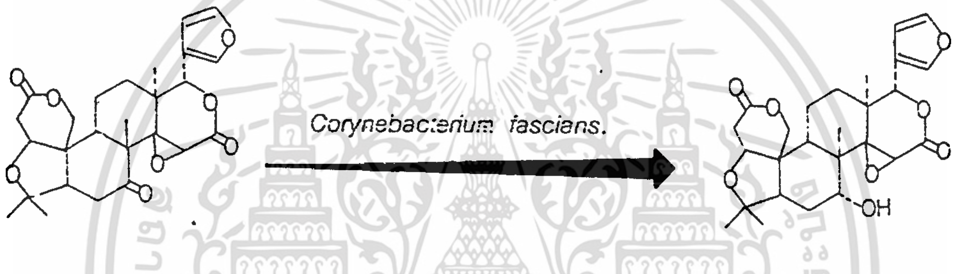
Hasegawa และคณะ(1974) ได้ตรึงเซลล์ *Acinetobocter sp.* ไว้ในถุงไดอะไลซีส โดยสามารถเมแทบอไลซ์ลิโมนินไปเป็น ดีออกซีลิโมนิน และดีออกซีลิโมนิก แอซิด ตามลำดับ สามารถลดความขมในน้ำส้มได้ โดยที่ pH และรสชาติไม่เปลี่ยนแปลง

Haesgawa และคณะ (1982,1983) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ *Arthrobacter* sp. ไว้ใน พอลิอะคริลาไมด์ เจล โดยการเปลี่ยนลิโมนิน และนอมิลิน ในน้ำส้มไปเป็น 17- ดีไฮโดรลิโมโนเอท วงแหวนแลคโตนเอซึ่งไม่ขม และไม่ต้องปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างของน้ำส้ม โดยการดำเนินการทดลองกระทำในท่อปฏิกิริยา สามารถลดลิโมนินลงได้ถึงร้อยละ 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hasegawa และคณะ (1985) รายงานถึงผลการตรึงเซลล์ *Corynebacterium fascians* ซึ่งเป็นเชื้อที่ Hasegawa และKing(1983)แยกได้จากดิน โดยการตรึงเซลล์ไว้ในพอลิอะคริลาไมด์เจลสำหรับลดความขมในน้ำส้ม โดยวิถีทางการลดลิโมนินจะเป็นไปตามภาพที่ 11 ซึ่งการวิจัยนี้ดำเนินการในท่อปฏิกิริยาที่บรรจุน้ำส้มไว้ 50 มิลลิลิตร โดยดำเนินการแบบต่อเนื่องด้วยอัตราการไหลของน้ำส้ม 100 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ผลการทดลองสามารถลดปริมาณลิโมนินลงได้ต่ำถึง 6 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำส้ม

ภาพที่ 11



แสดงเมแทบอลิซึมของ *Corynebacterium fascians*

อัจฉรา (1988) ได้รายงานถึงการทดลองใช้ *Corynebacterium fascians* ตรึงรูปในแคปปาคาราจีแนน เพื่อลดความขมอันเนื่องมาจากลิโมนินในน้ำมะนาวถนอมแบบพาสเจอไรส์ (Pastuerized lime juice) โดยพบว่าสามารถลดปริมาณลิโมนินจาก 12.21 ส่วนในล้านส่วน (ppm) เหลือเพียง 7.07 ส่วนในล้านส่วน (ppm) โดยสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เซลล์ตรึงรูปในการลดความขมจะเป็นสภาวะที่มี pH 4.0 - 5.0 อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ทั้งนี้น้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการดังกล่าว จะมีปริมาณวิตามินซี (Ascorbic acid) และ กรดซิตริก (Citric acid) ต่ำกว่าน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการเพียงเล็กน้อย

J.L.Iborra และคณะ (1994) ได้ทดลองนำเซลล์ *Rhodococcus fascians.* มาตรึงรูปในแคปปาคาราจีแนน สำหรับลดความขมจากลิโมนินในน้ำส้ม โดยดำเนินการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าการอัตราการเจือจาง (Dilution rate) ที่เท่ากับ 0.8 ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(0.8 h^{-1}) มีผลทำให้ลิโมนินลดลงได้มากที่สุดที่อุณหภูมิในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมอากาศและไม่เติมอากาศมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลิโมนินได้ ไม่แตกต่างกัน ส่วนเสถียรภาพของ *R. fascians* ตรึงรูปนี้ พบว่าสามารถดำเนินการแบบนำกลับมาใช้ได้ใหม่ติดต่อกันถึง 51 วัน รายงานที่เกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ตรึงรูปสำหรับกระบวนการลดความขมอันเนื่องมาจากลิโมนิน ได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5

แสดงรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ตรึงรูปในการลดปริมาณลิโมนิน

จุลินทรีย์	วิธีการตรึง	ผลการดำเนินงาน	อ้างอิง
Acinetobacter sp.	กักเซลล์ไว้ในถุงไดอะไลซีส โดยดำเนินการแบบกะเพื่อการลดลิโมนินที่มีอยู่เริ่มต้น 18 ส่วนในล้านส่วน	สามารถลดลิโมนินในน้ำส้มที่ pH 4.5 กิจกรรมลดลงเหลือร้อยละ 50	Hasegawa และคณะ (1978)
A. globifomis	ห่อหุ้มเซลล์ในอะคริลาไมด์ที่บรรจุไว้ในท่อโดยดำเนินการแบบกะ เพื่อลดลิโมนินที่มีอยู่เริ่มต้น 22 ส่วนในล้านส่วน	สามารถลดลิโมนินในน้ำส้มที่ pH 3.6 ลดลิโมนินได้ถึงร้อยละ 70	Hasegawa และคณะ (1982)
C. fascians	ห่อหุ้มเซลล์ในคาราจีแนนที่อยู่ในถังโดยดำเนินการแบบกะ เพื่อลดลิโมนินที่มีเริ่มต้น 12 ส่วนในล้านส่วน	สามารถลดลิโมนินในน้ำมะนาวถนอมที่ pH 4-5 ได้เหลือ 7 ส่วนในล้านส่วน	อัจฉรา และคณะ (1988)
R. fascians	ห่อหุ้มเซลล์ในคาราจีแนนที่อยู่ในท่อโดยดำเนินการแบบต่อเนื่อง เพื่อลดลิโมนินที่มีเริ่มต้น 12 ส่วนในล้านส่วน	สามารถลดลิโมนินในน้ำส้มที่ pH 4 - 5 ได้เหลือ 7 ส่วนในล้านส่วน	J.L.Iborra และคณะ (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

วัสดุ เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ

วัสดุและเคมีภัณฑ์

- จุลินทรีย์ *Rhodococcus fascians*. NRRL-B-15096
- น้ำส้มคั้นจากกากส้มสด
- เมล็ดส้มใช้สกัดสารลิโมนินสำหรับเตรียมอาหารเหลวลิโมนิน
- ลิโมนิน (HPLC grade) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.
- กลูโคส (HPLC grade) ของ Fluka Co.,Ltd.
- ซูโครส (HPLC grade) ของ Fluka Co.,Ltd.
- ฟรุคโตส (HPLC grade) ของ BDH Chemical Co.,Ltd.
- แคปปาคาราจีแนน (Food grade) ของ The Ushine Perfumary Co.,Ltd
- อะคริลาไมด์ (Laboratory grade) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.
- อะการ์ (Laboratory grade) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.
- อะกาโรส (Laboratory grade) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.
- แอลจิเนต (Laboratory grade) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.
- บีสอะคริลาไมด์ (Laboratory grade) ของ Sigma Chemical Co.,Ltd.
- Nutrient broth ของ Difco Co.,Ltd.
- คลอโรฟอร์ม (HPLC grade) ของ BAKER Chemical Co.,Ltd.
- ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4) (Laboratory grade)ของBAKER Chemical Co.,Ltd.
- โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Laboratory grade) ของ Fluka Co.,Ltd.
- แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4$) (Laboratory grade) ของ Fluka Co.,Ltd.
- โซเดียมคลอไรด์(NaCl) (Laboratory grade) ของ Fluka Co.,Ltd.
- เฟอริกคลอไรด์($FeCl_3$) (Laboratory grade) ของ Fluka Co.,Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องไฮเปอฟอร์มันซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี่ (เอชพีแอลซี) รุ่น C-R6A ของ SHIMASU
- เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตโฟโตมิเตอร์ รุ่น 8620 ของ UNICAM
- เครื่องวัดพีเอช รุ่น HM-7E ของ TOA Electronics
- เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น ZK 380 ของ CHERMLE
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น A-200s ของ Satorious
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น Bio48 ของ FASTER
- กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน รุ่น JSM-T220A ของ JEOL
- กล้องจุลทรรศน์ รุ่น YS2-H ของ Nikon
- เครื่องสั่นหลอดทดลอง(Vertex mixer) ของ Scienctific Industries
- เครื่องระเหยแบบลดความดัน(Vacuum evaporator)
. เครื่องตรวจวัดแอสคอบิค(Reflectoquant reflactometer)ของ MERCKรุ่นRQ-flex
- ท่อปฏิกรณ์แบบคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เปอริสตัลติกปั๊ม (Peristaltic pump)
- ชุดกวนสารด้วยแม่เหล็ก (Magnetic stirer)
- เครื่องเขย่า (Shaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์และการทดลอง

การเลี้ยงและการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

1. การเลี้ยงและเก็บเซลล์จุลินทรีย์ ถ่ายเชื้อ *Rhodococcus fascians* NRRL-B-15096 ปริมาณ 1 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากอาหารวุ้น (ตามภาคผนวก ก.1)ลงในอาหารเหลวฟรุคโตส (ตามภาคผนวก ก.2) โดยเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะการเลี้ยงโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะมีอายุในช่วงต้นของระยะสเตชั่นนารี่(Early stationary phase) ทำการเก็บเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยล้างเซลล์ด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7

2. การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในแคปปาคาราจีแนน เตรียมเซลล์ *Rhodococcus fascians* โดยวิธีการเลี้ยงและเก็บตามวิธีข้อ 1 เตรียมสารละลายแคปปาคาราจีแนนให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ในน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส จึงผสมเซลล์ (เซลล์แขวนลอยในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7) ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วขึ้นรูปให้เป็นเม็ดโดยใช้กระบอกฉีดยาที่มีเข็มขนาด 0.8 x 38 มิลลิเมตร ดูดสารละลายดังกล่าวหยดลงในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีการกวนอยู่ตลอดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกจากสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ จะได้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร

3. การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในอะการ์ เตรียมเซลล์ *Rhodococcus fascians* โดยวิธีการเลี้ยงและเก็บตามวิธีข้อ 1 เตรียมสารละลาย อะการ์ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)ในน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงผสมเซลล์ (เซลล์แขวนลอยในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7) ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วขึ้นรูปให้เป็นเม็ดโดยใช้กระบอกฉีดยาที่มีเข็มขนาด 0.8 x 38 มิลลิเมตร ดูดสารละลายดังกล่าวหยดลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีการกวนอยู่ตลอดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ จะได้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร

4. การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในอะกาโรส เตรียมเซลล์ *Rhodococcus fascians* โดยวิธีการเลี้ยงและเก็บตามวิธีข้อ 1 เตรียมสารละลาย อะกาโรสให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ในน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส จึงผสมเซลล์ (เซลล์แขวนลอยในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7) ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วขึ้นรูปให้เป็นเม็ดโดยใช้กระบอกฉีดยาที่มีเข็มขนาด 0.8 x 38 มิลลิเมตร ดูดสารละลายดังกล่าวหยดลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่มีการกวนอยู่ตลอดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ จะได้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร

5. การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในแอลจิเนต เตรียมเซลล์ *Rhodococcus fascians* โดยวิธีการเลี้ยงและเก็บตามวิธีข้อ 1 เตรียมสารละลายโซเดียมแอลจิเนตให้มีความเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ในน้ำกลั่น แล้วนำไปฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 45 องศาเซลเซียส จึงเติมเซลล์ (เซลล์แขวนลอยในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7) ลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วขึ้นรูปให้เป็นเม็ดโดยใช้กระบอกฉีดยาที่มีเข็มขนาด 0.8 x 38 มิลลิเมตร ดูดสารละลายดังกล่าวหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่มีการกวนอยู่ตลอดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกจากสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะได้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร

6. การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในอะคริลาไมด์ เติมส่วนผสมสารละลายอะคริลาไมด์ (ตามภาคผนวก ก.4) ลงในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH7 ที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ แล้วขึ้นรูปเป็นเม็ดโดยใช้กระบอกฉีดยาที่มีเข็มขนาด 0.8 x 38 มิลลิเมตร โดยให้หยดลงในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7 ที่มีการกวนอยู่ตลอด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแยกเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกจากสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟต จะได้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การวิเคราะห์</u>

1. วิธีการหาปริมาณลิโมนินด้วย เอชพีแอลซี (HPLC or High Performance Liquid Chromatography) ตามวิธีของ Rouseff and Fisher (1980) สกัดลิโมนินจากตัวอย่างน้ำส้ม 1 มิลลิลิตร ด้วยคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร จากนั้นระเหยคลอโรฟอร์มให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติมคลอโรฟอร์ม ลงไป 200 ไมโครลิตร ตั้งระบบที่เครื่องเอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล (nitrile or CN type techsphere 5 CN ขนาด 5 ไมครอน) ขนาด 4.5 x 250 mm. อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตร โดยใช้ยูวีดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่นที่ 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร

2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ซูโครส และ ฟรุคโตส ด้วย เอชพีแอลซี นำตัวอย่างน้ำส้ม 2 มิลลิลิตร ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จากนั้นแยกส่วนใสของน้ำส้มมากรองผ่านเยื่อเซลลูโลสอะซิเตท ตั้งระบบที่เครื่องเอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ CLC-NH_2 ขนาด 4.6 x 250 mm. ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นอะซีโตไนไทร์ลเข้มข้นร้อยละ 77.44 และใช้อาร์ไอดีเทคเตอร์ (Reflective Index) และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 10 ไมโครลิตร

3. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่องตรวจวัดวิตามินซี (Reflectoquant reflac tometer) นำตัวอย่างน้ำส้ม 2 มิลลิลิตร ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แยกเฉพาะส่วนใสของน้ำส้ม แล้ววัดแอสคอบิคด้วย เครื่องตรวจวัดปริมาณของวิตามินซี (Reflectoquant reflactometer) ของ MERCK รุ่น RQ-flex

4. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริก ตามวิธีของ Pearson (1976) นำตัวอย่างน้ำส้ม 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน 0.1 นอร์มอล โดยมีฟีนอฟพธาลีนเป็นสารบ่งชี้ (Indicator) จากนั้นคำนวณหาร้อยละของกรดซิตริกจากสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละของ = ความเข้มข้นของ NaOH x ปริมาตรของ NaOH(มิลลิลิตร) x มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดซิตริก
กรดซิตริก ปริมาณของน้ำส้ม (มิลลิลิตร)

ร้อยละของกรดซิตริก = 0.1 x ปริมาตรของ NaOH ที่ถูกใช้ไป(มิลลิลิตร) x 3
1

5. วัดค่า pH ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ โดยนำน้ำส้มมาตรวจหาความเป็นกรดและด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์สามตำแหน่ง

การศึกษาผลของอากาศที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม

ดำเนินการทดลองที่สภาวะไม่มีการเติมอากาศในน้ำส้ม และ สภาวะที่มีการเติมอากาศลงไปในน้ำส้มโดยการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มที่เวลาผ่านไป 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ชักนำให้ *R. fascians* มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน

เลี้ยงและเก็บเกี่ยวเซลล์จุลินทรีย์จากอาหารเหลวฟรุคโตส (ตามภาคผนวก ก.2) แล้วนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวลิโมนิน (ตามภาคผนวก ก.3) เป็นระยะเวลาต่างๆกัน ได้แก่ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวลิโมนินด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้เซลล์ 1.0 กรัม (น้ำหนักเปียก) ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้ววัดกิจกรรม (Activity) ของจุลินทรีย์ที่ผ่านการชักนำให้เมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนินในระยะเวลา ต่างๆกัน ดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การเปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ *R. fascians*</u>

เตรียม *R. fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึง 5 ชนิด ได้แก่ แคปปาคาราจีแนน อะการ์ อะกาโรส แอลจิเนต และ อะคริลาไมด์ โดยกำหนดให้วัสดุตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เป็น 1.0 กรัม (น้ำหนักเปียก) และอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และวัสดุตรึงเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก และเตรียมเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ใช้ปริมาณของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยวิเคราะห์หาร้อยละของลิโมนินที่ลดลงทุก 30 นาที และทดสอบความคงตัวของเม็ดเจล ด้วยการกดทับด้วยน้ำหนัก 500 กรัมต่อจำนวนเม็ดเจล 4 เม็ด แล้วแบ่งการให้คะแนนเป็น 3 ระดับโดยระดับที่ 1 เม็ดเจลไม่มีรอยแตก ระดับที่ 2 พบรอยแตกไม่เกินสองแห่ง และระดับที่ 3 พบรอยแตกมากเกินสองแห่ง และหาค่าคงที่การดูดซับลิโมนินของวัสดุตรึงแต่ละชนิดจากสมการความสัมพันธ์ของแลงมัวร์ Langmuir equation (Johnson และ Chandler 1987) จากนั้นเปรียบเทียบกิจกรรม ความคงตัว และค่าคงที่การดูดซับลิโมนินของเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึงทั้ง 5 ชนิด

สมการของแลงมัวร์ $Q = aC / (1+bC)$

โดย Q = ความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำส้มหลังการดูดซับด้วยวัสดุตรึง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

C = ความเข้มข้นของลิโมนินที่ถูกดูดซับด้วยวัสดุตรึง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

a = ค่าคงที่ของการดูดซับลิโมนิน (ไม่มีหน่วย)

b = ค่าคงที่ของการดูดซับลิโมนิน (ลิตรต่อมิลลิกรัม)

<u>การศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้ *R. fascians* ตรึงรูปสำหรับลดปริมาณลิโมนินแบบกะ (Batch)</u>

1. การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และแคปปาคาราจีแนน

เตรียม *R. fascians* ตรึงรูปโดยใช้เซลล์ 1.0 กรัม (น้ำหนักเปียก) ผสมกับสารละลายของแคปปาคาราจีแนนตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) แล้วแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์จุลินทรีย์และวัสดุตรึงเป็น 1 : 3 1 : 5 1 : 7 และ 1 : 9 โดยน้ำหนักตามลำดับ เตรียมเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วให้ *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยวิเคราะห์หาร้อยละของลิโมนินที่ลดลงทุก 30 นาที

2. การหาขนาดที่เหมาะสมของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป ที่มีผลต่อการลดปริมาณลิโมนิน เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้สารละลายของวัสดุตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และวัสดุตรึง แปรผันขนาดของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป โดยการฉีดผ่านเข็มให้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 3 4 5 และ 6 มิลลิเมตร ตามลำดับ แล้วใช้ปริมาณของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม ที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูปโดยวิเคราะห์หาร้อยละของลิโมนินที่ลดลงทุก 30 นาที

3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* ตรึงรูป ในน้ำส้ม เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม และใช้ปริมาณของ *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยวิเคราะห์หาร้อยละของลิโมนินที่ลดลงทุก 30 นาที เปรียบเทียบกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปกับกิจกรรมของ *R. fascians* อิสระ

4. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป กำหนดภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์เป็น 4 ระดับคือ 0.25 0.50 1.0 และ 2.0 โมลาร์ แล้วใช้ปริมาณ *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยวิเคราะห์หาร้อยละของลิโมนินที่ลดลง เมื่อเวลาผ่านไป 1.5 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงของวัสดุตรึง เตรียม *R. fascians* ตรึงรูปโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม และใช้ปริมาณ *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าด้วยความเร็วรอบ 140 รอบต่อนาที แล้วกรองเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกพร้อมกันทั้ง 5 ตัวอย่าง จากนั้นนำน้ำส้มจากตัวอย่างมาวัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป ที่เวลา 0 15 30 60 และ 90 นาที ตามลำดับ โดยวิเคราะห์หาร้อยละของลิโมนินที่ลดลง ณ เวลาต่างๆดังกล่าว

6. การศึกษาโครงสร้างของ *R. fascians* ตรึงรูป โดยเปรียบเทียบโครงสร้างของวัสดุตรึงที่ปราศจากจุลินทรีย์ เตรียมเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปโดยนำมาทำให้เป็นแผ่นบางๆ แล้วแช่ในสารละลาย กลูตารอลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง เทสารละลายกลูตารอลดีไฮด์ออก แล้วเติมสารละลายออกเมียมเตตรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร นาน 3 ชั่วโมง เทสารละลายออกเมียมเตตรอกไซด์ออก ระเหยน้ำบางส่วนออกจาก *R. fascians* ตรึงรูปด้วยสารละลายแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นอบ *R. fascians* ตรึงรูปให้แห้ง แล้วเคลือบทองด้วยเครื่องเคลือบแบบบางเป็นพิเศษนาน 5 นาที และตรวจดูโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนที่กำลังขยาย 5,000 เท่า และ 10,000 เท่า

<u>การศึกษาจลนพลศาสตร์ของ *R. fascians* ตรึงรูป</u>

1. เปรียบเทียบกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่ pH ระดับต่างๆ กันเตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมและใช้ปริมาณ *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม 64 มิลลิลิตร ที่มี pH ระดับต่าง ๆ กัน คือ 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 และ 12 เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป เตรียม *R. fascians* อิสระจำนวน 1.0 กรัม (น้ำหนักเปียก) แล้วทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม 64 มิลลิลิตร โดยใช้ภาวะดำเนินการเดียวกับ *R. fascians* ตรึงรูป วัดกิจกรรมของ *R. fascians* อิสระ เปรียบเทียบกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เปรียบเทียบกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ ที่อุณหภูมิระดับต่างๆเตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม และให้ปริมาณ *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม 64 มิลลิลิตร ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆกัน คือ 10 20 28 35 45 55 65 และ 75 องศาเซลเซียส วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป เตรียม *R. fascians* อิสระจำนวน 1.0 กรัม (น้ำหนักเปียก) แล้วทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม 64 มิลลิลิตร ที่สภาวะดำเนินการเดียวกับ *R. fascians* ตรึงรูป วัดกิจกรรมของ *R. fascians* อิสระ เปรียบเทียบกิจกรรมสัมพัทธ์ระหว่าง *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ

3. การหาค่า K_m และ V_{max} ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม และใช้ *R. fascians* ตรึงรูป 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม 64 มิลลิลิตร โดยการแปรผันความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำส้มด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของ *R. fascians* ตรึงรูป เตรียม *R. fascians* อิสระจำนวน 1.0 กรัม (น้ำหนักเปียก) ทำปฏิกิยากับน้ำส้ม โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับ *R. fascians* ตรึงรูป และแปรเปลี่ยนความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำส้ม ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของ *R. fascians* อิสระ หาค่า K_m และ V_{max} โดยคำนวณหาความเข้มข้นของลิโมนิน (หน่วยเป็นไมโครโมล) และคำนวณหาอัตราเร็วในการลดปริมาณลิโมนิน (หน่วยเป็นไมโครโมลต่อนาที) นำค่าความเข้มข้นของลิโมนินและค่าอัตราเร็วในการลดปริมาณลิโมนิน มาเขียนเป็นกราฟไลน์วีฟเฟอเบิร์ก(Lineweaver burk) และเปรียบเทียบเส้นกราฟไลน์วีฟเฟอเบิร์กของ *R. fascians* ตรึงรูป และ*R. fascians* อิสระแล้วคำนวณหาค่าของ K_m และ V_{max} จากกราฟ

4. การศึกษาเสถียรภาพในการเก็บ *R. fascians* ตรึงรูปและหาค่าครึ่งชีวิต เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม ในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ศึกษาเปรียบเทียบเสถียรภาพในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 3 5 7 10 15 20 30 40 50 60 70 และ 80 วัน โดยการวัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH ที่เหมาะสมที่อุณหภูมิห้อง หาค่าครึ่งชีวิตของ *R. fascians* ตรึงรูป โดยพิจารณาจากค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงเป็นครึ่งหนึ่งของค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาภาวะดำเนินการในการใช้ *R. fascians* ตรึงรูป สำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม แบบต่อเนื่องในท่อปฏิกรณ์</u>

1. การหาอัตราการไหลของน้ำส้มที่เหมาะสม เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมและใช้ปริมาณ *R. fascians* ตรึงรูป 60 มิลลิลิตร บรรจุลงท่อปฏิกรณ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร แล้วให้ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งควบคุมปริมาตรบรรจุในท่อปฏิกรณ์เป็น 48 มิลลิลิตร โดยผันแปรอัตราการไหลของน้ำส้มเป็น 17.5 25 35 50 100 และ 200 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป โดยการหาร้อยละของลิโมนิน ที่ลดลงที่ระดับอัตราการไหลต่างๆ กันดังกล่าว และกำหนดน้ำส้มให้มีความเข้มข้นเป็น 3 ระดับ คือ น้ำส้มเข้มข้นร้อยละ 100 75 และ 50 (โดยปริมาตร)

2. การศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการดำเนินการ เตรียม *R. fascians* ตรึงรูปโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม และใช้ปริมาณ *R. fascians* ตรึงรูป 60 มิลลิลิตร บรรจุลงท่อปฏิกรณ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร แล้วให้ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งควบคุมปริมาตรบรรจุในท่อปฏิกรณ์เป็น 48 มิลลิลิตร โดยการใช้อัตราการไหลที่เหมาะสม และผันแปร pH ของน้ำส้มที่ใช้เป็น 2 3 4 5 6 7 8 9 10 และ 11 วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป โดยการหาร้อยละของลิโมนินที่ลดลง

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการดำเนินการ เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม และใช้ปริมาณ *R. fascians* ตรึงรูป 60 มิลลิลิตร บรรจุลงท่อปฏิกรณ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร แล้วให้ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งควบคุมปริมาตรบรรจุในท่อปฏิกรณ์เป็น 48 มิลลิลิตร โดยการใช้อัตราการไหลที่เหมาะสมและผันแปร อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองเป็น 10 20 28 35 45 55 และ 65 องศาเซลเซียส วัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยการหาร้อยละของลิโมนินที่ลดลง

4. การหาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยา เตรียม *R. fascians* ตรึงรูป โดยใช้ภาวะในการเตรียมที่เหมาะสม และใช้อัตราการไหลของน้ำส้มที่เหมาะสม โดยผันแปรอัตราการเติมอากาศในน้ำส้มด้วยอัตราการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 50 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ วัดกิจกรรมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R. fascians ตรึงรูปโดยการหาร้อยละของลิโมนินที่ลดลงที่อัตราการเติมอากาศที่ต่างๆกันดังกล่าว

5. การศึกษาการนำ *R. fascians* ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกัน เตรียม *R. fascians* ตรึงรูปโดยใช้ภาวะในการเตรียมที่เหมาะสม และใช้อัตราการไหลของน้ำส้มที่เหมาะสม ดำเนินการทดลองโดยนำ *R. fascians* ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกัน แล้ววัดกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยการหาร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของทุกครั้ง โดยก่อนนำ *R. fascians* ตรึงรูปไปใช้ในครั้งต่อไปให้ล้างเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปด้วยโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ pH 7

6. การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ ลิโมนิน กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก วิตามินซี และ pH ของน้ำส้มหลังจากผ่านกระบวนการลดลิโมนิน ดำเนินการทดลองลดปริมาณลิโมนิน โดยวัดปริมาณของ ลิโมนิน กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก กรดแอสคอบิค และ pH ในน้ำส้มทั้งก่อนและหลังการทำปฏิกิริยากับ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ ที่ใช้อัตราการไหลและควบคุมภาวะในการทดลองที่เหมาะสม แล้วหาค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของลิโมนิน กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก วิตามินซี และ pH ในน้ำส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปราย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ *Rhodococcus fascians*

ลักษณะทั่วไปของเซลล์ *Rhodococcus fascians* NRRL-B-15096 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Brain Heart Infusion Agar (ตามภาคผนวกที่ ก.1) จะพบว่ามีโคโลนีสีส้ม โดยแสดงดังภาพที่ 12 เซลล์ *Rhodococcus fascians* เป็นแบคทีเรียกรัมบวก (Gram positive) ไม่สร้างสปอร์ และต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Aerobic bacteria) ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์ *R. fascians* ในการทดลองนี้ จะเลี้ยงในอาหาร Brain Heart Infusion Agar ก่อนที่จะเพิ่มปริมาณของเซลล์ โดยการเลี้ยงในสูตรอาหารเหลวที่ดัดแปลงมาจากวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Rhodococcus fascians* ของ Hasegawa และคณะ(1983) โดยมีฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน และมีนิวเทรียนบรอท ตามภาคผนวก ก.2 ซึ่งจากการทดลองพบว่าอัตราการเจริญของเชื้อเมื่อควบคุมสภาวะการเลี้ยง โดยการเขย่าที่ความเร็ว 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง แสดงได้ตามกราฟในภาพที่ 13 โดยเวลาที่ 48 ชั่วโมง จะพบว่ามีปริมาณเซลล์สูงสุดเป็น 5.5 กรัม (น้ำหนักเปียก) ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ (μ) จะเริ่มเข้าสู่ค่าคงที่ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 48 ชั่วโมงเพื่อนำเซลล์มาใช้ในการทดลองต่อไป

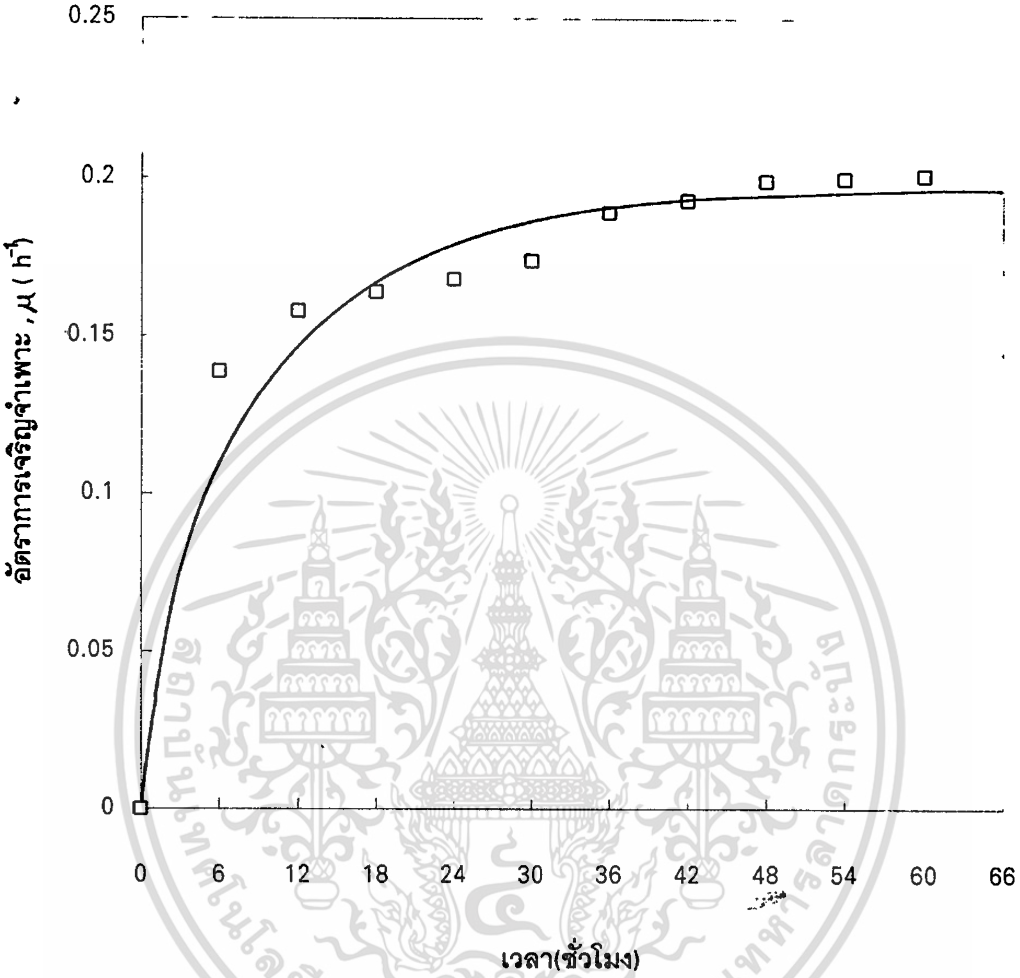
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 12

แสดงลักษณะโคโลนีของ *Rhodococcus fascians* ที่เจริญบนอาหาร Brain heart infusion agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 13



แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ที่เจริญในอาหารเหลวที่มีฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีนิวเทรียนบรอท

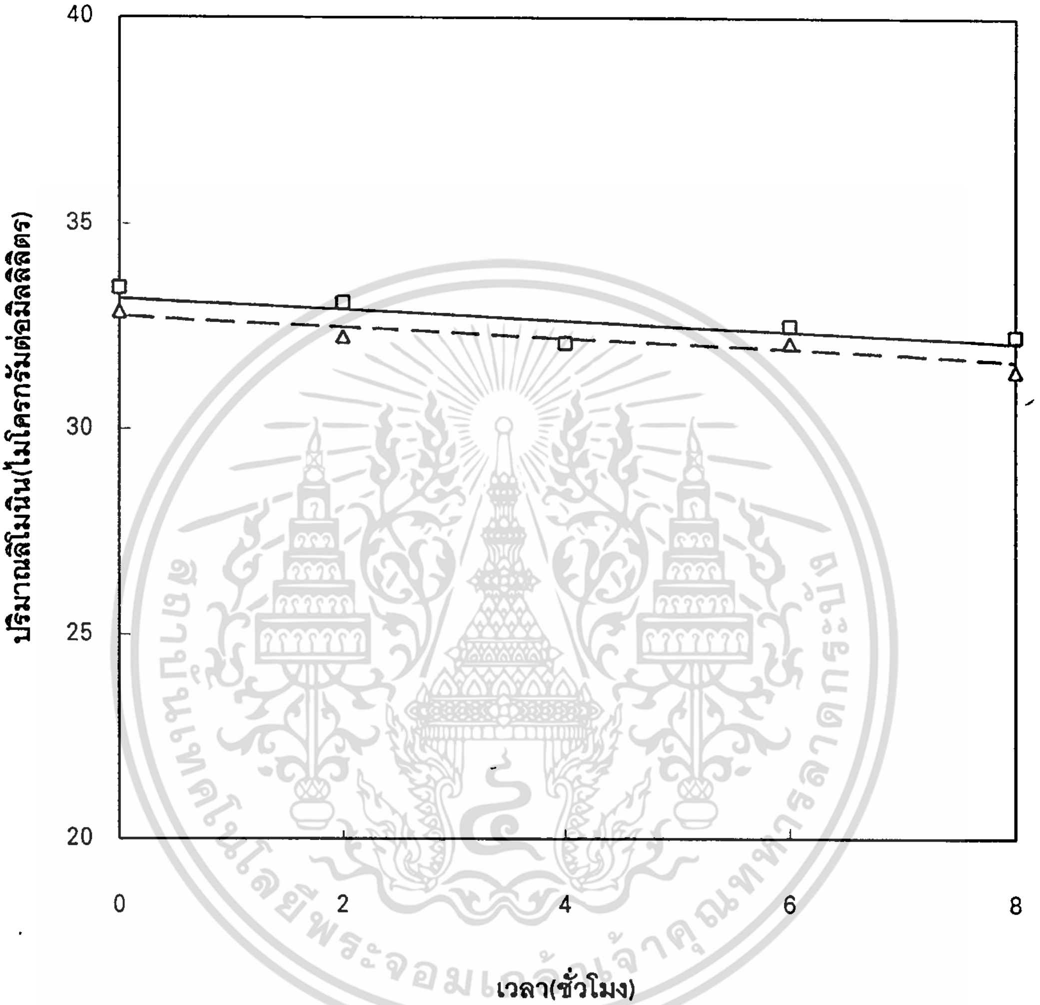
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาผลของอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม

จากการศึกษาผลของอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม ที่เวลา 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมง ตามการทดลอง แสดงได้ดังกราฟในภาพที่ 14 ซึ่งจากการทดลองพบว่าระหว่างสภาวะที่ควบคุมไม่ให้มีการเติมอากาศและสภาวะที่มีการเติมอากาศ การลดลงของปริมาณลิโมนินไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่เวลาผ่านไป 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมง แต่ถ้ายังมีการเติมอากาศลงในน้ำส้มโดยการดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง และใช้ระยะที่มากกว่า 8 ชั่วโมง อาจมีผลทำให้ปริมาณลิโมนินในน้ำส้มลดลง เนื่องจากออกซิเจนจากอากาศที่ถูกเติมลงไปในน้ำส้ม สามารถ ทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Oxidation reaction) กับลิโมนินได้ โดยออกซิเจนจากอากาศจะไปออกซิไดซ์วงแหวนฟูราน (Furan ring) ของลิโมนิน ได้เป็นกรดลิโมเนซิก (Limonexic acid) ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นในน้ำส้มนี้จะมีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Photosensitised air oxidation) Melera และคณะ (1957) นอกจากนี้ออกซิเจนยังสามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารที่ทำให้เกิดรส และ กลิ่น ในน้ำส้ม ได้แก่ อัลดีไฮด์ (Aldehydes) เอสเทอร์(Esters) คีโตน (Ketones) และ แอลกอฮอล์ (Alcohols) ซึ่งมีผลทำให้น้ำส้มมีรสชาติ และ กลิ่น ที่เปลี่ยนไป ถึงแม้ว่าในสภาวะที่มีการเติมอากาศในน้ำส้มเป็นเวลานานจะทำให้ปริมาณลิโมนินมีการเปลี่ยนแปลงลดลง แต่ผลของรสชาติ และกลิ่น ที่เปลี่ยนแปลงไปของน้ำส้มย่อมไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และการเติมอากาศลงไปในน้ำส้ม ยังมีโอกาสปนเปื้อนจากเชื้ออื่นที่อาจทำให้เกิดการเน่าเสียของน้ำส้มได้ ในการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการลดปริมาณลิโมนินโดยท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นในงานวิจัยนี้ ไม่ต้องการที่จะใช้เวลาที่นานสำหรับกระบวนการลดปริมาณลิโมนิน และจะใช้ระยะเวลาในการดำเนินการลดปริมาณลิโมนินโดยผ่านระบบของท่อปฏิกรณ์ไม่เกิน 8 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นและช่วยลดปัญหาของ รสชาติ และกลิ่น ที่เปลี่ยนแปลงไปจากการถูกออกซิไดซ์โดยออกซิเจนในอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 14



แสดงผลของการเติมอากาศ (Δ) และการไม่เติมอากาศ (□) ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม โดยการเติมอากาศจะควบคุมด้วยการกวนของแท่งแม่เหล็กที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ชักนำให้ *R. fascians* มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน</u>

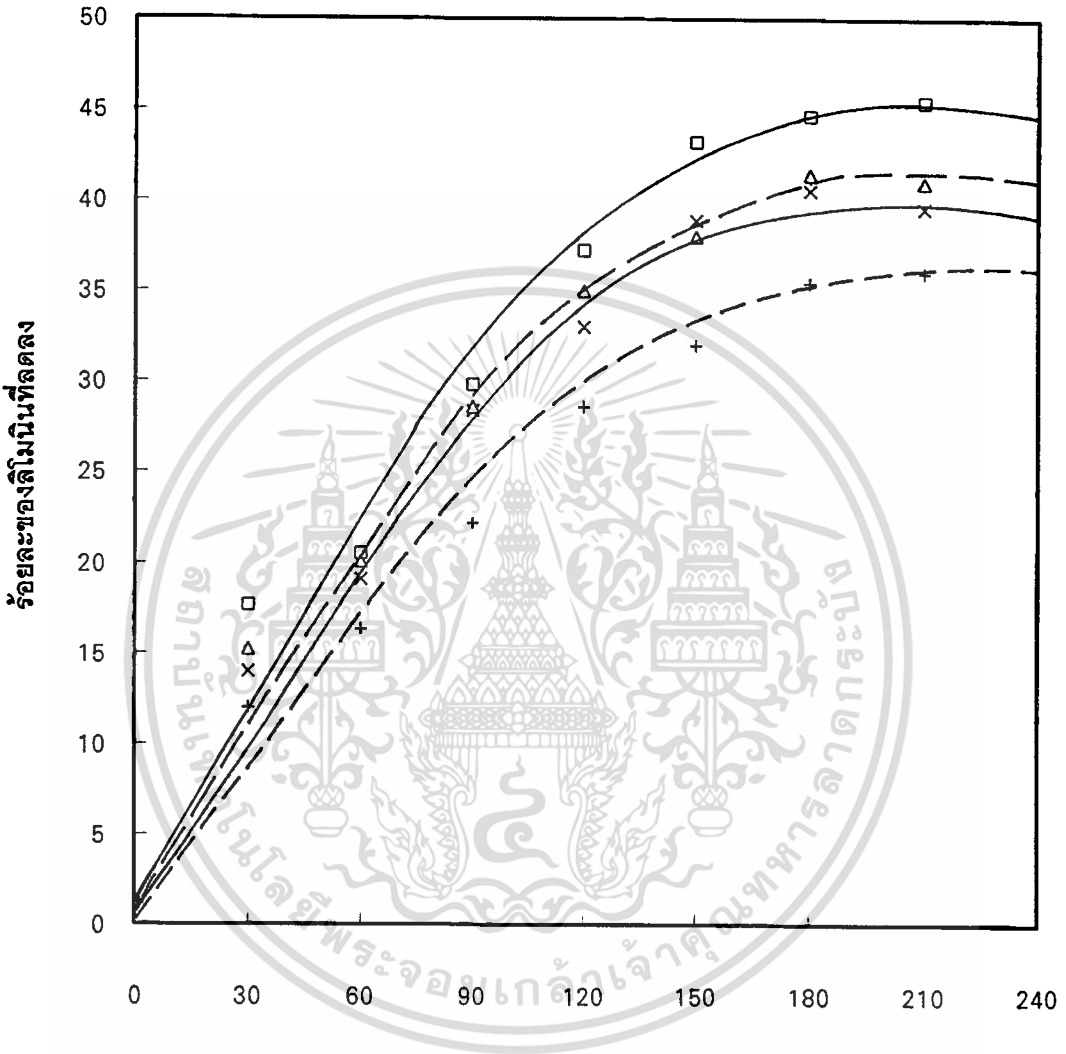
จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งมีการชักนำให้ *R. fascians* มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน โดยการเลี้ยง *R. fascians* ที่ได้ ในอาหารเหลวลิโมนิน (ตามภาคผนวกที่ ก.3) เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดกิจกรรมหรือค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนิน แสดงดังกราฟในภาพที่ 15 ซึ่งจากการทดลองพบว่า ผลของระยะเวลาที่ชักนำให้ *R. fascians* มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วย LSD (Least Significant Difference) ที่ 0.05 และ LSD ที่ 0.01 พบว่า การชักนำที่ 6 ชั่วโมง จะทำให้ *R. fascians* มีกิจกรรมสูงสุดและสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 44.65 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 180 นาที สำหรับการชักนำที่ 4 ชั่วโมง และการชักนำที่ 2 ชั่วโมง *R. fascians* จะมีกิจกรรมที่ไม่แตกต่างกันแต่จะต่ำกว่าการชักนำที่ 6 ชั่วโมง โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 41.46 และ 40.53 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 180 นาที ส่วนที่ไม่มีการชักนำ (0 ชั่วโมง) *R. fascians* จะมีกิจกรรมต่ำสุด โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 35.02 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 210 นาที และจากการพิจารณาอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนิน (ในช่วง 30 - 90 นาที) พบว่าการชักนำที่ 6 ชั่วโมง การชักนำที่ 4 ชั่วโมง และการชักนำที่ 2 ชั่วโมง จะมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินเป็น 0.240 0.223 และ 0.203 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และ *R. fascians* ที่ไม่ผ่านการชักนำจะมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินต่ำสุดคือ 0.169 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที จากการเปรียบเทียบผลของอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินพบว่าลิโมนินมีผลชักนำให้ *R. fascians* มีกิจกรรมต่อการลดปริมาณลิโมนิน และทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินสูงกว่า *R. fascians* ที่ไม่ผ่านการชักนำโดยลิโมนิน เนื่องจาก *R. fascians* จะต้องปรับตัวเป็นระยะเวลาช่วงหนึ่งให้เข้ากับสภาพของน้ำส้ม ก่อนที่ *R. fascians* จะเริ่มใช้ลิโมนินในน้ำส้มเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นช่วงระยะเวลาสำหรับการปรับตัวของ *R. fascians* ที่ผ่านการชักนำจึงน้อยกว่า ช่วงระยะเวลาในการปรับตัวของ *R. fascians* ที่ไม่ผ่านการชักนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hasegawaและคณะ (1985) ได้รายงานพบว่า เอนไซม์ลิโมนอลดีไฮโดรจีเนส (Limonol dehydrogenase) ที่พบใน *R. fascians* เป็นเอนไซม์ที่อาศัยการชักนำจากลิโมนิน ในการเปลี่ยนลิโมนินไปเป็นลิโมนอล (Limonol) หรือ 7-αไฮดรอกซีลิโมนอยด์ (7-α Hydroxylimonoid) และจากการศึกษาของ Hasegawa และคณะ (1972) ได้รายงานไว้เกี่ยวกับเอนไซม์ลิโมนินอิพอกไซเดส (Limoninepoxidase) และเอนไซม์ดีออกซีลิโมนินไฮโดรเลส (Deoxy limonin hydrolase) ที่สามารถเปลี่ยนลิโมนินให้เป็นดีออกซีลิโมนอยด์ (Deoxylimonoid) ที่ได้แก่ ดีออกซีลิโมนิน(Deoxylimonin) และดีออกซีลิโมโนเอท (Deoxylimonoate) ตามลำดับ ในส่วนของเอนไซม์ลิโมนินอิพอกไซเดส และเอนไซม์ดีออกซีลิโมนินไฮโดรเลสที่พบใน *R. fascians* ยังไม่มีรายงานแน่ชัดว่าเป็นเอนไซม์ที่ต้องอาศัยลิโมนินเป็นตัวชักนำให้เกิดเมแทบอลิซึม แต่จากรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ทั้งสองที่พบในแบคทีเรียอื่นนั้น ต้องการลิโมนินในการชักนำให้เกิดเมแทบอลิซึม และจากรายงานของ Hasegawa และBennett (1972) พบว่าเอนไซม์ทรานส์อิลิมิเนส (Transeliminase) เป็นเอนไซม์ไลเอส (Lyase) ที่สามารถเปลี่ยนลิโมนินเป็นทรานส์-19 -ไฮดรอกซีโอบาคิวโนน (trans-19-Hydroxyobacunone) และเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องอาศัยการชักนำโดยลิโมนิน Hasegawa และKing (1983)ได้รายงานว่าเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส (Limonoatedehydrogenase) เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของลิโมนินไปเป็น 17-ดีไฮโดรลิโมนอยด์(17-Dehydrolimonoid) และเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องการลิโมนิน เป็นตัวชักนำเช่นเดียวกับเอนไซม์ทรานส์อิลิมิเนส ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการทำให้เซลล์มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้จึงอาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ลิโมนอลดีไฮโดรจีเนส เนื่องจากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า *R. fascians* ที่ผ่านการชักนำ จะมีกิจกรรมและอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินที่สูงกว่า *R. fascians* ที่ไม่มีการชักนำ จากการทดลองนี้จึงเลือกระยะเวลา 2 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำเซลล์ *R. fascians* ก่อนนำเซลล์ไปตรึงรูปต่อไป เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ไม่นานเกินไปและสามารถชักนำให้ *R. fascians* มีกิจกรรมได้สูงและแตกต่างจากจุลินทรีย์ที่ไม่มีการชักนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 15



แสดงกิจกรรมของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ที่ผ่านการชักนำในอาหารเหลวลิโมนินที่ระยะเวลาต่างๆ คือ ไม่ผ่านการชักนำ (+) 2 ชั่วโมง (X) 4 ชั่วโมง (Δ) และ 6 ชั่วโมง (□) โดยใช้ปริมาณเซลล์ 1 กรัม (น้ำหนักเปียก) ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>**การเปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ *R. fascians***</u>

จากการเปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์ *R. fascians* โดยการตรึง *R. fascians* ในแคปปาคาราจีแนน อะการ์ อะกาโรส แอลจิเนต และอะคริลาไมด์ พบว่ากิจกรรมหรือค่าของร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึงทั้ง 5 ชนิด ที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากัน 4 มิลลิเมตร แสดงดังกราฟในภาพที่ 16 นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วย LSD ที่ 0.05 และ LSD ที่ 0.01 พบว่า *R. fascians* ตรึงรูปในแคปปาคาราจีแนนและในอะการ์ จะมีกิจกรรมที่ไม่แตกต่างกันและมีกิจกรรมสูงกว่า *R. fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึงชนิดอื่น โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 30.02 และ 32.77 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 210 นาที ตามลำดับ สำหรับ *R. fascians* ตรึงรูปในอะกาโรสและอะคริลาไมด์ จะมีกิจกรรมที่ใกล้เคียงกัน โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 28.1 และ 28.84 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 210 นาที ตามลำดับ และ *R. fascians* ตรึงรูปในแอลจิเนตจะมีกิจกรรมต่ำที่สุด โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 24.0 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 210 นาที และจากการทดลองยังพบว่า มีการละลายเกิดขึ้นของเม็ดเจลแอลจิเนตในระหว่างการทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม สำหรับอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนิน (ในช่วงเวลาการทำปฏิกิริยา 30 - 90 นาที) พบว่า*R. fascians* ตรึงรูปในแคปปาคาราจีแนนมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินสูงที่สุดคือ 0.177 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที และอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินของอะการ์ และอะกาโรส เป็น 0.134 และ 0.115 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ สำหรับแอลจิเนตและอะคริลาไมด์จะมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินที่ต่ำคือ 0.090 และ 0.083 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

การที่ *R. fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึงดังกล่าวมีกิจกรรมที่แตกต่างกัน เป็นเพราะว่าเซลล์ *R. fascians* ได้รับผลอันตรายจากการขึ้นรูปให้เป็นเม็ดเจลที่ไม่เหมือนกัน โดยในการขึ้นรูปให้เป็นเม็ดเจลของ แคปปาคาราจีแนน อะการ์ และ อะกาโรส จะอาศัยความร้อนในการทำให้แคปปาคาราจีแนน อะการ์ และอะกาโรส สามารถละลายได้ และจะผสม *R. fascians* ลงไปในขณะที่อุณหภูมิของสารละลายลดลงเหลือ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจะควบคุมอุณหภูมินี้ไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

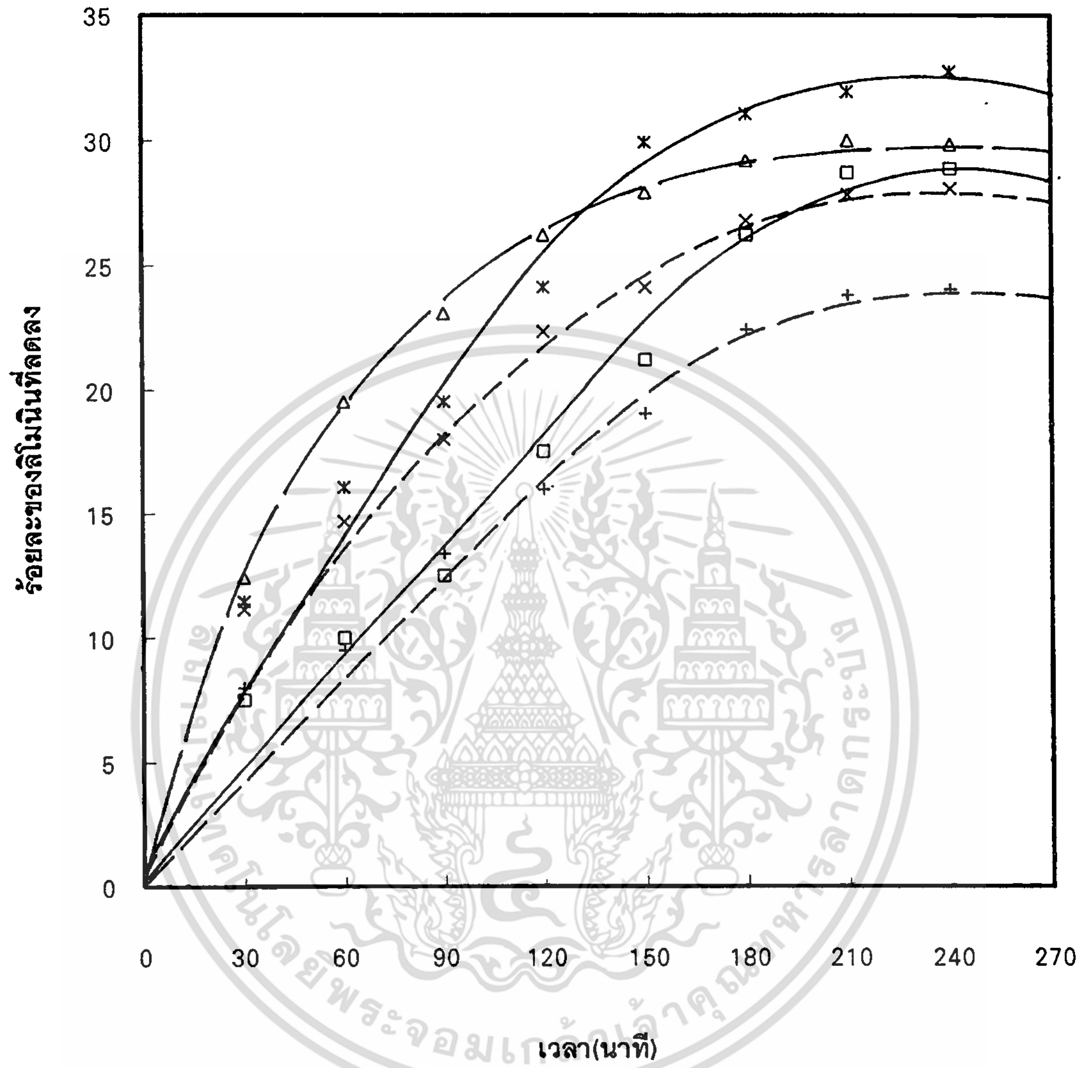
ตลอดในระหว่างการขึ้นรูป ดังนั้นความร้อนในช่วงระยะเวลาการขึ้นรูปดังกล่าวอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้บ้าง ส่วนการขึ้นรูปเป็นเม็ดของแอลจิเนต จะอาศัยกลไกการเกิดเจลแบบไอโอโนโทรปิค (Ionotropic gelatinization) โดยการใช้อิออนที่มีประจุสูงคือแคลเซียมอิออนในการสร้างพอลิเมอร์ของแอลจิเนต Chibata (1978) แคลเซียมอิออนที่อยู่ในสารละลายจะมีผลทำให้ *R. fascians* ได้รับอันตรายได้ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการละลายของแอลจิเนตซึ่งได้แก่ค่า pH ที่เหมาะสม โดยค่า pH ที่ต่ำกว่า 5 จะทำให้เม็ดเจลของแอลจิเนตเกิดการละลาย และผลของสารละลายที่มีอิออนที่มีความเข้มข้นอยู่สูง ที่ได้แก่ ซิเตรท (Citrate) ฟอสเฟต (Phosphate) โปตัสเซียม (K^+) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) โดยเฉพาะซิเตรทที่มีอยู่มากในน้ำส้มจะมีผลทำให้เม็ดเจลแอลจิเนตเกิดการละลายและไม่เหมาะสมที่จะเลือกใช้แอลจิเนตเป็นวัสดุตรึง เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพการตรึงลดลงเนื่องจากการหลุดของ *R. fascians* และยังทำให้แอลจิเนตละลายปนอยู่ในน้ำส้มซึ่งเป็นปัญหาต่อการแยกทั้งเซลล์และแอลจิเนตหลังกระบวนลดปริมาณลิโมนิน สำหรับการขึ้นรูปเป็นเม็ดเจลของอะคริลาไมด์ จะอาศัยสารเชื่อมขวางในการสร้างพอลิเมอร์ ที่เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้มากกว่าการขึ้นรูปของเม็ดเจลคาราจีแนน อะการ์ และอะกาโรส จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าตั้งแต่เริ่มต้นถึงระยะเวลา 180 นาที เส้นกราฟของกิจกรรมของ *R. fascians* ที่ถูกตรึงใน แคปปาคาราจีแนน อะการ์ และ อะกาโรส จะสูงกว่าเส้นกราฟของกิจกรรมของ *R. fascians* ที่ถูกตรึงในแอลจิเนต และ อะคริลาไมด์ ส่วนการที่ *R. fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึงมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินที่แตกต่างกันนั้น เป็นเพราะผลของการแพร่ของน้ำส้มไปยัง *R. fascians* ที่ถูกตรึงไว้ในวัสดุตรึงแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ซึ่งโครงสร้างภายในของวัสดุตรึงที่มีความพรุนมากกว่าจะทำให้การแพร่ของน้ำส้มจะเกิดขึ้นได้ดี ทำให้ *R. fascians* ที่ถูกตรึงอยู่ภายในมีอัตราการทำปฏิกิริยากับลิโมนินได้เร็ว จากผลการทดลองพบว่าอัตราเร็วเริ่มต้นของการทำปฏิกิริยาระหว่างลิโมนินในน้ำส้มกับ *R. fascians* ที่อยู่ภายในแคปปาคาราจีแนนมีค่าสูงที่สุด โดยอาจเป็นเพราะว่าโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนนั้นมีความพรุนมากจึงทำให้มีการแพร่ผ่านของน้ำส้มได้ดี สำหรับการทดสอบความคงรูปของเม็ดเจลซึ่งแสดงดังตารางที่ 6 พบว่าเม็ดเจลแอลจิเนตและแคปปาคาราจีแนนจะมีความคงรูปมากที่สุด โดยเม็ดเจลอะการ์และอะกาโรสจะมีความคงรูปน้อยที่สุด ซึ่งความคงรูปของเม็ดเจลในวัสดุตรึงที่ต่างกันดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับน้ำหนักโมเลกุลของวัสดุตรึงและแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลในโครงสร้างของวัสดุตรึงหลังการขึ้นรูป โดยพบว่าเม็ดเจลแคปปาคาราจีแนนจะมีน้ำหนักโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มากที่สุด (กว่า 1,000,000) จึงทำให้หลังจากการขึ้นรูปเป็นเม็ดแล้ว เม็ดเจลแคปปาคาราจีแนนจะมีความคงรูปสูง โดยสามารถต้านแรงกดจากน้ำหนักที่กดทับลงมาได้ดีกว่าเม็ดเจลของวัสดุตรึงชนิดอื่น และจากการทดลองเปรียบเทียบค่าร้อยละการลดลงของลิโมนินและค่าคงที่การดูดซับของวัสดุตรึงที่ปราศจาก *R. fascians* โดยค่าคงที่การดูดซับของวัสดุตรึงสามารถหาได้จากสมการความสัมพันธ์ของแลงมัวร์ ซึ่งผลของการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 7 พบว่าค่าร้อยละการลดลงของลิโมนินของแคปปาคาราจีแนน อะการ์ อะกาโรส และอะคริลาไมด์ มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ค่าคงที่การดูดซับของวัสดุตรึงดังกล่าวจะแตกต่างกัน เนื่องจากในช่วงระยะเวลา 4 ชั่วโมง ของการทำปฏิกิริยานั้น การพิจารณาเฉพาะค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงเพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถเห็นความแตกต่างได้ชัดเจน ดังนั้นการพิจารณาเปรียบเทียบค่าคงที่การดูดซับของวัสดุตรึงจะทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างความสามารถในการดูดซับของเม็ดเจลได้ชัดเจนกว่า โดยจะพบว่าวัสดุตรึงที่ปราศจาก *R. fascians* ที่มีความสามารถในการดูดซับลิโมนินได้ดีจากมากที่สุดไปหาน้อยที่สุดตามลำดับเป็นดังนี้คือ อะกาโรส อะคริลาไมด์ แคปปาคาราจีแนน และอะการ์ และเนื่องจากเกิดการละลายของเม็ดเจลแอลจิเนตหลังการทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม ทำให้ความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำส้มเปลี่ยนแปลงไป จึงไม่นำผลการทดลองของแอลจิเนตมาเปรียบเทียบ ในการพิจารณาเลือกวัสดุตรึงสำหรับการตรึง *R. fascians* นั้นจะพิจารณาถึงกิจกรรมและอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนิน และความคงรูปของเม็ดเจลซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าแคปปาคาราจีแนน เป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสม เนื่องจากมีกิจกรรมที่สูง และมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ดี นอกจากนั้นยังมีความคงรูปของเม็ดที่ดีกว่าวัสดุตรึงชนิดอื่น ดังนั้นจึงเลือกแคปปาคาราจีแนนเป็นวัสดุที่ใช้ในการตรึง *R. fascians* ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 16



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในวัสดุตรึงชนิดต่างๆ คือ คาราจีแนน (*) อะการ์ (Δ) อะกาโรส (X) อะคริลาไมด์ (□) และ แอลจิเนต (+) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และวัสดุตรึงเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณวัสดุตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อมิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6

แสดงความคงรูปของเม็ดเจลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ที่ขึ้นรูปด้วยวัสดุตรึงชนิดต่างๆ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และวัสดุตรึงเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณวัสดุตรึงเข้มข้น ร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

ชนิดของวัสดุตรึง	จำนวนเม็ดที่ทดสอบ(เม็ด)	จำนวนเม็ดหลังการทดสอบ[1] x คะแนน			คะแนนรวม
		ไม่เปลี่ยนแปลง[2]	แตกเล็กน้อย[3]	แตกมาก[4]	
คาราจีแนน	50	38 x 2	12 x 1	0 x 0	88
อะการ์	50	31 x 2	17 x 1	2 x 0	79
อะกาโรส	50	25 x 2	19 x 1	6 x 0	69
แอลจิเนต	50	45 x 2	5 x 1	0 x 0	95
อะคริลาไมด์	50	34 x 2	16 x 1	0 x 0	84

หมายเหตุ : 1 หมายถึงการทดสอบโดยการวางทับด้วยน้ำหนัก 500 กรัม ต่อเม็ดเจลจำนวน 4 เม็ด

2 หมายถึงไม่พบรอยแตกบนพื้นผิวของเม็ดเจล จะมีค่าระดับคะแนนเท่ากับ 2

3 หมายถึงพบว่ามีรอยแตกบนพื้นผิวของเม็ดเจลไม่เกิน 2 แห่ง จะมีค่าระดับคะแนนเท่ากับ 1

4 หมายถึงพบว่ามีรอยแตกบนพื้นผิวของเม็ดเจลเกิน 2 แห่ง จะมีค่าระดับคะแนนเท่ากับ 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7

แสดงค่าร้อยละการลดลงของลิโมนินและค่าคงที่การดูดซับลิโมนินของวัสดุตรึงชนิดต่าง ๆ ที่ปราศจาก *Rhodococcus fascians* โดยปริมาณของวัสดุตรึงเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

วัสดุตรึง	ร้อยละการลดลงของลิโมนิน	ค่าคงที่การดูดซับลิโมนิน a	b ลิตร/มิลลิกรัม	ปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม(C) มิลลิกรัม/ลิตร	ปริมาณลิโมนินที่ถูกดูดซับ (Q) มิลลิกรัม/ลิตร
อะกาโรส	4.35	0.029	0.0076	25.24	1.15
อะคริลาไมด์	4.22	0.031	0.0064	25.27	1.12
คาราจีแนน	4.12	0.033	0.0050	25.30	1.09
อะการ์	3.90	0.036	0.0030	25.36	1.03

หมายเหตุ 1) ค่า a และ ค่า b คำนวณได้จากสมการความสัมพันธ์ของแลงมัวร์ $Q = aC / (1+bC)$

ปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม (C) = ปริมาณลิโมนินทั้งหมดในน้ำส้ม – ปริมาณลิโมนินที่ถูกดูดซับโดยเม็ดเจล (Q)

2) ไม่แสดงผลการทดลองของแอลจิเนตเนื่องจากเกิดการละลายของแอลจิเนตในน้ำส้มระหว่างการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปสำหรับลดปริมาณลิโมนินแบบกะ (Batch)</u>

<u>การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และแคปปาคาราจีแนน</u>

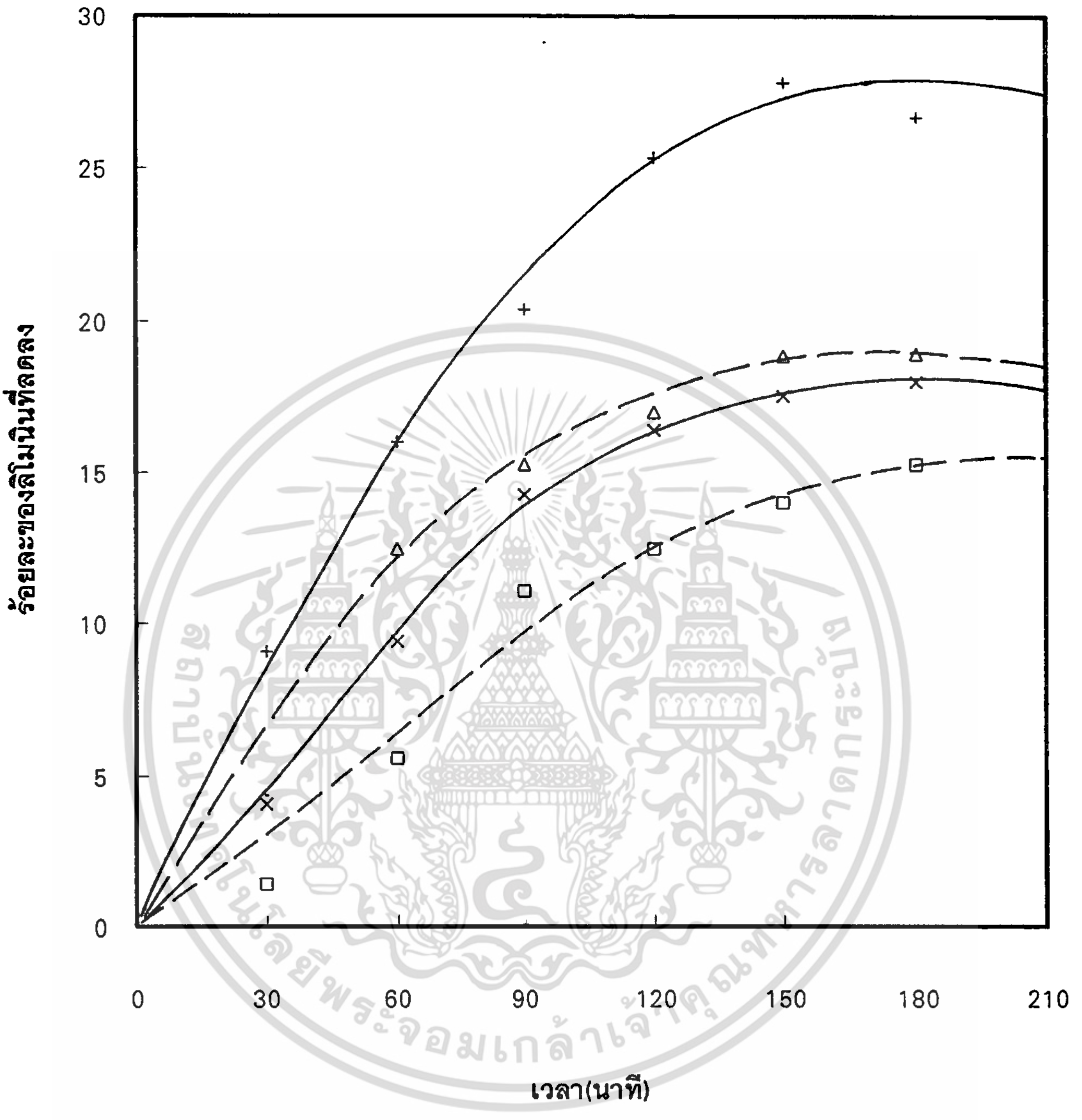
จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณ *R. fascians* และแคปปาคาราจีแนน ตามการทดลอง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณ *R. fascians* และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 1 : 5 1 : 7 และ 1 : 9 โดยน้ำหนัก จะพบว่ากิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ*R. fascians* ตรึงรูปซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนต่าง ๆ กันดังกล่าว แสดงโดยกราฟในภาพที่ 17 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วย LSD ที่ 0.05 และ LSD ที่ 0.01 พบว่า*R. fascians* ตรึงรูปที่ใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 จะมีกิจกรรมสูงที่สุด โดยสามารถลดปริมาณลิโมนิน ได้สูงสุดร้อยละ 26.66 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 150 นาที สำหรับ*R. fascians* ตรึงรูปที่ใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 5 และ 1 : 7 จะมีกิจกรรมที่ไม่แตกต่างกัน โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 18.00 และ 18.91 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 150 นาที และ 180 นาที ตามลำดับ และ *R. fascians* ตรึงรูปที่ใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 9 จะมีกิจกรรมที่ต่ำสุดโดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 15.77 ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 180 นาที และจากการพิจารณาค่าอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินในช่วงเวลา 30 - 90 นาที พบว่า *R. fascians* ตรึงรูปที่ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 1 : 5 1 : 7 และ 1 : 9 โดยน้ำหนัก จะมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนิน เป็น 0.266 0.208 0.157 และ 0.092 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *R. fascians* ตรึงรูปที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก มีกิจกรรมและอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาสูงกว่า *R. fascians* ตรึงรูปที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนน เป็น 1 : 5 1 : 7 และ 1 : 9 โดยน้ำหนัก เนื่องจากการมีปริมาณเซลล์ในสัดส่วนที่มากจะทำให้ปฏิกิริยาการลดลงของลิโมนินเกิดขึ้นได้เร็ว และทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยามีค่าสูง และสำหรับการเปรียบเทียบค่าร้อยละการลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงของลิโมนินสูงสุดของ *R. fascians* ตรึงรูป ที่ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์ *R. fascians* และคาราจีแนนเป็น 1 : 5 และ 1 : 7 โดยน้ำหนักนั้น พบว่า *R. fascians* ตรึงรูปที่ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 5 โดยน้ำหนัก จะใช้ระยะเวลาของการทำปฏิกิริยาที่เร็วกว่า โดยใช้เวลา 150 นาที ในขณะที่ *R. fascians* ตรึงรูปที่ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์และคาราจีแนนเป็น 1 : 7 โดยน้ำหนักใช้เวลา 180 นาที และพบว่า *R. fascians* ตรึงรูปที่ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 5 โดยน้ำหนัก จะมีอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลด ลิโมนินที่สูงกว่า และจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า *R. fascians* ตรึงรูปที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 9 โดยน้ำหนัก จะมีค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนินและอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินที่ต่ำที่สุด จากการพิจารณาค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนิน และอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดลิโมนินของ *R. fascians* ตรึงรูป ที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนที่ต่างกัน จึงเลือก *R. fascians* ตรึงรูปที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และแคปปาคาราจีแนนเท่ากับ 1 : 3 โดยน้ำหนัก เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 17



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปที่มีอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และคาราจีแนนต่างๆกันคือ 1 : 3 (+) 1 : 5 (Δ) 1 : 7 (X) และ 1 : 9 (□) โดยน้ำหนัก ที่ใช้แคปปาคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การหาขนาดที่เหมาะสมของเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูป</u>

จากการศึกษาขนาดที่เหมาะสมของเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูป โดยการขึ้นรูปเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปให้มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 2 3 4 และ 5 มิลลิเมตร พบว่าผลของกิจกรรมหรือค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนิน โดยการใช้เม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดต่างๆ กันดังกล่าว แสดงด้วยกราฟในภาพที่ 18 มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วย LSD ที่ 0.05 พบว่าเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จะมีกิจกรรมที่ต่ำสุด สำหรับเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 3 และ 4 มิลลิเมตร จะมีกิจกรรมที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 3 4 และ 5 มิลลิเมตร จะสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 30.64 29.32 27.54 และ 27.325 ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 180 นาที

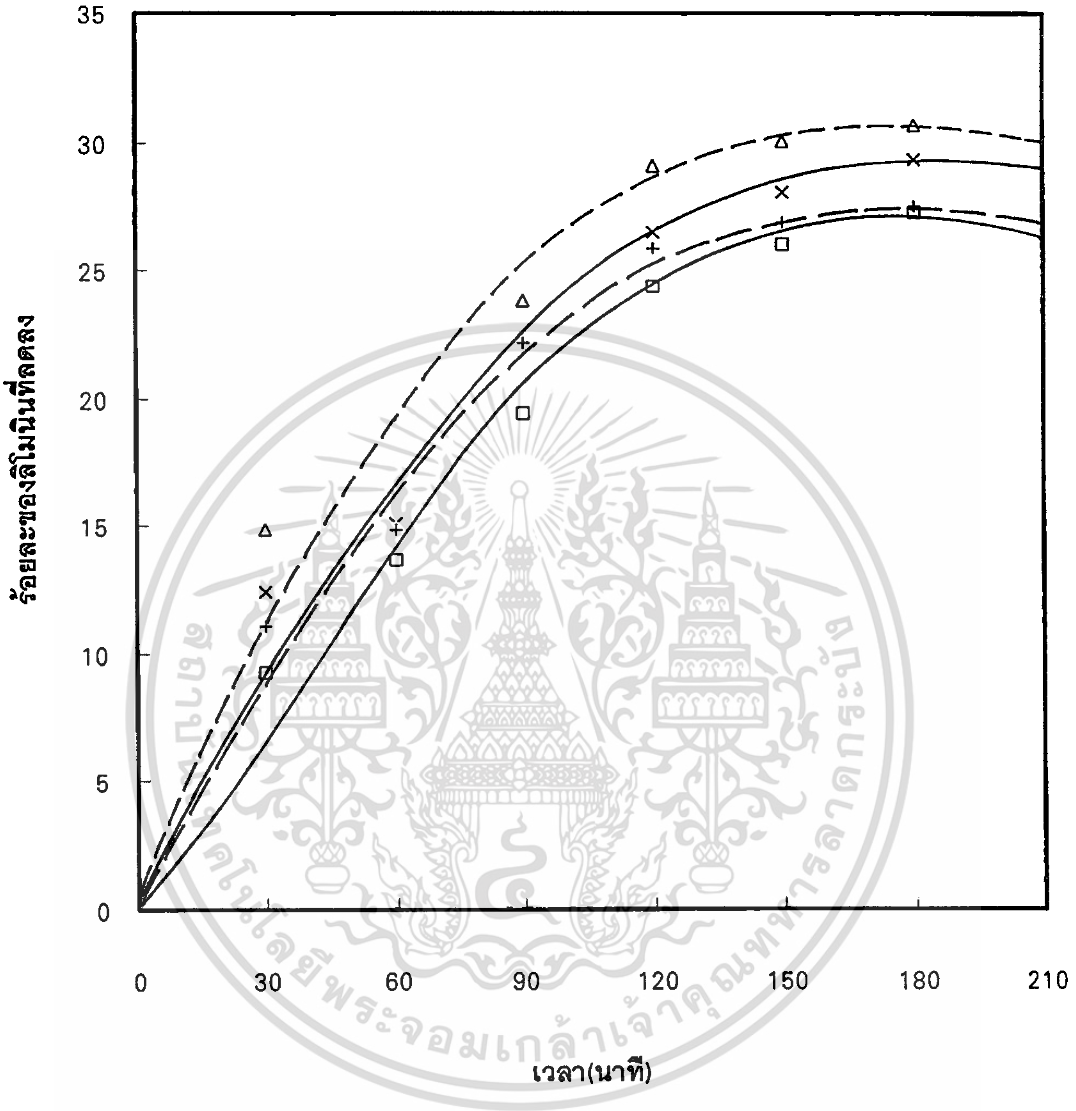
จากการพิจารณาเส้นกราฟของร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางที่ต่างกัน จะพบว่ามีความชันของกราฟใกล้เคียงกัน แต่มีค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนินได้สูงสุดที่ไม่เท่ากัน โดยเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดเล็กจะมีค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนินที่สูงกว่าเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งขนาดของเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีสัณฐาณเป็นทรงกลม จะมีผลต่อการแพร่ (Diffuion) เข้าไปทำปฏิกิริยาของลิโมนิน และมีผลต่อสัดส่วนของพื้นที่และปริมาตรในการทำปฏิกิริยา ผลการทดลองนี้จะสอดคล้องกับ Bailey และ Ollis (1986) ที่รายงานว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปจะแปรผกผันกับกิจกรรม เนื่องจากกลไกการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ภายในเซลล์กับลิโมนินที่แพร่เข้ามาภายในเม็ดเจลที่มีขนาดเม็ดเล็ก จะสามารถเกิดขึ้นได้ดีกว่าในเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ ซึ่งกลไกการแพร่นี้เป็นกลไกที่สำคัญสำหรับเม็ดเจล *R. fascians* ตรึงรูปที่มีลักษณะเป็นทรงกลม โดยปฏิกิริยาระหว่างลิโมนิน และ *R. fascians* จะเกิดขึ้นภายในรูพรุน ที่เป็นผลมาจากการเลือกใช้แคปปาคาราจี่แนนเป็นวัสดุตรึง เนื่องจากการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นเป็นรูปแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา ดังนั้นขนาดของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ใช้บรรจุลงในท่อปฏิกรณ์จะมีผลอย่างมากต่อความดันที่เกิดขึ้นในท่อปฏิกรณ์ โดยพบว่าเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กมากจะก่อให้เกิดความดันที่สูงในระหว่างการทดลอง และยังก่อให้เกิดปัญหาการอุดตันขึ้นได้ ดังนั้นถึงแม้ว่าการเลือกใช้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเล็ก จะทำให้ได้กิจกรรมที่ดี แต่จะมีผลทำให้เกิดการไหลที่ไม่สะดวกสำหรับการทดลองในท่อปฏิกรณ์ จึงเลือกเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร สำหรับการทดลองต่อไป เนื่องจากต้องการประสิทธิภาพที่ดีในการไหลของของน้ำส้ม เมื่อประยุกต์ใช้ในท่อปฏิกรณ์ โดยหลีกเลี่ยงปัญหาอุดตันในท่อปฏิกรณ์ นอกจากนี้ยังสามารถลดปัญหา การอุดตันในเข็มขณะขึ้นรูป สามารถทำให้เตรียมเม็ดเจลได้สะดวกรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 18



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างกัน คือ 2 มิลลิเมตร (Δ) 3 มิลลิเมตร (X) 4 มิลลิเมตร (+) และ 5 มิลลิเมตร (□) โดยอัตราส่วนระหว่างปริมาณ เซลล์และคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณแคปปาคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

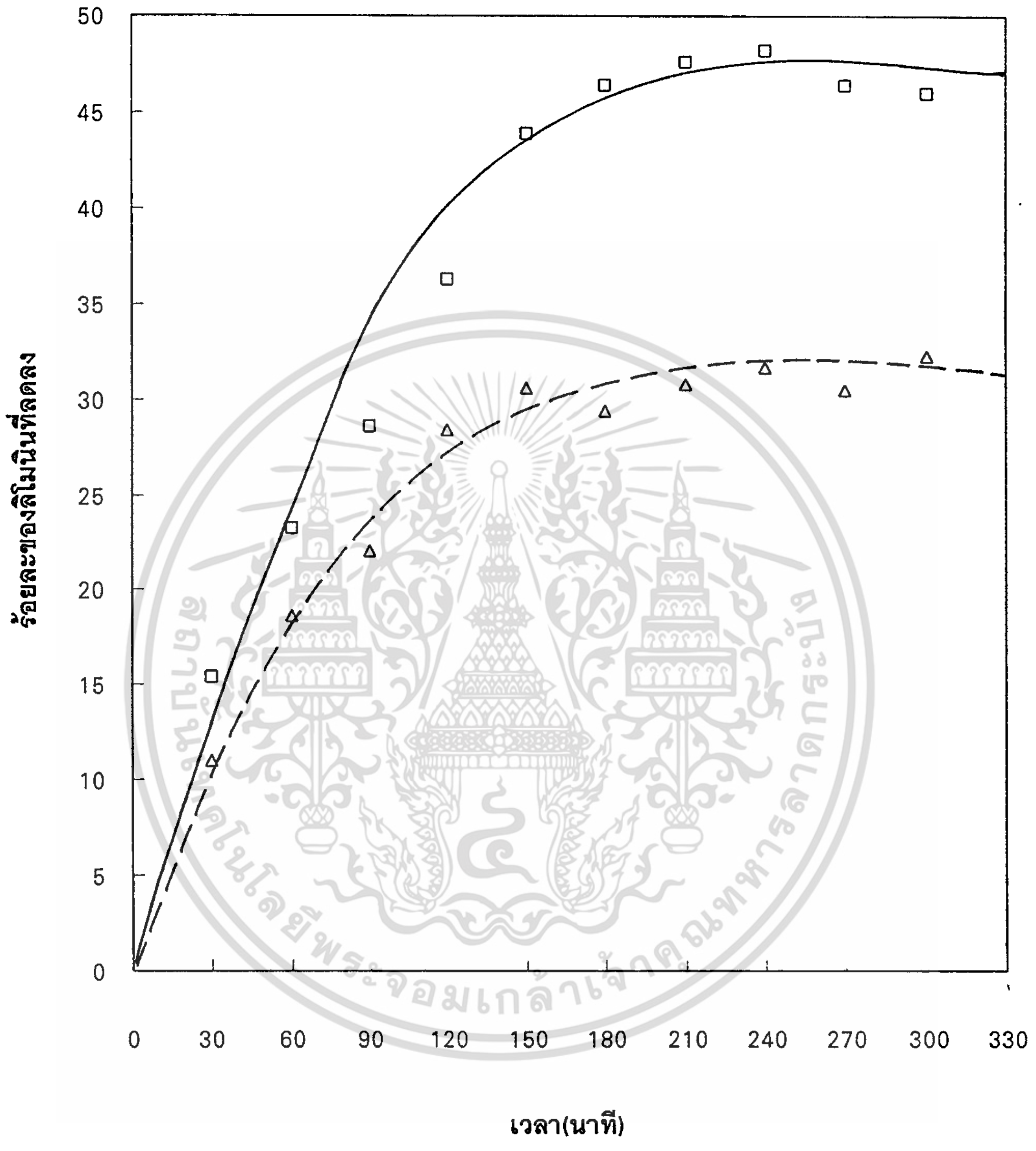
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* ตรึงรูป</u>

จากการศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* ตรึงรูป โดยเปรียบเทียบกับระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* อิสระ ซึ่งผลของแอทิวิตีหรือค่าของร้อยละของลิโมนินที่ลดลง แสดงโดยกราฟในภาพที่ 19 จากการทดลอง พบว่า ที่ช่วงเวลา 2.5 - 5 ชั่วโมง กิจกรรมของ *R. fascians* อิสระ จะมีค่าคงที่โดยค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงนั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ DMRT ร้อยละ 95 โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 48.21 และที่ช่วงเวลา 2 - 5 ชั่วโมง กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปจะมีค่าคงที่ โดยค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงนั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ DMRT ร้อยละ 95 โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 32.3 และ เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมในช่วงสภาวะคงที่(Steady state) ของ *R. fascians* จะพบว่าค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* อิสระจะสูงกว่ากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป ในการพิจารณาลักษณะของกราฟกิจกรรมที่แสดงเป็นค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* อิสระและค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูป จะพบว่าในช่วง 0 - 120 นาที ความชันของเส้นกราฟกิจกรรมของ*R. fascians* อิสระ จะมีความชันมากกว่าเส้นกราฟของกิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูป เนื่องจากในการทำปฏิกิริยาระหว่างลิโมนินและ *R. fascians* ที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดแคปปาคาราจีแนน จะมีกลไกการแพร่เข้ามาเกี่ยวข้องและผลของการตรึงจะทำให้เกิดการลดลงของประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างลิโมนินและ *R. fascians* นอกจากนั้นในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างลิโมนินกับ *R. fascians* ที่อยู่อย่างอิสระจะสามารถดำเนินไปได้แบบทั่วถึงดีกว่า สิ่งสำคัญที่ทำให้ค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนินของ *R. fascians* อิสระ และค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนินของ *R. fascians* ตรึงรูปเพิ่มขึ้นในช่วงเวลา 0 - 120 นาที เนื่องจากเอนไซม์ภายในเซลล์ *R. fascians* มีโอกาสสัมผัสกับลิโมนินได้นาน ทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์สูงขึ้น ต่อจากนั้นกิจกรรมทั้งของ *R. fascians* อิสระและ *R. fascians* ตรึงรูปจะเข้าสู่สภาวะที่คงที่ หรือกิจกรรมมีค่าคงที่ในช่วงเวลาหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 19



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป (Δ) และ *Rhodococcus fascians* อิสระ (□) ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยปริมาณของเซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปและปริมาณของเซลล์ *R. fascians* อิสระ เป็น 1.2 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์</u>

จากการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ โดยการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ที่แตกต่างกัน คือ 0.25 0.5 1.0 และ 2.0 โมลาร์ ที่มีต่อกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปที่ขึ้นรูปในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ซึ่งมีความเข้มข้นต่างกันดังกล่าว โดยการวิเคราะห์หาร้อยละของลิโมนินที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที แสดงดังกราฟในภาพที่ 20 พบว่ากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปที่ขึ้นรูปในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับคือ 0.25 0.5 1.0 และ 2.0 โมลาร์นั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 18.25 19.13 19.51 และ 18.13 ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างกันในด้านความแข็งของเม็ดเจล โดยเม็ดเจลที่ขึ้นรูปในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 และ 2.0 โมลาร์ จะมีความแข็งของเม็ดเจลที่ไม่แตกต่างกันมาก แต่จะมีความแข็งกว่าเม็ดเจลที่ขึ้นรูปในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0 .25 โมลาร์ สารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์จะมีผลต่อความแข็งของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป โดยพบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของโปตัสเซียมอิออนในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ จะมีผลในการกำจัดโมเลกุลของน้ำที่มีอยู่ในเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป ทำให้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปดังกล่าวมีความแข็งขึ้น แต่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ในระดับที่ทำการทดลองคือช่วง 0.5 ถึง 2.0 โมลาร์ จะไม่มีผลทำให้กิจกรรมของ *R. fascians* ที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดเจลลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ดังกล่าวยังอยู่ในระดับที่ต่ำ

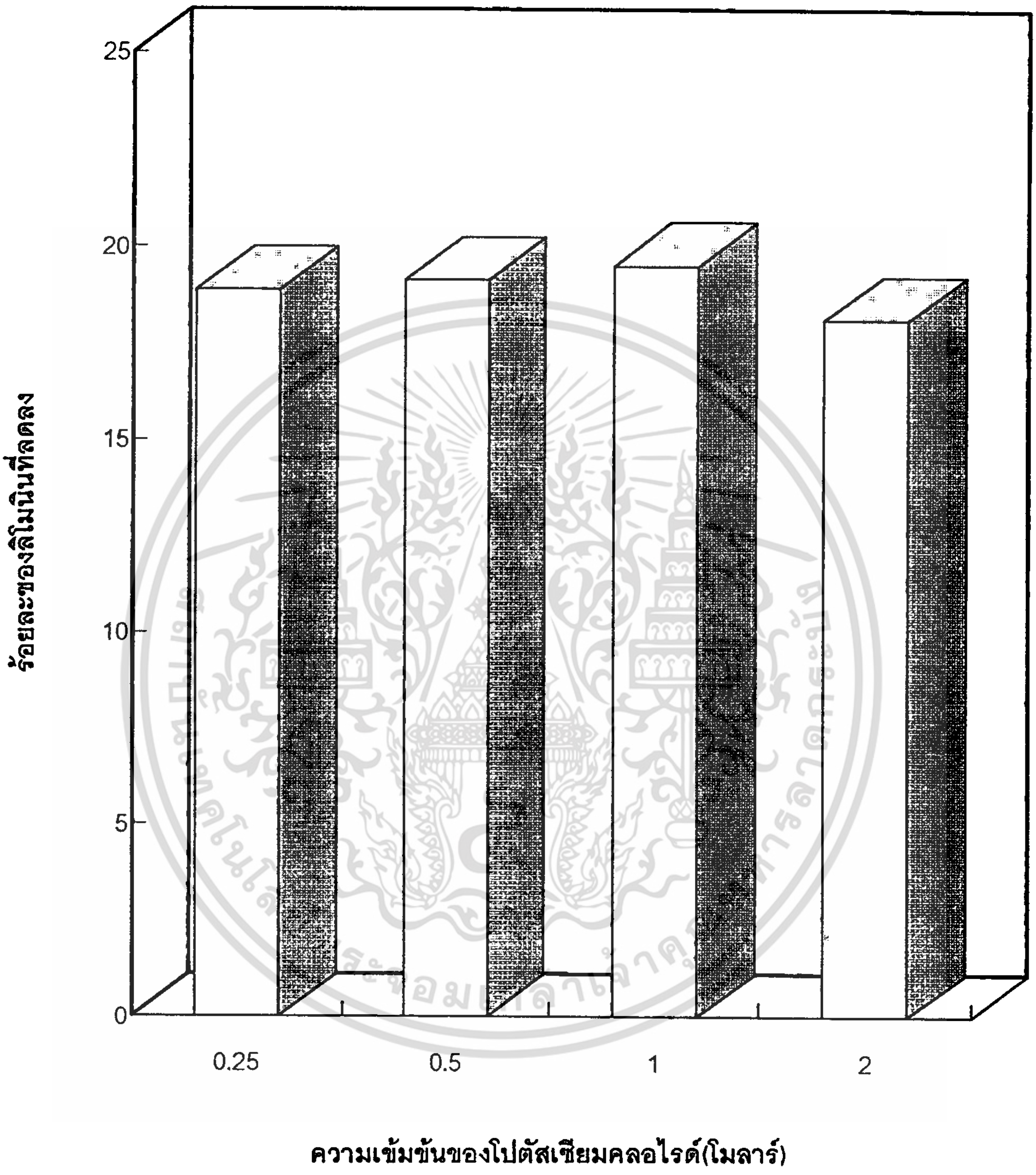
ผลของการทดลองนี้สอดคล้องกับที่ Tosa และคณะ (1974) ได้รายงานผลของอิออนของโลหะที่อยู่ในรูปของสารละลายอิออนเช่นโปตัสเซียมอิออน รูบิเดียมอิออน และซีเซียมอิออนจะช่วยเพิ่มความแข็งของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป และความเข้มข้นของโปตัสเซียมคลอไรด์ที่สูงขึ้นนั้นจะไม่มีผลต่อกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป สำหรับสารประเภทอื่นที่มีผลช่วยในด้านความคงตัวของเม็ดเจลนั้น Klein และ Wagner(1983) ได้รายงานผลการทดลองการใช้กลูตารอลดีไฮด์ซึ่งเป็น พอลิฟังก์ชั่นนอล รีเอเจนต์ (polyfunctional reagent) โดยมีผลในการเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแข็งของเม็ดเจลแคปปาคาราจีแนนในน้ำส้ม โดยพบว่ากลูตารอลดีไฮด์ไม่มีผลต่อการเพิ่มความแข็งของเม็ดเจลแต่อย่างใด นอกจากนี้ Nishida และคณะ (1979) ยังรายงานถึงผลการใช้กลูตารอลดีไฮด์ร่วมกับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน (Hexamethylene diamine) ในการเพิ่มความแข็งให้เม็ดเจลแคปปาคาราจีแนนสำหรับการตรึง *E. coli* โดยพบว่าเม็ดเจลจุลินทรีย์ตรึงรูปมีความเสถียรมากขึ้น ที่ตรงกับ Tosa และ คณะ (1979) ที่รายงานถึงความสามารถของเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ในการเพิ่มความแข็งของเม็ดเจล อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่ากลูตารอลดีไฮด์จะไม่มีผลต่อกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป แต่สามารถทำให้เกิดสารประกอบที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกลูตารอลดีไฮด์กับสารที่เป็นส่วนที่ทำให้เกิดรสในน้ำส้ม เช่น เอสเทอร์ คีโตน แอลกอฮอล์ และ ไธออล ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นนี้ไม่เป็นที่ต้องการในการปรับปรุงคุณภาพของน้ำส้ม จึงไม่เลือกใช้กลูตารอลดีไฮด์สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ และพบว่าความเข้มข้นของโปตัสเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ในการทดลองครั้งนี้เป็น 0.5 โมลาร์ จึงใช้ความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับการทดลองครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 20



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปที่เตรียมจากโปตัสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.25 โมลาร์ 0.50 โมลาร์ 1.0 โมลาร์ และ 2.0 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ *R. fascians* ของแคปปาคาราจีแนน</u>

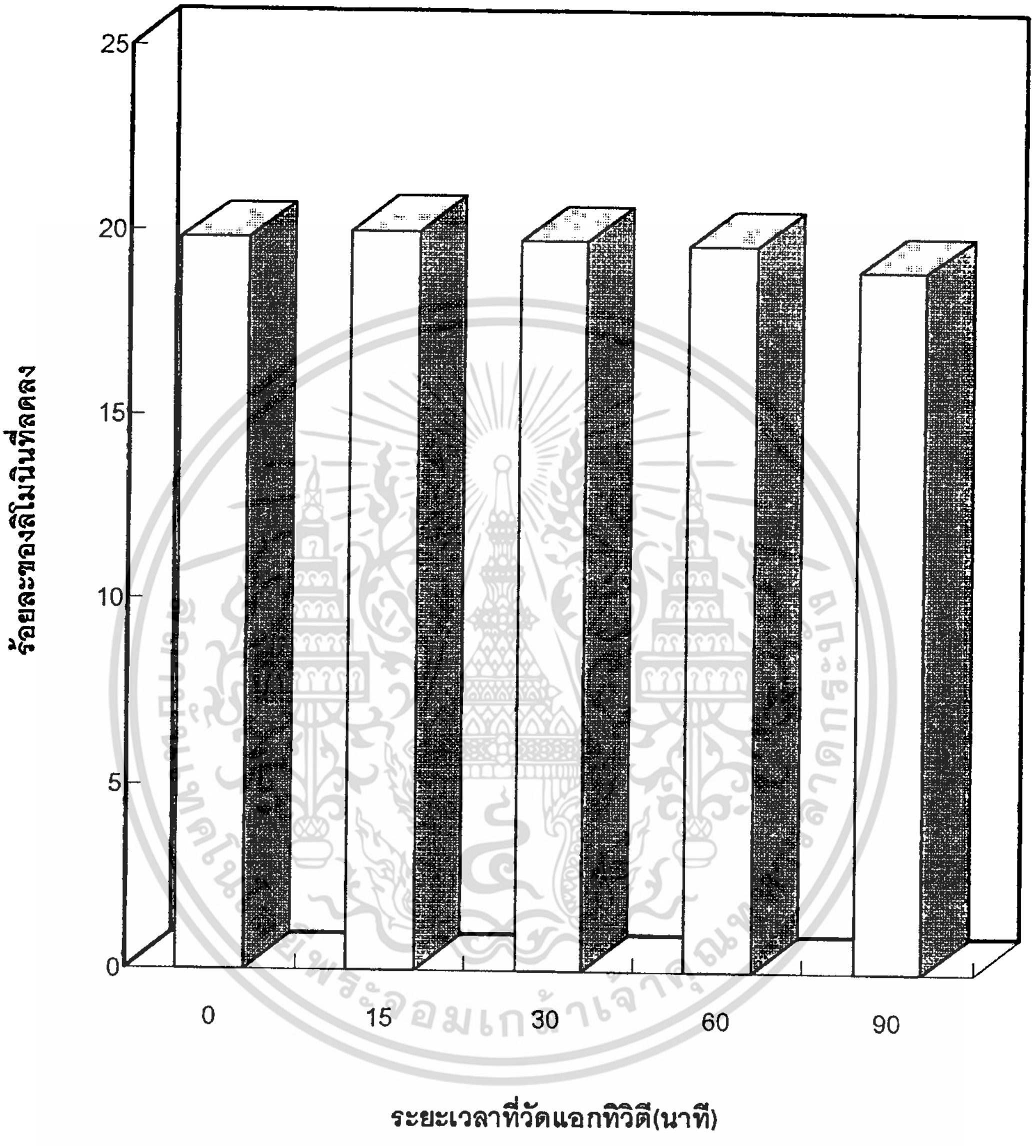
ในการศึกษาโอกาสที่เซลล์ *R. fascians* จะหลุดลอดจากการตรึงหรือหลุดออกมาจากเม็ดเจล แคปปาคาราจีแนน ตามการทดลอง โดยให้เม็ด *R. fascians* ตรึงรูปทำปฏิกิริยากับน้ำส้มเป็นระยะเวลา 60 นาทีแล้วทำการกรองเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกจากน้ำส้ม และหากิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปในน้ำส้ม หลังจากกรองเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป ออกที่ระยะเวลาผ่านไป 0 15 30 60 และ 90 นาที ผลของกิจกรรมแสดงดังกราฟในภาพที่ 21 พบว่ากิจกรรมของ *R. fascians* ที่ปรากฏในน้ำส้มหลังการกรองเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกที่เวลาผ่านไปต่าง ๆ กันดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่าที่เวลาผ่านไป 0 15 30 60 และ 90 นาที สามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 19.82 20.005 19.75 19.64 และ 18.985 ตามลำดับ การศึกษาประสิทธิภาพการตรึง *R. fascians* ของแคปปาคาราจีแนนในการทดลองนี้ เป็นการหาค่าของกิจกรรมของ *R. fascians* ที่หลุดลอดจากการห่อหุ้มและตกค้างอยู่ในน้ำส้มหลังจากที่แยกเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปออกจากน้ำส้ม และถ้าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ของแคปปาคาราจีแนนไม่ดี จะทำให้ในน้ำส้มมี *R. fascians* ที่หลุดออกมาจากเม็ดเจลเป็น จำนวนมาก ซึ่งจะมีผลให้ค่าการลดลงของลิโมนินในน้ำส้มที่ระยะเวลาผ่านไปดังกล่าวลดลงตามลำดับ เนื่องจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในน้ำส้ม แต่ถ้าประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ของแคปปาคาราจีแนนดี จะทำให้ในน้ำส้มมี *R. fascians* ที่หลุดออกมาจากเม็ดเจลเพียงเล็กน้อย ซึ่งจะมีผลน้อยมากต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าการลดลงของลิโมนินในน้ำส้มที่ระยะเวลาผ่านไปดังกล่าว ซึ่งจากการทดลองพบว่าเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป ในแคปปาคาราจีแนนที่ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก และใช้ปริมาณแคปปาคาราจีแนนเป็นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) ดังกล่าวนั้นมีประสิทธิภาพในการตรึง *R. fascians* และสามารถทำงานได้ในสภาวะของความเป็นกรดของน้ำส้ม การที่แคปปาคาราจีแนนมีเสถียรภาพที่ดีโดยสามารถทนต่อการละลายที่เป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมที่มีอิออนอยู่มากได้แก่ ซิเตรท ฟอสเฟต และยังทนต่อความเป็นกรดได้ดี จึงทำให้แคปปาคาราจีแนนสามารถรักษาประสิทธิภาพการตรึง *R. fascians* ไว้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับอัจฉรา และคณะ (1992) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของแคปปาคาราจีแนนในการตรึงเซลล์ *Corynebacterium fascians* ที่ทำปฏิกิริยาในน้ำมะนาวไทย โดยพบว่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงในน้ำมะนาว หลังจากหยุดปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่างๆ กันมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งหมายถึงโอกาสที่เซลล์จุลินทรีย์จะหลุดออกจากแคปปาคาราจีแนนนั้นเป็นไปได้ต่ำมาก นอกจากนี้ Nilsson และคณะ(1983)ยังได้รายงานถึงประสิทธิภาพของแคปปาคาราจีแนน โดย สามารถตรึงเซลล์จุลินทรีย์ไว้ได้ดีและเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงอยู่ในแคปปาคาราจีแนนมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง และ Chibata(1980) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพในการตรึงของแคปปาคาราจีแนนในการตรึงเซลล์ *E. coli* สำหรับการผลิตกรดแอสพาร์ติก (Aspartic acid) พบว่าสามารถนำจุลินทรีย์ตรึงรูปกลับมาใช้ติดต่อกัน โดยโอกาสที่เซลล์จะหลุดออกจากแคปปาคาราจีแนนนั้นมีน้อย และเม็ดเจลยังทนต่อการละลายที่เป็นผลมาจากความเป็นกรดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 21



แสดงประสิทธิภาพการตรึงเซลล์ *Rhodococcus fascians* ของแคปปาคาราจีแนน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณของแคปปาคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 4 มิลลิเมตร ที่ขึ้นรูปในโปตัสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

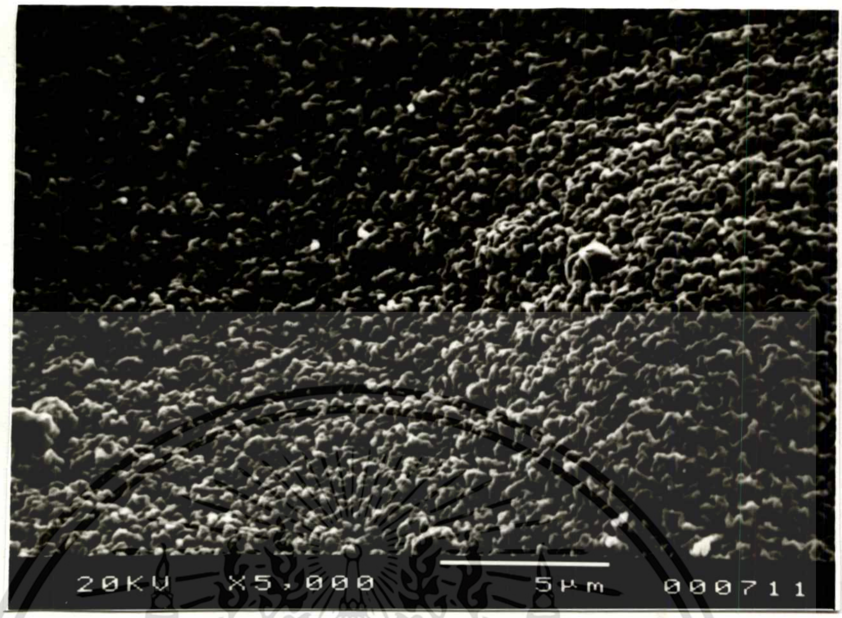
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาโครงสร้างของR. fascians ตรึงรูปโดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนน</u>

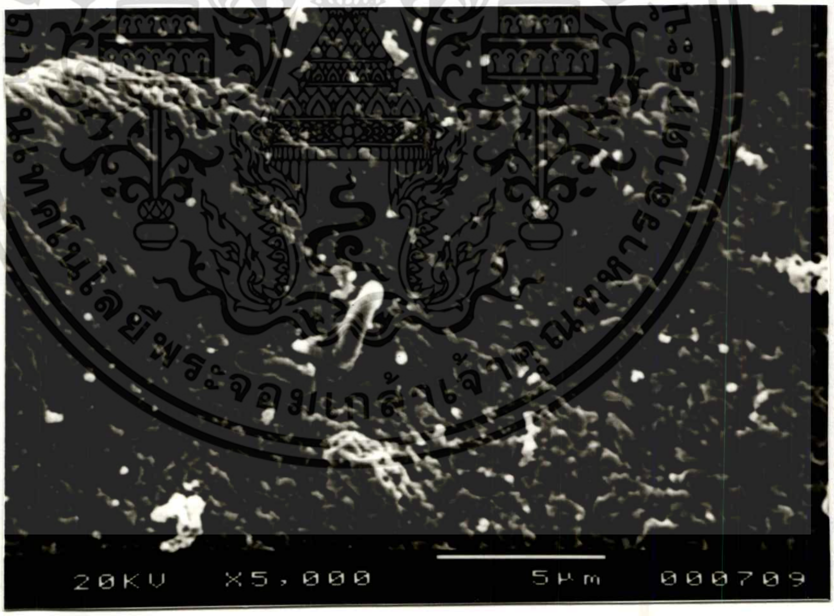
จากการศึกษาโครงสร้างของ *R. fascians* ตรึงรูปโดยการตรวจดูโครงสร้างของวัสดุตรึงที่มี *R. fascians* และโครงสร้างของวัสดุตรึงปราศจาก *R. fascians* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบเอสอีเอ็ม (Scanning Electron Microscope) หรือ SEM ที่กำลังขยาย 5,000 เท่าและ 10,000 เท่า แสดงดังภาพที่ 22 และภาพที่ 23 เมื่อพิจารณาพื้นผิวของแคปปาคาราจีแนนที่ปราศจากเซลล์ *R. fascians* จะพบว่ามีลักษณะที่เป็นโพรงที่เกิดจากการขึ้นรูปเป็นเม็ดเจล และโพรงดังกล่าวนี้จะมีสองลักษณะคือ โพรงที่มีขนาดเล็กและมีความกว้างต่ำกว่า 10 ไมครอน โดยจะมีลักษณะเป็นแนวยาวเป็นร่องและโพรงที่มีขนาดใหญ่มีลักษณะเป็นแอ่ง โดยมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ซึ่งโพรงที่มีขนาดเล็กนั้นเป็นโพรงที่มีความสำคัญในการตรึงเซลล์ คือเป็นที่อยู่ของเซลล์และแนวยาวดังกล่าวนี้จะเชื่อมติดต่อกันเป็นทางเข้าออกของสาร ที่สามารถเข้ามาทำปฏิกิริยากับเซลล์ได้ สำหรับโพรงที่มีขนาดใหญ่จะเป็นโพรงที่เกิดจากฟองอากาศในขณะขึ้นรูปเม็ดเจลในการเกิดเป็นโพรงนั้น จะเป็นโพรงใหญ่หรือเล็ก ขึ้นอยู่กับปัจจัยสองอย่าง ในการเตรียมเม็ดเจลแคปปาคาราจีแนน คือปริมาณของแคปปาคาราจีแนนและฟองอากาศที่เกิดขึ้นขณะเตรียมและขึ้นรูป โดยจะพบว่าการใช้ปริมาณของแคปปาคาราจีแนนในสัดส่วนที่น้อยและมีการเกิดของฟองอากาศมากในขณะที่เตรียมและขึ้นรูปเม็ดเจล จะมีผลทำให้ เม็ดเจลมีขนาดของโพรงที่ใหญ่เป็นส่วนมาก ส่วนการเตรียมโดยใช้ปริมาณของแคปปาคาราจีแนนในสัดส่วนที่เหมาะสมและมีการเกิดของฟองอากาศที่น้อยในขณะขึ้นรูปเม็ดเจล จะทำให้เกิดโพรงที่มีขนาดเล็ก โดยเป็นลักษณะที่ต้องการให้เกิด และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะของเม็ดเจลแคปปาคาราจีแนนที่มีเซลล์ *R. fascians* ถูกตรึงอยู่ จะพบว่าเซลล์ *R. fascians* จะมีลักษณะเป็นท่อนขนาด 0.5 x 3 ไมครอน เกาะอยู่ที่ผิวของแคปปาคาราจีแนน โดยจะพบเซลล์เหล่านี้ในจำนวนที่มากในโพรงที่มีขนาดเล็กที่มีลักษณะเป็นแนวยาว แต่จะพบเซลล์ในปริมาณที่น้อยในโพรงที่มีขนาดใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 22



ก

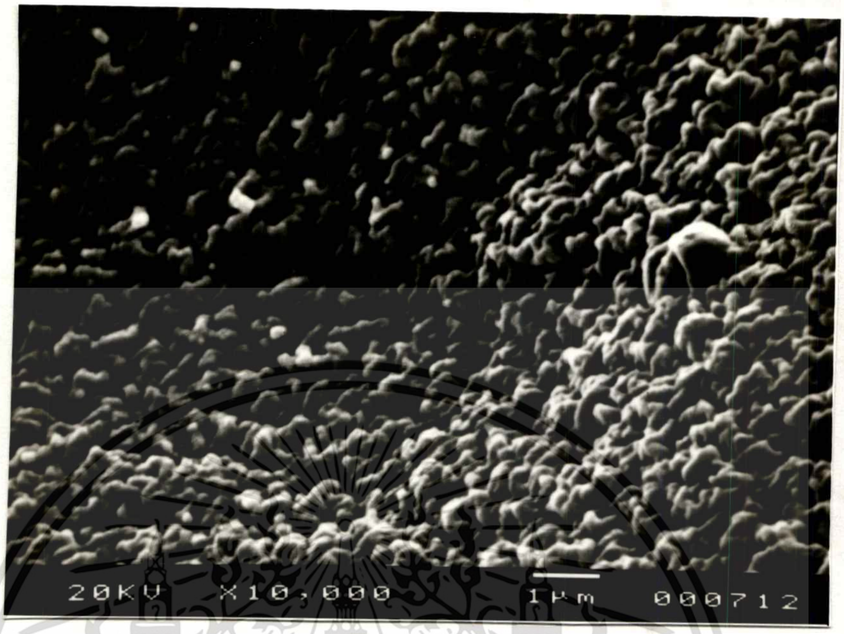


ข

แสดงลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่ไม่มีเซลล์ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ก) และลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่มีเซลล์ *R. fascians* ที่กำลังขยาย 5000 เท่า (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 23



ก

ข

แสดงลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่ไม่มีเซลล์ที่กำลังขยาย 10000 เท่า (ก) และลักษณะของโครงสร้างของแคปปาคาราจีแนนที่มีเซลล์ *R. fascians* ที่กำลังขยาย 10000 เท่า (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาจลนพลศาสตร์ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระแบบกะ

การศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่ pH ระดับต่าง ๆ

จากการศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่ pH ระดับต่าง ๆ ตามการทดลอง ผลของ pH ที่ระดับต่าง ๆ กันคือ 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 และ12 ที่มีต่อกิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูป และ *R. fascians* อิสระ แสดงโดย กราฟในภาพที่ 24 พบว่า pH 5 6 และ 7 กิจกรรมของ *R. fascians* อิสระมีค่าสูง และไม่แตกต่างกันทางสถิติด้วย DMRT (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยพบว่าที่ pH 5 6 และ 7 *R. fascians* อิสระสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 19.45 23.24 และ 20.02 ตามลำดับ และที่ pH 4 5 6 และ 7 กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปมีค่าสูงและไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ DMRTร้อยละ 99 โดยพบว่าที่ pH 4 5 6 และ 7 *R. fascians* ตรึงรูปสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 19.1 18 และ 17.89 ตามลำดับ จากลักษณะของกราฟที่ได้จะพบว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมของ *R. fascians* อิสระ จะแคบกว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมของ *R. fascians* ตรึงรูป เนื่องจากสภาวะความเป็นกรดและด่าง มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ โดยเซลล์ *R. fascians* ที่อยู่อย่างอิสระจะได้รับผลกระทบจากสภาวะความเป็นกรดและด่างได้ง่ายกว่าเซลล์ *R. fascians* ตรึงรูป เพราะการที่เซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปมีวัสดุตรึงที่ทำหน้าที่เป็นเกราะกำบัง ซึ่งจะช่วยลดความรุนแรงของสภาวะความเป็นกรดและด่าง ส่วนกลไกที่มีผลทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์เสียสภาพได้ เป็นเพราะถูกรบกวนโดยโปรตอนในสภาวะที่เป็นกรด และถูกรบกวนโดยไฮดรอกไซด์ในสภาวะที่เป็นด่าง นอกจากนี้สภาวะที่เป็นกรดและด่างที่ไม่เหมาะสมยังสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ *R. fascians* ได้โดยตรง

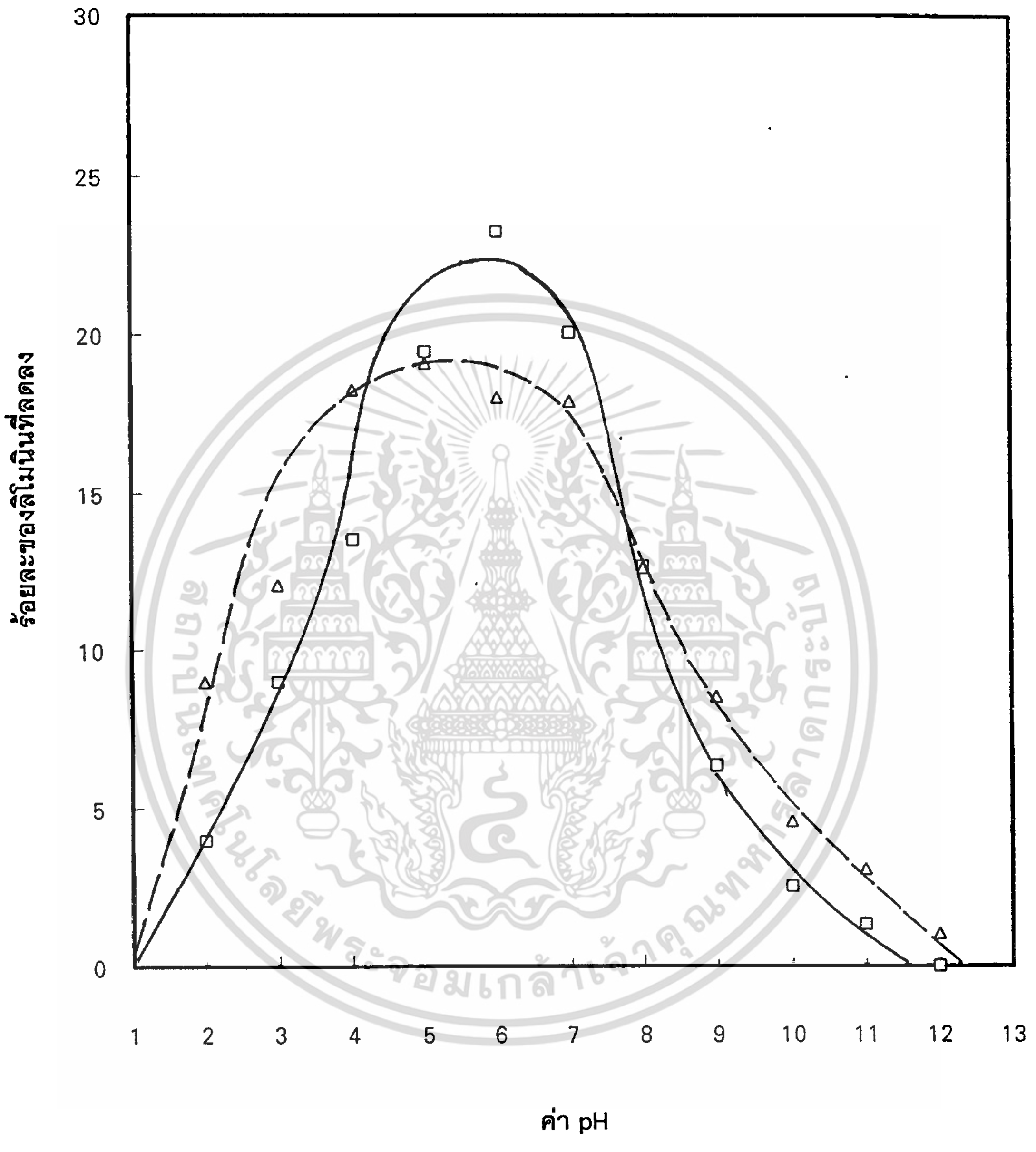
ผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับการรายงานของ Hasegawa และคณะ (1985) ที่ได้ตรึงเซลล์ *Corynebacterium fascians* ในอะคริลาไมด์เจล สำหรับใช้ลดความขมอันเนื่องมาจากลิโมนิน และ นอมิลิน ในซีรั่มของน้ำส้ม (Citrus juice sera) และพบว่า *Corynebacterium fascians* สามารถเปลี่ยนลิโมนินไปเป็นลิโมนอล ได้ถึงร้อยละ 81 และสามารถเปลี่ยนนอมิลินไปเป็นโอบาคิวโนนได้ โดยเมแทบอลิซึมดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ที่ pHปกติ ของน้ำส้มคือ pH 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่จากผลการทดลองของ Hasegawa และคณะ(1983) ที่ได้ทำการสกัดเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนส(Limonoate hydrogenase) จาก *Corynebacterium fascians* (NRRL-B-15096) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ลิโมโนเอทดีไฮโดรจีเนสคือ pH 8.2 โดยมีค่ามากกว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานเมื่อเอนไซม์ดังกล่าวที่อยู่ภายในเซลล์ จะเห็นว่าการใช้เซลล์จุลินทรีย์ทั้งเซลล์จะมีความเหมาะสมกว่าเนื่องจากสภาวะตามปกติของน้ำส้มจะมีค่า pH ที่อยู่ในช่วง 4 - 5 นอกจากนี้อัจฉราและคณะ (1992) ได้ตรึง *Corynebacterium fascians* NRRL-B-15096 ใน แคปปาคาราจีแนน และพบว่าเซลล์ตรึงรูปดังกล่าวสามารถลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวได้ดีที่ pH 5 - 6 สำหรับกรณีที่ใช้เซลล์อิสระในการดำเนินการ และสามารถลดปริมาณลิโมนินได้ดีที่ pH 4 -5 กรณีที่ใช้เซลล์ตรึงรูปในการดำเนินการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 24



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป (Δ) และ *Rhodococcus fascians* อิสระ (□) ที่ pH ระดับต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ</u>

จากการศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ ที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ ตามการทดลอง ผลของอุณหภูมิที่ 10 20 28 35 45 55 65 75 และ 85 องศาเซลเซียส กิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระแสดงโดยกราฟในภาพที่ 25 พบว่าอุณหภูมิในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปจะมีค่าสูง และไม่แตกต่างกันทางสถิติด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 20 28 และ 35 องศาเซลเซียส *R. fascians* ตรึงรูปสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 21.94 22.1 และ 22.05 ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิในช่วง 28 - 35 องศาเซลเซียสกิจกรรมของ *R. fascians* อิสระจะมีค่าที่สูง และไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ DMRT ร้อยละ 95 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 28 และ 35 องศาเซลเซียส *R. fascians* อิสระสามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 26.95 และ 24.85 ตามลำดับ โดยการทดลองที่อุณหภูมิ 65 75 และ 85 องศาเซลเซียส ไม่สามารถศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปได้ เนื่องจากเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจะละลายที่อุณหภูมิดังกล่าว จากลักษณะของกราฟที่ได้ จะเห็นว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *R. fascians* อิสระจะแคบกว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *R. fascians* ตรึงรูป

จากลักษณะของช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *R. fascians* แบบตรึงรูป ที่มีช่วงการทำงานได้กว้างกว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *R. fascians* แบบอิสระ และการที่อุณหภูมิในช่วง 10 - 20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในช่วง 55 - 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปมีค่าสูงกว่ากิจกรรมของ *R. fascians* อิสระ เนื่องจากในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น อุณหภูมิจะเป็นปัจจัยที่มีผลในการเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยาระหว่าง *R. fascians* กับลิโมนิน โดยอุณหภูมิจะมีส่วนสำคัญในการทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์สามารถเปลี่ยนลิโมนินได้ และในช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมมากนักจะมีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ภายในเซลล์ ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาระหว่าง *R. fascians* กับลิโมนินลดลง และในช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมมาก จะส่งผลโดยตรงอย่างรุนแรงคือเกิดอันตรายกับ *R. fascians* ดังนั้นการห่อหุ้มเซลล์ *R. fascians* ไว้ในวัสดุตรึง จะช่วยลดผลกระทบจากอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ซึ่งทำให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ภายในเซลล์ และอาจทำอันตรายให้กับเซลล์ *R. fascians* จึงมีผลให้ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะ

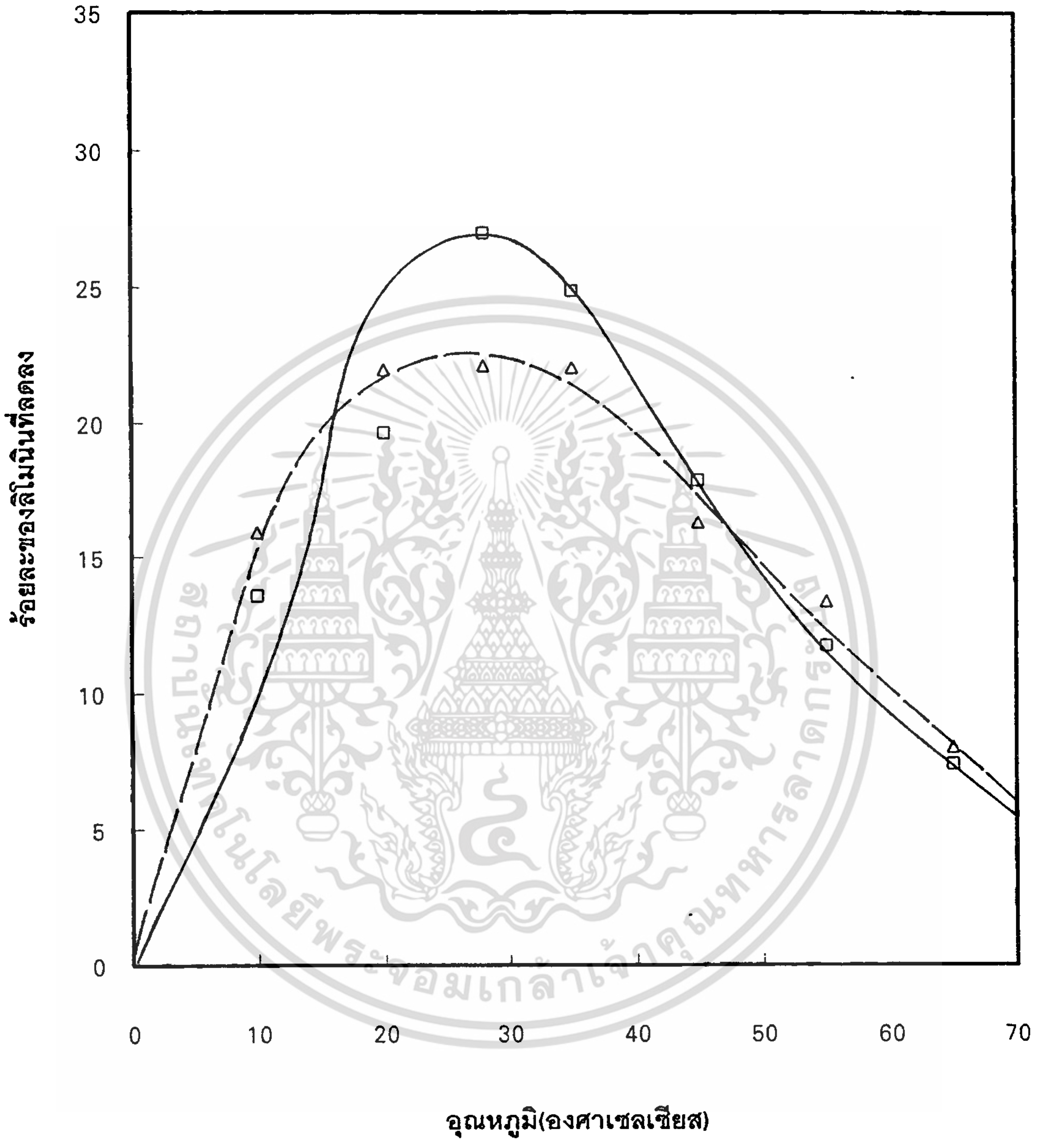
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมของ *R. fascians* แบบตรึงรูปมีช่วงการทำงานได้กว้างกว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *R. fascians* แบบอิสระ

ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ อัจฉรา และคณะ(1992)ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ *Corynebacterium fascians* ในการลดปริมาณลิโมนินแบบกะ โดยพบว่าอุณหภูมิในช่วง 20 - 30 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่เหมาะสมของเซลล์ตรึงรูป และอุณหภูมิในช่วง 20 - 30 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่เหมาะสมของเซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังพบว่า ที่อุณหภูมิในช่วง 10 - 20 และ อุณหภูมิในช่วง 55 - 65 องศาเซลเซียสนั้น กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปจะสูงกว่ากิจกรรมของ *R. fascians* อิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 25



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป (Δ) และ*Rhodococcus fascians* อิสระ (□) ที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาค่า K_m และ V_{max} ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ

จากการศึกษาค่า K_m และ V_{max} ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ โดยการแปรผันความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำส้มและคำนวณหาอัตราเร็วในการลดปริมาณลิโมนิน ซึ่งจากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าหนึ่งส่วนอัตราเร็วในการลดปริมาณลิโมนิน (นาที / ไมโครโมล) และค่าหนึ่งส่วนความเข้มข้นของลิโมนิน (1 / ไมโครโมล) จะได้เส้นกราฟไลน์วีฟเฟ่อเบิร์ก (Lineweaver burk plot) ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระ ตามภาพที่ 26 จากกราฟสามารถหาค่า K_m และ V_{max} ของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระได้ดังนี้

ค่า K_m ของ *R. fascians* ตรึงรูปมีค่าเป็น 3.404 มิลลิโมล

ค่า V_{max} ของ *R. fascians* ตรึงรูปมีค่าเป็น 13.149 มิลลิโมลต่อนาที

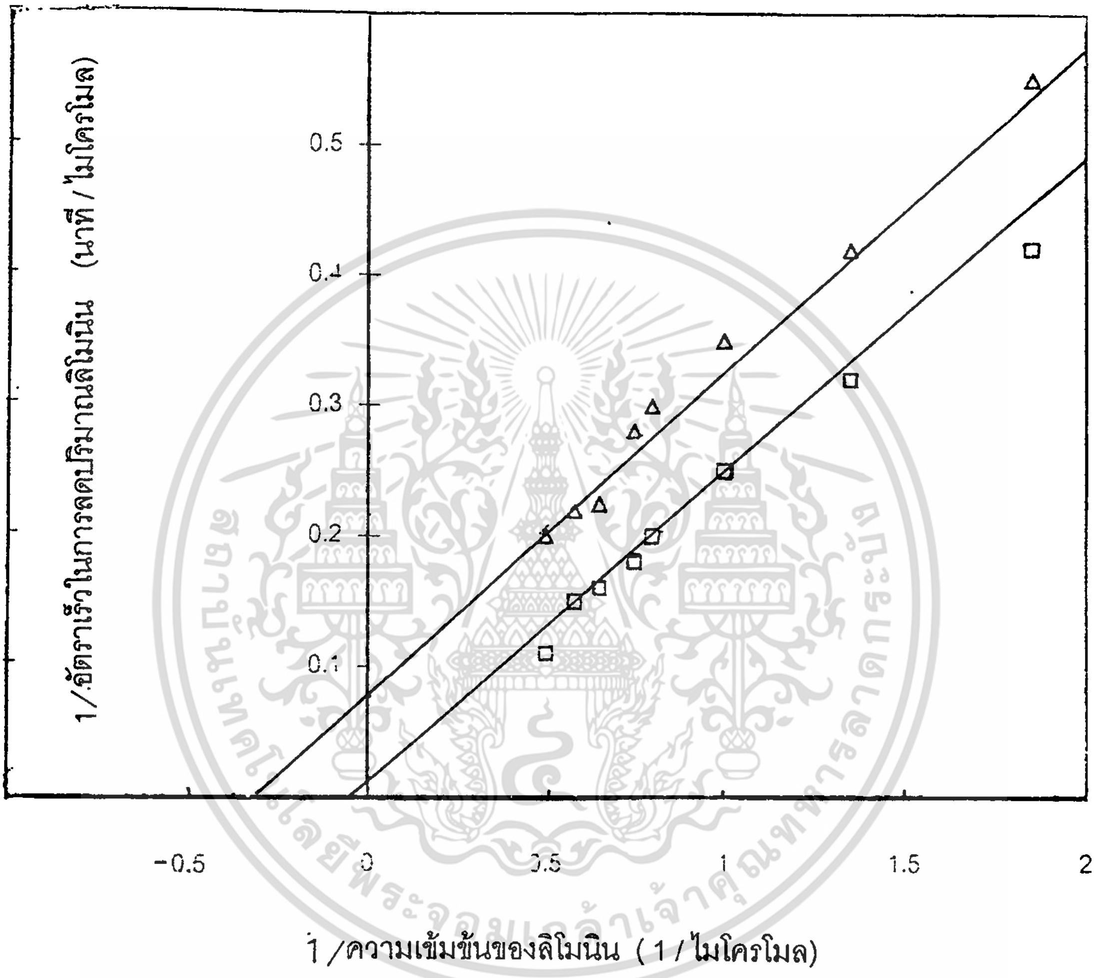
ค่า K_m ของ*R. fascians* อิสระมีค่าเป็น 14.726 มิลลิโมล

ค่า V_{max} ของ*R. fascians* อิสระมีค่าเป็น 66.006 มิลลิโมลต่อนาที

การที่ค่า K_m ของ *R. fascians* ตรึงรูป มีค่าต่ำกว่าค่า K_m ของ *R. fascians* อิสระ แสดงว่าสัมพรรคภาพ (Affinity) หรือการรวมตัวกันระหว่างเซลล์ *R. fascians* ตรึงรูป กับลิโมนินนั้นสูงกว่าสัมพรรคภาพ ระหว่าง *R. fascians* อิสระ กับลิโมนิน และจากการที่ค่า V_{max} ของ *R. fascians* อิสระ มีค่ามากกว่าค่า V_{max} ของ *R. fascians* ตรึงรูป เป็นเพราะว่าเซลล์ *R. fascians* แบบอิสระสามารถสัมผัสกับลิโมนินในน้ำส้มได้ดีกว่าเซลล์ *R. fascians* ที่ถูกตรึงไว้ภายในเม็ดเจลแคปปาคาราจีแนน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 26



แสดงกราฟไลน์วีฟเฟอเบิร์กของ*Rhodococcus fascians* ตรึงรูป (Δ)
และ*Rhodococcus fascians* อิสระ (□) แบบกะ

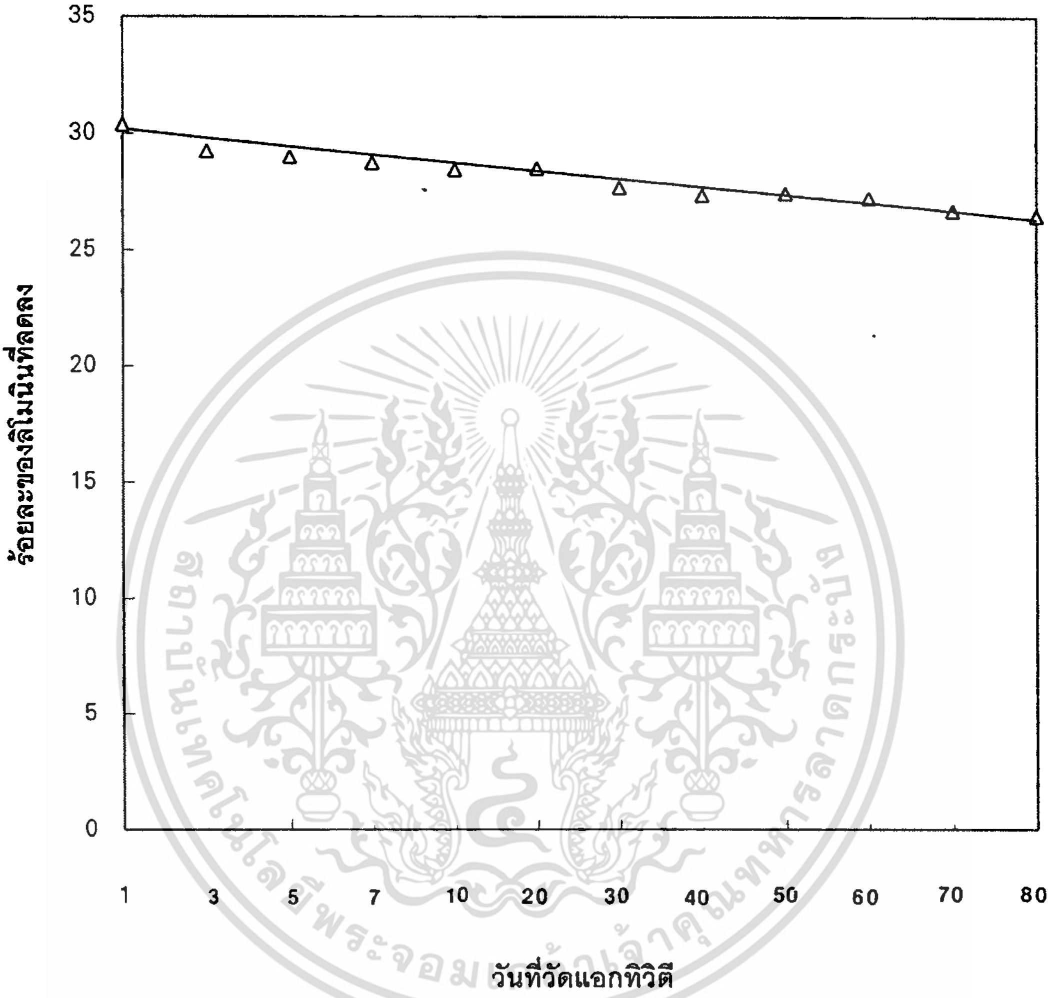
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาเสถียรภาพในการเก็บ *R. fascians* ตรึงรูป และหาค่าครึ่งชีวิต</u>

จากการศึกษาเสถียรภาพในการเก็บ *R. fascians* ตรึงรูป และหาค่าครึ่งชีวิต โดยการเก็บ *R. fascians* ตรึงรูปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปที่ระยะเวลาการเก็บ 1 3 5 7 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 วัน แสดงโดยกราฟในภาพที่ 27 พบว่า กิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาเก็บดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเก็บ *R. fascians* ตรึงรูปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์และสามารถเก็บเซลล์ให้ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ เนื่องจากที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์ในช่วงระยะเวลา 80 วัน จากผลการทดลองพบว่าค่าครึ่งชีวิตของ *R. fascians* ตรึงรูปที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่า 80 วัน โดยอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสนี้จะใกล้เคียงกับอุณหภูมิในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้ในอาหารวุ้นเอียง (Slant agar) แต่จากลักษณะของกราฟที่มีแนวโน้มของการลดลงของกิจกรรม เนื่องจากเซลล์จำนวนหนึ่งได้รับผลจากการถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นช่วงระยะเวลานาน ทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาลดลงในช่วงเริ่มต้นของการทำปฏิกิริยา มีผลให้กิจกรรมของเซลล์ลดลง จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของอัจฉรา และคณะ (1992) ที่รายงานถึงเสถียรภาพของการเก็บรักษา*R. fascians* ตรึงรูปไว้ที่อุณหภูมิ 8 - 10 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิห้อง โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 8 -10 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษา *R. fascians* ตรึงรูปไว้ได้โดยที่กิจกรรมสัมพัทธ์ไม่แตกต่างกัน แต่ที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บรักษา *R. fascians* ตรึงรูปไว้ได้โดยที่กิจกรรมสัมพัทธ์จะลดลงอย่างชัดเจนที่ระยะเวลามากกว่า 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 27



แสดงเสถียรภาพในการเก็บ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก ปริมาณของแคปปาคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) และเม็ดเจลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จำนวน 80 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่มี pH 4.5 จำนวน 64 มิลลิลิตร โดยการเขย่าที่ 140 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

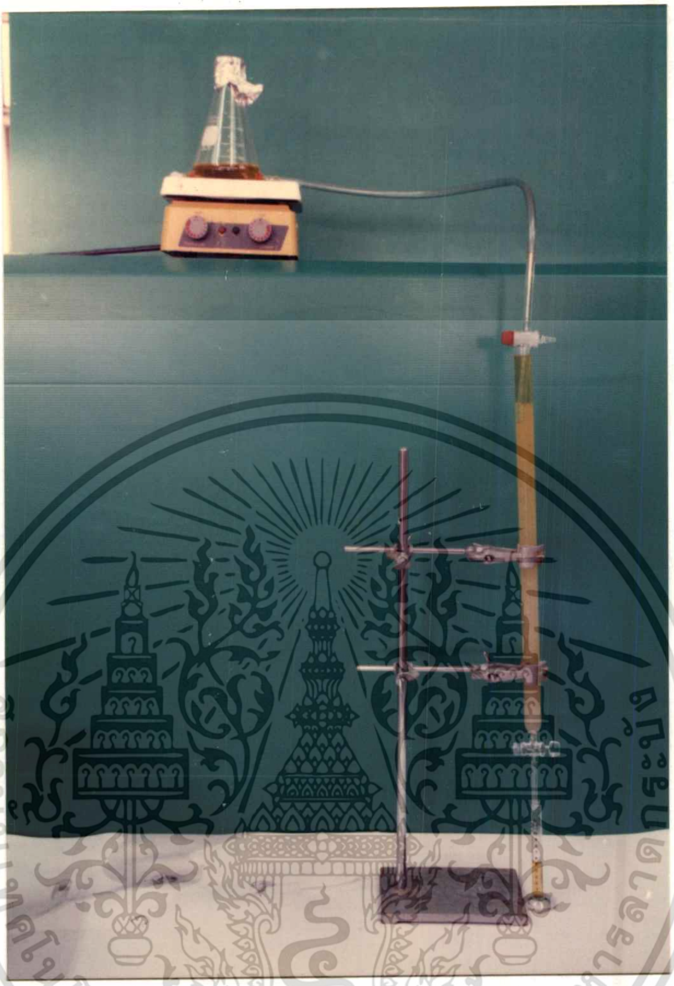
การศึกษาสภาวะดำเนินการในการใช้*R. fascians* ตรึงรูปสำหรับ ลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มแบบต่อเนื่องในท่อปฏิกรณ์

การศึกษาอัตราการไหลของน้ำส้มที่เหมาะสม

จากการศึกษาอัตราการไหลของน้ำส้มที่เหมาะสม ตามการทดลอง โดยดำเนินการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มซึ่งมีความเข้มข้นร้อยละ 100 75 และ 50 โดยปริมาตร ผ่านท่อปฏิกรณ์ที่บรรจุ *R. fascians* ตรึงรูปแบบอัดแน่น ดังแสดงในภาพที่ 28 โดยการควบคุมปริมาตรน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์เป็น 60 มิลลิลิตร แล้วแปรผันอัตราการไหลของน้ำส้ม เป็น 17.5 25 35 50 100 และ 200 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ผลของกิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ แสดงดังกราฟในภาพที่ 29 พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกความเข้มข้นของน้ำส้ม โดยพบว่าน้ำส้มที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100 75 และ 50 จะมีค่าการลดลงของปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 36.4 40.12 และ 46.88 ตามลำดับ โดยการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลของน้ำส้มจะมีผลทำให้กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปลดลง เนื่องจากระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ภายในเซลล์กับลิโมนินลดลง และพบว่าที่อัตราการไหลของน้ำส้มเป็น 25 และ 17.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่มี ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา (Retention time) เป็น 2 และ 2.51 ชั่วโมง ตามลำดับ กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติด้วย DMRT ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งผลของการทดลองนี้ใกล้เคียงกับผลของการทดลองที่ศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* ตรึงรูปแบบกะ ซึ่งพบว่าที่ช่วงระยะเวลา 2 - 5 ชั่วโมง กิจกรรมหรือร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปจะคงที่ เนื่องจาก ระยะเวลาที่มากกว่า 2 ชั่วโมงนั้น เป็นสภาวะคงที่ของปฏิกิริยาของ *R. fascians* ตรึงรูปในแคปปาคาราจีแนน ที่ใช้อัตราส่วนระหว่างเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก และใช้แคปปาคาราจีแนนเข้มข้นร้อยละ 2 (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) จากผลการทดลองนี้จึงเลือกอัตราการไหลของน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์เป็น 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง สำหรับการทดลองครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

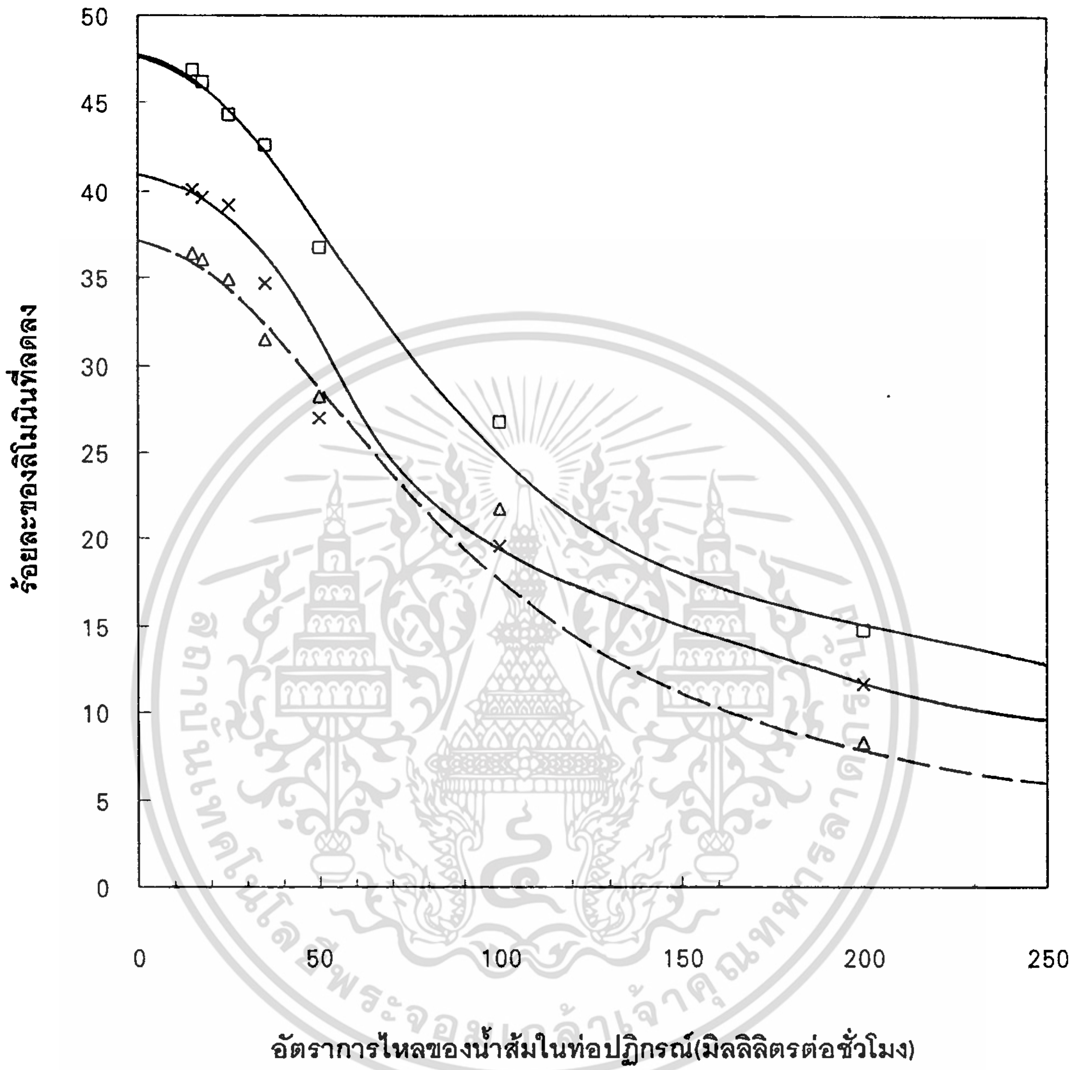
ภาพที่ 28



แสดงการดำเนินการลดปริมาณลิโมนินด้วย *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่น อย่างต่อเนื่อง โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 29



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มที่มีความเข้มข้น 3 ระดับคือ น้ำส้มเข้มข้นร้อยละ 100 (Δ) น้ำส้มเข้มข้นร้อยละ 75 (X) และน้ำส้มเข้มข้นร้อยละ 50 (□) ที่อัตราการไหลต่าง ๆ กัน ในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม

จากการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสม ตามการทดลอง โดยดำเนินการลดปริมาณลิโมนิน ในน้ำส้มผ่านท่อปฏิกรณ์ที่บรรจุ *R. fascians* ตรึงรูปแบบอัดแน่น ที่อุณหภูมิห้อง โดยควบคุมปริมาตรน้ำส้มในท่อเป็น 50 มิลลิลิตร และควบคุมอัตราการไหลเป็น 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แล้วแปรผันค่า pH ของน้ำส้ม ที่ใช้เป็น 2 3 4 5 6 7 8 9 10 และ11 กิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ แสดงโดยกราฟในภาพที่ 30 พบว่า ช่วง pH 4 5 6 และ 7 กิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูปจะไม่แตกต่างกันทางสถิติด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยที่ช่วง pH 4 5 6 และ 7 *R. fascians* ตรึงรูปแบบอัดแน่นในท่อปฏิกรณ์สามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 26.82 29.04 29.45 และ 28.08 ตามลำดับ และช่วงที่ pH ต่ำกว่า 4 พบว่าไม่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ เนื่องจากช่วงที่ pH ต่ำกว่า 6 จะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ลิโมนินวงแหวนแลคโตนดีไฮโดรเลส (Limonin D-ring lactone hydrolase) โดยเอนไซม์นี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการปิดของวงแหวนแลคโตนดี (Lactonization) ของลิโมโนเอทวงแหวนแลคโตนเอ (Limonoate A-ring lactone) กลายเป็นลิโมนิน และช่วงที่ pH ที่ต่ำกว่า 4 ยังทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis) โดยเกิดการปิดของวงแหวนแลคโตนเอของลิโมโนเอท (Limonoate) เป็นการเพิ่มของลิโมนินอีกทางหนึ่ง ซึ่งจากการที่มีลิโมนินเพิ่มขึ้นจะมีผลให้กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปลดลงได้ นอกจากนี้ที่สภาวะที่เป็นกรดและด่างที่ไม่เหมาะสมหรืออยู่ในช่วงที่น้อยกว่า 4 และมากกว่า 7 ดังกล่าวนี้ อาจจะทำให้การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับลิโมนินเกิดขึ้นในอัตราที่ลดลงได้ เนื่องจาก pH มีผลต่อการแตกตัวของเอนไซม์และลิโมนิน ซึ่งทำให้รูปร่างของเอนไซม์และลิโมนินเปลี่ยนแปลงไปและไม่สามารถจับกันได้ และช่วง pH ที่ไม่เหมาะสมยังทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้เช่นกัน ดังนั้นกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปที่ลดลงจะมีสาเหตุจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณลิโมนินและการลดลงของอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ภายในเซลล์กับลิโมนิน โดยผลมาจากช่วง pH ดังกล่าว ช่วง pH 4 5 6 และ 7 ที่ได้จากการทดลองนี้ สอดคล้องกับผลการทดลองที่ศึกษาค่า pH ที่มีผลต่อการทำงานของ *R. fascians* ตรึงรูปที่ดำเนินการแบบกะ พบว่าช่วง pH 4 5 6 และ 7 เป็นช่วง pH ที่เหมาะสมกับกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูป

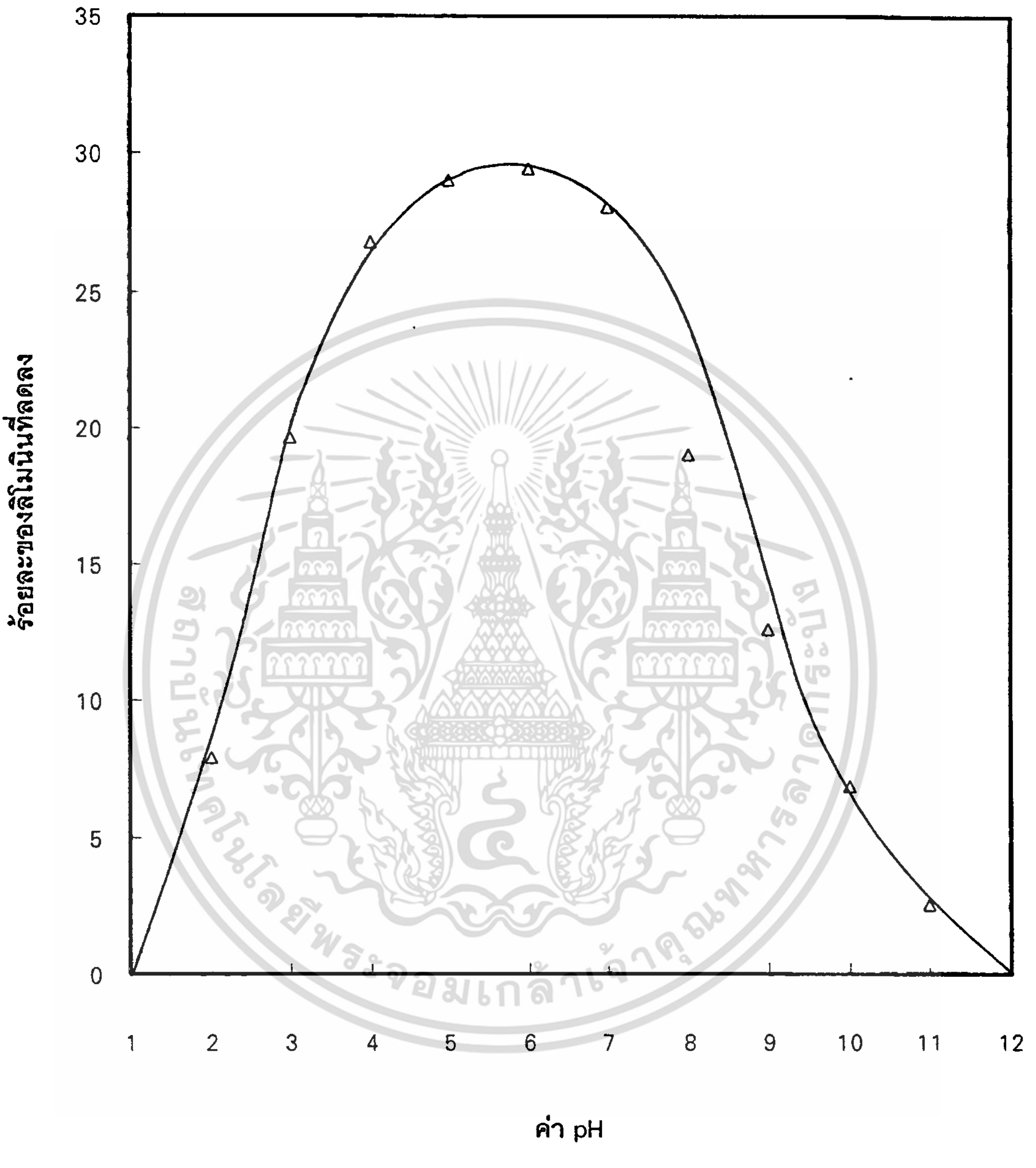
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองในครั้งนี้ สอดคล้องกับการรายงานการทดลองของ A.Manjon และ คณะ (1991) ที่ศึกษาพบว่า pH 5 6 และ 7 เป็นช่วงที่เหมาะสมกับการทำงานของกิจกรรมของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบกวนอย่างต่อเนื่องสำหรับการลดความขมอันเนื่องมาจากลิโมนิน และช่วงที่ pH ที่ต่ำกว่า 5 จะทำให้ร้อยละของการเปลี่ยนแปลงของลิโมนิน ลดลง นอกจากนี้จากรายงานของ อัจฉรา และคณะ (1992) ที่ศึกษาพบว่า pH 4 และ 5 เป็นช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลล์ *Corynebacterium fascians* ตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบกวนสำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวไทย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 30



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มที่มี pH ระดับต่าง ๆ ในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่มีอัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

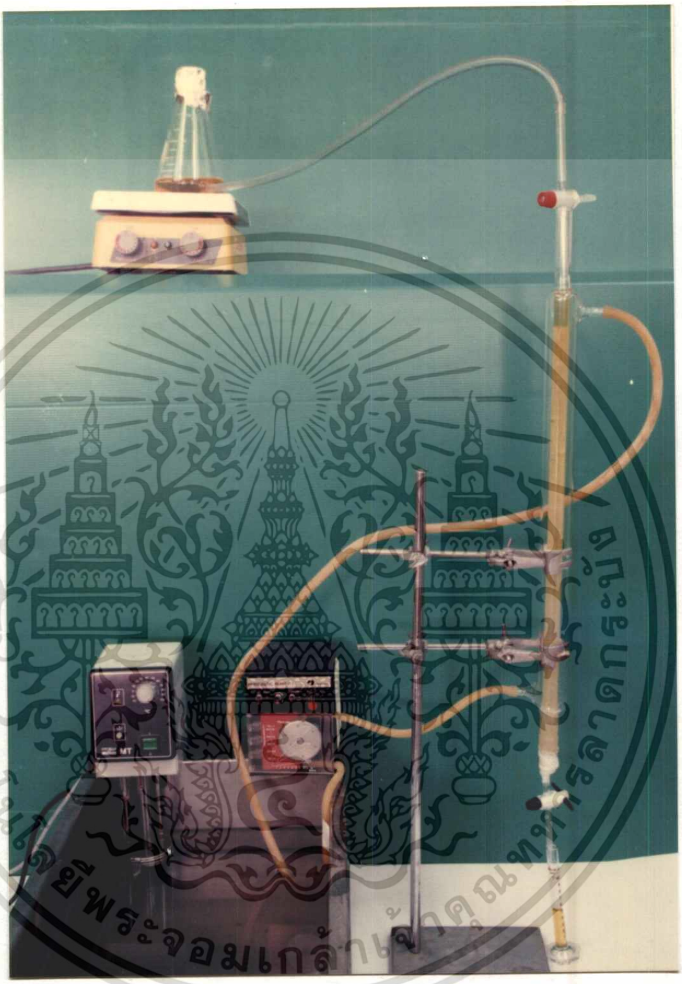
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม</u>

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม ตามการทดลอง โดยดำเนินการลดปริมาณลิโมนิน ในน้ำส้มผ่านท่อปฏิกรณ์ที่บรรจุ *R. fascians* ตรึงรูปแบบอัดแน่น ดังแสดงในภาพที่ 31 โดยควบคุมปริมาตรน้ำส้มในท่อเป็น 50 มิลลิลิตร และควบคุมอัตราการไหลเป็น 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แล้ว แปรผันอัตราการไหลโดยการแปรผันอุณหภูมิในการทดลองสำหรับท่อปฏิกรณ์เป็น 7 ระดับ คือ 10 20 28 35 45 50 และ 65 องศาเซลเซียส ผลของกิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนิน ที่ลดลงของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ แสดงโดยกราฟในภาพที่ 32 พบว่าช่วงอุณหภูมิ 20 - 35 องศาเซลเซียส กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 20 28 และ 35 องศาเซลเซียส *R. fascians* ตรึงรูปแบบอัดแน่นในท่อปฏิกรณ์สามารถลดปริมาณลิโมนินได้สูงสุดร้อยละ 31.97 34.55 และ 32.495 ตามลำดับ และผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาอุณหภูมิที่มีต่อการทำงานของ *R. fascians* ตรึงรูปแบบกะ โดยพบว่า อุณหภูมิในช่วง 20 - 35 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่เหมาะสมกับการทำงานของเซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปแบบกะ นอกจากนี้ผลการทดลองยังสอดคล้องกับรายงานผลการทดลองของ A. Manjon และคณะ (1991) ที่ศึกษาพบว่า ช่วงอุณหภูมิ 20 - 30 องศาเซลเซียส ยังเป็นช่วงที่เหมาะสมกับการทำงานของกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในถังปฏิกรณ์แบบกวนอย่างต่อเนื่องสำหรับการลดความขมอันเนื่องมาจากลิโมนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

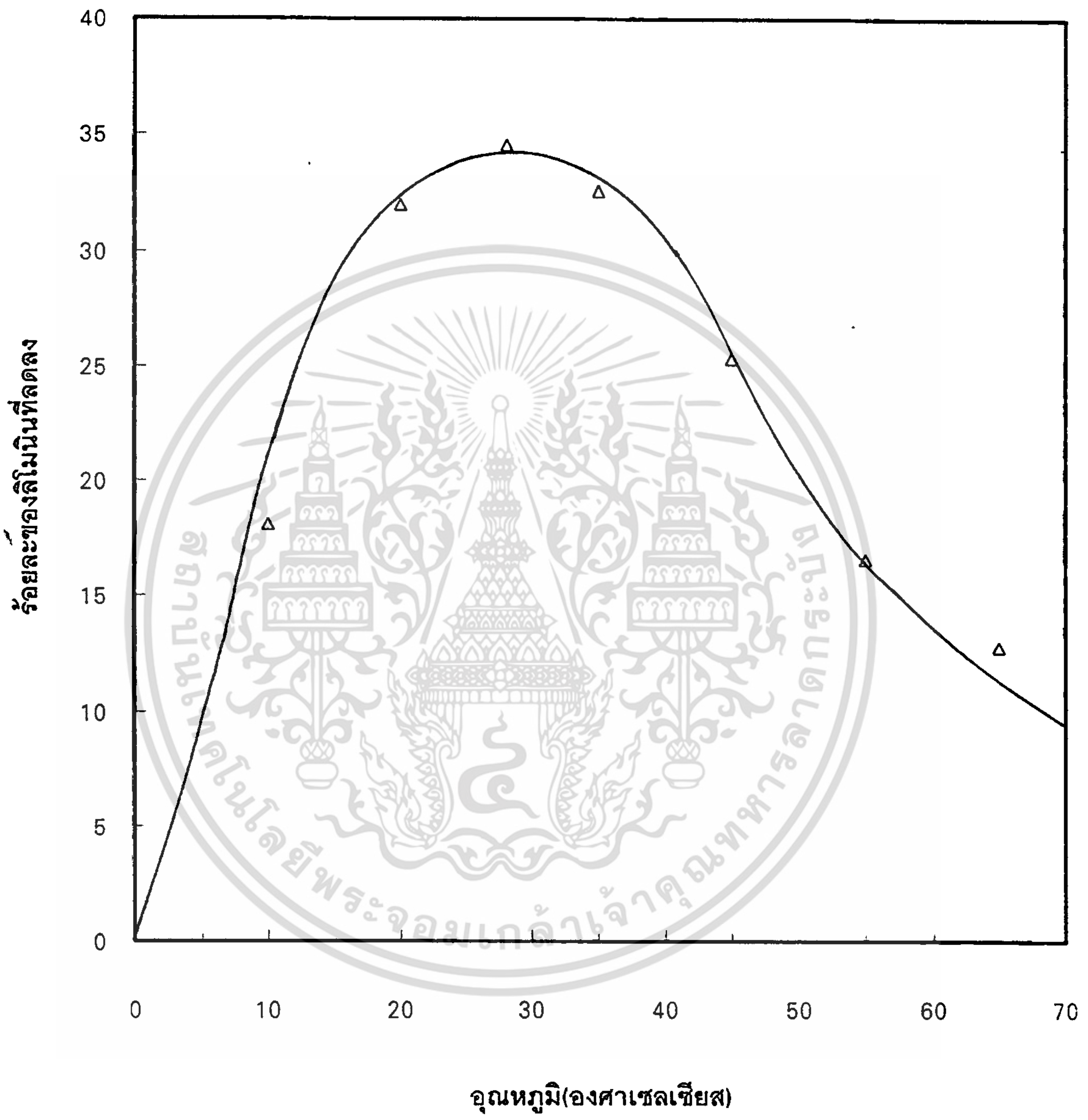
ภาพที่ 31



แสดงการดำเนินการลดปริมาณลิโมนินด้วย *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง ที่มีการควบคุมอุณหภูมิของท่อปฏิกรณ์ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้ม ที่ถูกควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 32



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง ที่อุณหภูมิ ระดับต่าง ๆ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุ *R. fascians* ตรึงรูป จำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

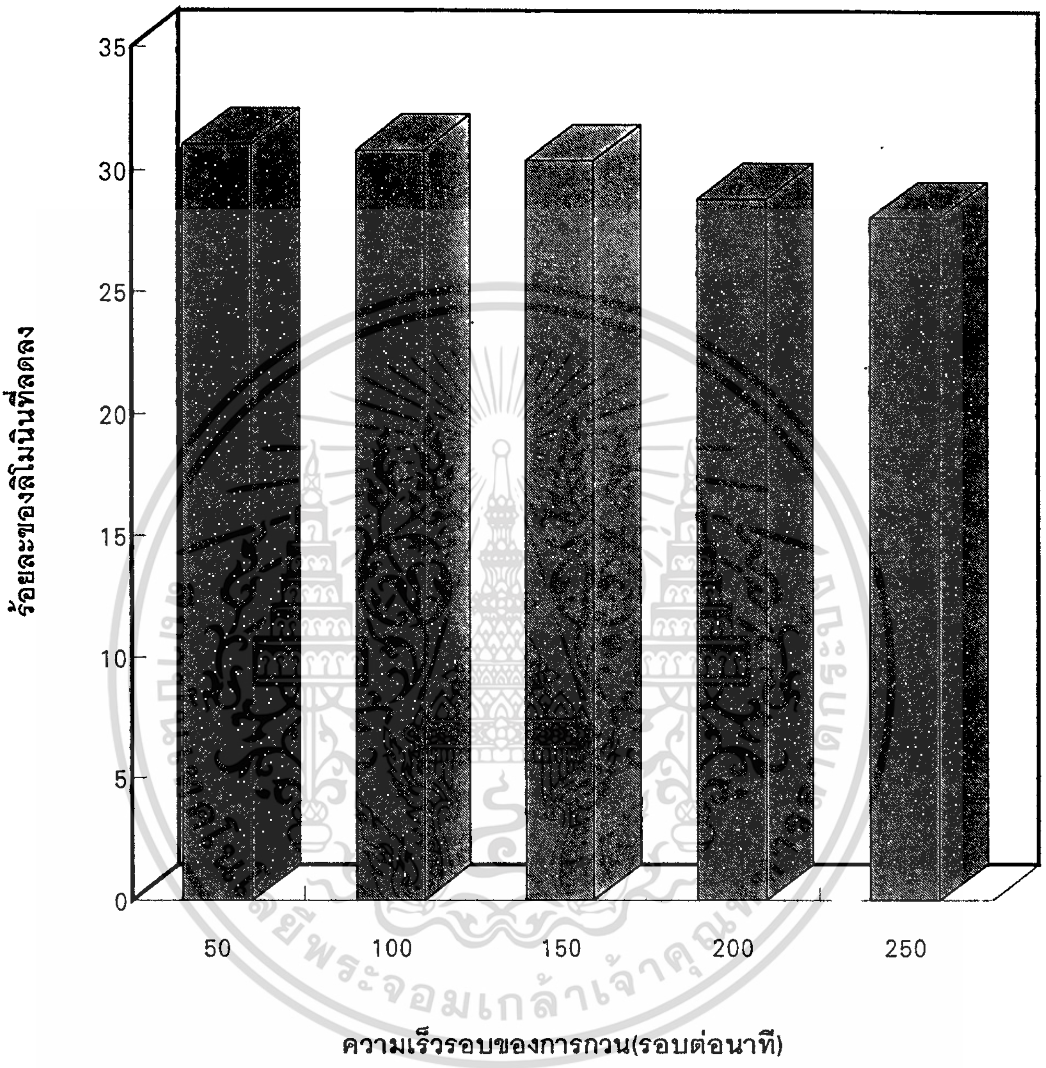
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยา</u>

จากการศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยา โดยการแปรผันอัตราการเติมอากาศให้น้ำส้มก่อนการทำปฏิกิริยาที่ควบคุมด้วยการกวนของแท่งแม่เหล็กเป็น 5 ระดับคือ 50 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที ผลของกิจกรรมหรือค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงของ*R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ แสดงดังกราฟในภาพที่ 33 ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ระหว่างอัตราการเติมอากาศที่ควบคุมด้วยการกวนของแท่งแม่เหล็กทั้ง 5 ระดับ คือ 50 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที โดยพบว่า ค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงเป็น 31.05 30.79 30.4 28.85 และ 28.1 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม อากาศก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลช่วยเพิ่มกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่น ถ้าจุลินทรีย์นั้นเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศ ดังผลการทดลองของ A.Manjon และคณะ (1991) ที่ศึกษาผลของการเติมอากาศโดย 1) มีการเติมอากาศเข้าไปประหว่างการทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์ 2) มีการเติมอากาศก่อนการทำปฏิกิริยาในถังปฏิกรณ์ และ 3) การไม่เติมอากาศจะทำให้อัตราการเปลี่ยนแปลงของลิโมนินเป็นร้อยละ 94.0 87.1 และ 82.3 ตามลำดับ จะพบว่ากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปลดลงอย่างชัดเจน เนื่องจากรูปแบบของถังปฏิกรณ์ที่ใช้เป็นถังกวนซึ่งมีประสิทธิ ภาพในการเติมอากาศที่ดีกว่าการเติมอากาศ โดยการกวนด้วยแท่งแม่เหล็กในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยา ของการทดลองในครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 33



แสดงกิจกรรมของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง ด้วยการเติมอากาศ ในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยา ที่การกวนระดับต่างๆ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

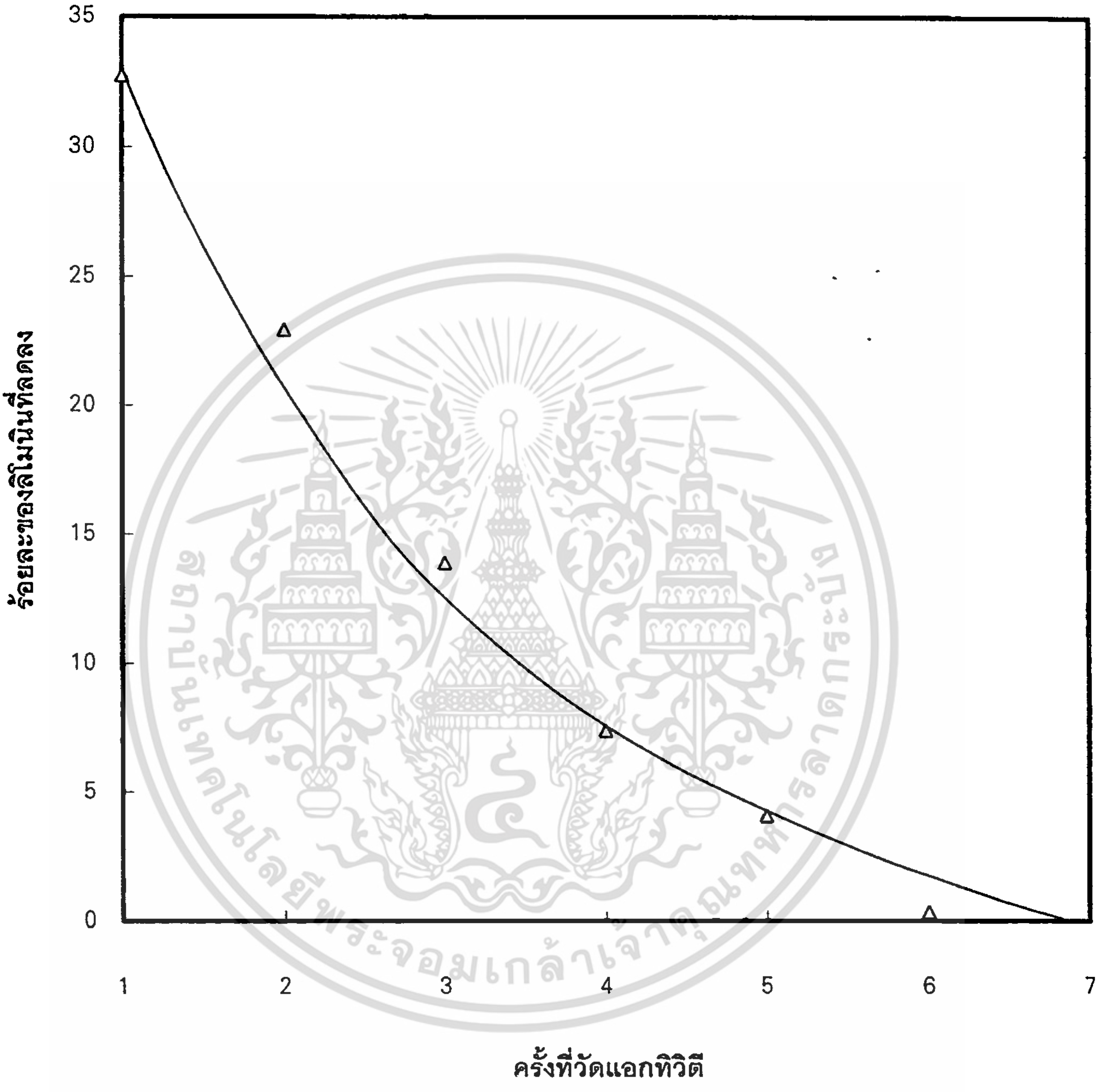
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาการนำ *R. fascians* ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกัน</u>

จากการศึกษาการนำ *R. fascians* ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกัน โดยการนำ *R. fascians* ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกันในท่อปฏิกรณ์ และในแต่ละครั้งจะผ่านน้ำส้มปริมาตร 48 มิลลิลิตร ลงไป ผลของกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ แสดงโดยกราฟในภาพที่ 34 พบว่ากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปจะลดลง และลักษณะของเม็ดเจลจะนิ่มมากสำหรับการใช้มากกว่า 2 ครั้งขึ้นไป สาเหตุที่กิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปลดลงเมื่อมีการนำมาใช้ติดต่อกันมากกว่า 1 ครั้ง เนื่องจากการสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานไปบางส่วนของเอนไซม์ในครั้งแรก ๆ และสำหรับการที่ลักษณะของเม็ดเจลที่มีความแข็งลดลงเป็นเพราะความเป็นกรดของน้ำส้ม และอาจเนื่องจากการที่โมเลกุลของคาราจีแนนสามารถละลายได้เล็กน้อย เมื่อมีซิเตรทอยู่ในน้ำส้ม ซึ่งเป็นการละลายของพอลิเมอร์ธรรมชาติเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของอิออนอยู่สูง โดยปรากฏการณ์นี้เป็นลักษณะเดียวกับที่เกิดขึ้นในแอลจิเนต แต่ผลดังกล่าวที่มีต่อแคปปาคาราจีแนนจะน้อยกว่าและเป็นไปได้ช้ากว่าที่เกิดในแอลจิเนต ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถนำ *R. fascians* ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกันสำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องได้ 2 ครั้ง โดยที่ค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงยังคงมากกว่าร้อยละ 50 ของค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงในครั้งแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 34



แสดงกิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบอัดแน่นอย่างต่อเนื่อง ที่นำมาใช้ติดต่อกันโดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก วิตามินซี และ pH ของน้ำส้มหลังจากปริมาณของกระบวนการลดลิโมนิน</u>

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก วิตามินซี และ pH ของน้ำส้มหลังจากปริมาณของกระบวนการลดลิโมนิน ตามการทดลอง โดยการนำ *R. fascians* ตรึงรูปมาดำเนินการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์ ผลการลดลงของปริมาณ ลิโมนิน และการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก วิตามินซี และค่า pH ของน้ำส้ม หลังกระบวนการลดปริมาณลิโมนิน แสดงดังตารางที่ 8 พบว่าในกระบวนการลดลิโมนิน ด้วยเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป ในท่อปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องที่ใช้อัตราการไหลของน้ำส้มเป็น 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยการเปรียบเทียบกับกระบวนการลดลิโมนินด้วยเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปแบบกะที่อุณหภูมิห้อง จะมีผลในการทำให้สารลิโมนินที่มีอยู่ในน้ำส้มลดลงในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจากการพิจารณาระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่าง *R. fascians* ตรึงรูปแบบกะ จะพบว่าใช้ระยะเวลาที่เท่ากันคือมากกว่า 2 ชั่วโมง โดยทำให้มีค่าร้อยละของการลดลงของลิโมนินใกล้เคียงกัน สำหรับกระบวนการลดลิโมนิน ด้วยเซลล์ *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องนั้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง กลูโคส ซู โครส และ ฟรุคโตส แล้ว พบว่าฟรุคโตสจะมีปริมาณลดลงมากที่สุด เนื่องจากการถูกดูดซับโดยแคปปาคาราจีแนนซึ่งมีลักษณะของโครงสร้างที่เป็นรูพรุน นอกจากนี้ยังอาจมีสาเหตุมาจากการถูกเมแทบอลิซึม โดยเซลล์ *R. fascians* ซึ่งมีความสามารถในการใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่ากลูโคสและซูโครส ตามรายงานของ Hasegawa และKing (1984) ดังนั้นในระหว่างการทำปฏิกิริยา เซลล์จึงสามารถมีเมแทบอลิซึมต่อฟรุคโตสได้เช่นเดียวกับที่มีเมแทบอลิซึมต่อลิโมนิน สำหรับการลดลงของกรดซิตริก และวิตามินซี เป็นผลจากการดูดซับของเม็ดเจลแคปปาคาราจีแนน เนื่องจากการเปรียบเทียบกับการลดลงของกรดซิตริกและวิตามินซี โดยการใช้เม็ดเจล แคปปาคาราจีแนนที่ปราศจากเซลล์แล้วพบว่า มีการลดลงของของกรดซิตริก และวิตามินซีที่ไม่แตกต่างกันมาก นอกจากนี้ยังพบว่าค่า pH ของน้ำส้มจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังกระบวนการลดปริมาณลิโมนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8

แสดงการเปลี่ยนแปลงของ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส กรดซิตริก วิตามินซี และ pH ของน้ำส้มหลังผ่านกระบวนการลดลิโมนินด้วย *R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ โดยท่อปฏิกรณ์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุเม็ด *R. fascians* ตรึงรูปจำนวน 60 มิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับน้ำส้มที่ควบคุมปริมาตรเป็น 48 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหลของน้ำส้ม 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

	ปริมาณก่อนผ่านกระบวนการ	ปริมาณหลังผ่านกระบวนการ	ร้อยละที่ลดลง
ลิโมนิน	12.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	8.790 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	30.40
ฟรุคโตส	1.099 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	0.985 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	10.37
กลูโคส	1.137 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	1.109 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	2.46
ซู โครส	2.091 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	1.989 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	4.88
กรดซิตริก	1.620 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	1.380 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม	14.81
แอสคอบิค	24.25 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้ม 100 กรัม	21.20 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้ม 100 กรัม	13.81
ค่าพีเอช	4.23	4.28	–

หมายเหตุ : ในการลดปริมาณลิโมนินโดยการใช้ *R. fascians* ตรึงรูปแบบกะ (Batch process) จะทำให้ลิโมนินลดลงร้อยละ 32.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. อากาศไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม ที่อุณหภูมิห้อง ในช่วงระยะเวลา 6 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสามารถทำการทดลองการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้ม ด้วยการใช้ *Rhodococcus fascians* โดยไม่ต้องคำนึงถึงปัจจัยของอากาศที่จะมีผลต่อการรบกวนปฏิกิริยาการลดปริมาณลิโมนินในช่วงเวลาดังกล่าว

2. การนำเซลล์ *Rhodococcus fascians* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวฟรุคโตส มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวลิโมนินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์จุลินทรีย์เหล่านั้นไปใช้ในกระบวนการลดลิโมนิน จะสามารถชักนำให้เซลล์จุลินทรีย์มีเมแทบอลิซึมต่อสารลิโมนิน ในระหว่างการทำปฏิกิริยาการลดลิโมนินได้

3. ในการเปรียบเทียบวัสดุตรึงที่ใช้ในการตรึงเซลล์ *Rhodococcus fascians* พบว่าการตรึงเซลล์ในแคปปาคาราจีแนนมีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากกิจกรรม อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาการลดปริมาณลิโมนิน และความคงรูปของเม็ดเจลที่ดี เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการลดความขมอันเนื่องมาจากสารลิโมนินในท่อปฏิกรณ์

4. สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียม *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป สำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มแบบกะ

4.1 อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปาคาราจีแนนเป็น 1 : 3 โดยน้ำหนัก

4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดเจลตรึงรูปเป็น 4 มิลลิเมตร

4.3 ความเข้มข้นของโปตัสเซียมคลอไรด์ ที่ใช้ในการขึ้นรูปเม็ดเจลเป็น 0.5 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. จลนพลศาสตร์ของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปสำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มแบบกะ

5.1 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเซลล์ *Rhodococcus fascians* อิสระในน้ำส้มเป็น 2.5 ชั่วโมงและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มเป็น 2 ชั่วโมง

5.2 ค่า K_m ของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มเป็น 3.404 มิลลิโมล ค่า V_{max} ของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มเป็น 13.149 มิลลิโมลต่อนาที ค่า K_m ของเซลล์ *Rhodococcus fascians* อิสระในน้ำส้มเป็น 14.726 มิลลิโมล และ ค่า V_{max} ของเซลล์ *Rhodococcus fascians* อิสระในน้ำส้มเป็น 66.006 มิลลิโมลต่อนาที

5.3 ค่า pH ที่เหมาะสมของเซลล์ *Rhodococcus fascians* อิสระในน้ำส้ม 5 - 7 และค่า pH ที่เหมาะสม ของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มเป็น 4 - 7

5.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ *Rhodococcus fascians* อิสระ ในน้ำส้มอยู่ ในช่วง 28 - 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปในน้ำส้มอยู่ในช่วง 20 - 35 องศาเซลเซียส,

6. ในการศึกษาเสถียรภาพในการเก็บ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าครึ่งชีวิตของ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป มีค่ามากกว่า 80 วัน

7. สภาวะที่เหมาะสมในการใช้ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป สำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์แบบต่อเนื่อง

7.1 อัตราการไหลของน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์เป็น 25 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

7.2 ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินการอยู่ในช่วง 4 - 7

7.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินการอยู่ในช่วง 20 - 35 องศาเซลเซียส

8. สามารถนำ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูปมาใช้ติดต่อกันสำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์แบบต่อเนื่องได้ 2 ครั้ง โดยที่ค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงยังคงมากกว่าร้อยละ 50 ของค่าร้อยละของลิโมนินที่ลดลงในครั้งแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ผลจากการดำเนินการใช้ *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป สำหรับการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์แบชต่อเนื่อง

9.1 ลิโมนินสามารถลดลงได้จาก 14.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 9.76 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือลดลงร้อยละ 32.74

9.2 ฟรุคโตส เปลี่ยนแปลงลดลงจากปริมาณ 1.099 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม เป็น 0.985 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม หรือลดลงร้อยละ 10.37

9.3 กลูโคส เปลี่ยนแปลงลดลงจากปริมาณ 1.137 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม เป็น 1.109 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม หรือลดลงร้อยละ 2.46

9.4 ซูโครส เปลี่ยนแปลงลดลงจากปริมาณ 2.091 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม เป็น 1.989 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม หรือลดลงร้อยละ 4.88

9.5 กรดซิตริก เปลี่ยนแปลงลดลงจากปริมาณ 1.620 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม เป็น 1.380 กรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม หรือลดลงร้อยละ 14.81

9.6 วิตามินซี เปลี่ยนแปลงลดลงจากปริมาณ 24.25 มิลลิกรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม เป็นมิลลิกรัมต่อน้ำส้ม 100 กรัม หรือลดลงร้อยละ 13.81

9.7 ค่า pH เปลี่ยนแปลงจาก 4.23 เป็น 4.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยในครั้งนี้ สามารถปรับปรุงและพัฒนาวิธีการลดปริมาณลิโมนินในน้ำส้มได้ โดยมีแนวทางดังต่อไปนี้

1. การปรับปรุงวิธีการขึ้นรูปเม็ดเจลแคปปาคาราจีแนน โดยการขึ้นรูปให้เป็นเม็ดด้วยการปั๊มเพอริสตัลติก ที่สามารถขึ้นรูปและควบคุมความกลมของเม็ดเจลให้มีขนาดตามที่ต้องการได้สะดวกกว่าการขึ้นรูปด้วยกระบอกฉีดยา

2. การศึกษาใช้เชื้อจุลินทรีย์อื่นที่มีเมแทบอลิซึมต่อลิโมนินสูงกว่าเชื้อ *R. fascians* และเชื้อนั้นต้องไม่ทำให้ปริมาณของสารสำคัญที่มีอยู่ในน้ำส้มเช่น น้ำตาล กรดซิตริก กรดแอสคอบิค รวมทั้งสารที่ทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของน้ำส้มเปลี่ยนแปลงไป

3. การพัฒนารูปแบบของท่อปฏิกรณ์ที่ใช้ เช่น ท่อปฏิกรณ์แบบฟลูอิดไดเซชั่น (Fluidzed reactor) หรือท่อปฏิกรณ์แบบอากาศยก (Air-lift reactor) ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแพร่ผ่านของน้ำส้มเข้าไปภายในเม็ดเจลได้ดีขึ้น

4. การเลือกใช้วิธีการตรึงเซลล์แบบอื่น ได้แก่ การตรึงทางกายภาพในวัสดุที่มีความพรุน (Physical entrapment in porous materials) การตรึงด้วยวิธีการดูดซับไว้ในวัสดุที่ไม่ละลายน้ำ (Adsorption on insoluble materials) และการตรึงด้วยการเชื่อมขวางแบบโคเวเลนท์ (Covalent cross-linking) เป็นต้น

5. การพัฒนาวิธีการนำเม็ดเจล *Rhodococcus fascians* ตรึงรูป กลับมาใช้ให้ได้มากครั้งขึ้นเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

1. ปราณี อ่านเปรื่อง. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 2. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2534.

2. **อัจฉรา** ปิติปัญญากุล. เซลล์*R. fascians* ตรึงรูปสำหรับการลดความขมในน้ำมะนาวถนอม. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. 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 triter-pene 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 deoxy-limonin," 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 stereo-chemical 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 dehydro-genase 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. Alka-line 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

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แสดงสูตรอาหารที่ใช้

1. อาหารวุ้นสำหรับ *Rhodococcus fascians* NRRL-B-15096 (ต่อปริมาตร 1 ลิตร)

สูตรอาหาร Brain Heart Infusion Agar ประกอบด้วย

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

ปรับค่า pH เป็น 7.4

2. สูตรอาหารเหลวฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน(ต่อปริมาตร 1 ลิตร)

ฟรุคโตส	4	กรัม
Nutrient broth	2	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์(NH_4Cl)	2	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4)	0.5	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์(NaCl)	0.1	กรัม
เฟอริกคลอไรด์($FeCl_3$)	0.001	กรัม

ปรับค่า pH 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สูตรอาหารเหลวลิโมนิน(ต่อปริมาตร 1 ลิตร)

ลิโมนินที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	2	กรัม
Nutrient broth	2	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์(NH_4Cl)	2	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K_2HPO_4)	0.5	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4).	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์(NaCl)	0.1	กรัม
เฟอริกคลอไรด์($FeCl_3$)	0.001	กรัม
ปรับค่า pH 7		

4. ส่วนผสมของการทำอะคริลาไมด์เจล

Acrylamide	2.85	กรัม
Bisacrylamide(N,N′-methylene-bis-acrylamide)	0.15	กรัม
Ammonium persulphate	10	มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 9

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาผลของอากาศต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณลิโมนินใน น้ำส้ม ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized complete block desing, RCB)

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	1	0.649	0.649	3.43^{ns}
Block	3	0.951	0.317	1.67^{ns}
Error	3	0.567	0.189	
Total	7	2.168		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงสภาวะที่มีการเติมอากาศและสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศ

Block หมายถึงระยะเวลาที่วัดปริมาณลิโมนิน

ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 10

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาระยะเวลาเหมาะสมที่ชักนำให้จุลินทรีย์มีเมแทบอลิซึม ต่อสารลิโมนิน ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์หรือ RCB

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	3	231.55	77.13	55.49^{ns}
Block	6	2637.55	439.59	316.25^{ns}
Error	18	25.06	1.39	
Total	27	2894.02		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงระยะเวลาที่ใช้ในการชักนำคือ 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง

Block หมายถึงระยะเวลาที่วัดกิจกรรม

** หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการเปรียบเทียบและคัดเลือกวัสดุตรึงที่ เหมาะสมสำหรับตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์หรือ RCB

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	4	1725.32	431.33	167.76**
Block	7	371.45	53.06	20.02**
Error	28	74.23	2.65	
Total	39	2171.01		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงวัสดุที่ใช้ในการตรึงคือ คาราจีแนน อะการ์ อะกาโรส แอลจิเนต และ อะคริลาไมด์

Block หมายถึงระยะเวลาที่วัดกิจกรรม

** หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 12

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และแคปปาคาราจีแนน ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์หรือ RCB

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	3	366.67	122.23	53.18**
Block	5	674.60	134.92	58.71**
Error	15	34.47	2.29	
Total	23	1075.74		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และแคปปาคาราจีแนน

Block หมายถึงระยะเวลาที่วัดกิจกรรม

** หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาขนาดที่เหมาะสมของเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มในบล๊อคสมบูรณ์หรือ RCB

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	3	47.96	15.99	30.23**
Block	5	1013.99	202.79	383.44**
Error	15	7.93	0.53	
Total	23	1069.89		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ด *R. fascians* ตรึงรูป

Block หมายถึงระยะเวลาที่วัดกิจกรรม

** หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 14

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของ *R. fascians* ตรึงรูปด้วยวิธี Duncan' s new multiple range test หรือ DMRT

ระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยา (นาที)	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง *R. fascians* อิสระ	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง *R. fascians* ตรึงรูป
30	15.47[d]	11[c]
60	23.21[c]	18.6[b]
90	28.57[c]	22[b]
120	36.31[b]	28.4[a]
150	43.88[a]	30.55[a]
180	46.42[a]	29.4[a]
210	47.61[a]	30.8[a]
240	48.21[a]	31.7[a]

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลที่ตามด้วยอักษร a b c และ d เหมือนกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ สารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) หรือ CRD

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	3	2.036	0.676	5.63^{ns}
Error	4	0.482	0.12	
Total	7	2.519		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงความเข้มข้นของสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์

ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 16

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลอง การศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มของแคปปาคาราจีแนน ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด หรือ CRD

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	4	1.213	0.303	4.939^{ns}
Error	5	0.307	0.061	
Total	9	1.521		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงระยะเวลาที่วัดกิจกรรมหลังการกรองเม็ด*R. fascians* ตรึงรูป

ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษากิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูป และ*R. fascians* อิสระ ที่ pH ระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT

pH	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง	
	R. fascians อิสระ	*R. fascians* ตรึงรูป
2	3.98^{d}	9.02^{c}
3	9.01^{c}	12.05^{b}
4	13.5^{b}	18.2^{a}
5	19.45^{a}	19.1^{a}
6	23.24^{a}	18^{a}
7	20.02^{a}	17.89^{a}
8	12.65^{b}	12.6^{b}
9	6.31^{c}	8.52^{c}
10	2.54^{d}	4.6^{d}
11	1.34^{e}	3.1^{d}
12	0^{e}	1.04^{e}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลที่ตามด้วยอักษร a b c d และ e เหมือนกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18

แสดงการวิเคราะห์ผล การทดลองการศึกษากิจกรรมของ *R. fascians* ตรึงรูปและ *R. fascians* อิสระที่อุณหภูมิระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง *R. fascians* อิสระ	*R. fascians* ตรึงรูป
10	13.64^{c}	15.98^{b}
20	19.6^{b}	21.94^{a}
28	26.95^{a}	22.1^{a}
35	24.85^{a}	22.05^{a}
45	17.84^{b}	16.33^{b}
55	11.81^{c}	13.4^{c}
65	7.38^{d}	8.03^{d}

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลที่ตามด้วยอักษร a b c และ d เหมือนกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 19

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาเสถียรภาพในการเก็บ*R. fascians* ตรึงรูป ด้วยวิธี DMRT

ระยะเวลาที่เก็บ (วัน)	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง
3	30.39[a]
5	29.265[a]
7	29.005[a]
10	28.75[a]
20	28.465[a]
30	28.515[a]
40	27.68[a]
50	27.35[a]
60	27.435[a]
70	27.225[a]
80	26.685[a]

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลที่ตามด้วยอักษร a เหมือนกันจะไม่แตกต่างกันทาง
สถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาอัตราการของน้ำส้มในท่อปฏิกรณ์ ด้วยวิธี DMRT

อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง		
	น้ำส้ม 100 %	น้ำส้ม 75 %	น้ำส้ม 50 %
15	36.4[a]	40.12[f]	46.88[k]
17.5	36.03[a]	39.63[f]	46.20[k]
25	34.94[a]	39.13[f]	44.32[l]
35	31.49[b]	34.66[g]	42.64[l]
50	28.23[c]	26.92[h]	36.72[m]
100	21.83[d]	19.56[i]	26.72[n]
200	8.29[e]	11.69[j]	14.70[o]

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลที่ตามด้วยอักษร a b c d e f g h I j k l m n และ o เหมือนกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 21

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษากิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูปในท่อปฏิกรณ์ที่ pH ระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT

pH	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง
2	7.94[d]
3	19.65[b]
4	26.82[a]
5	29.04[a]
6	29.45[a]
7	25.8[a]
8	19.04[b]
9	12.6[c]
10	6.9[d]
11	2.54[e]
12	0.0[f]

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลที่ตามด้วยอักษร a b c d e และ f เหมือนกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษากิจกรรมของ*R. fascians* ตรึงรูป และ*R. fascians* อิสระที่อุณหภูมิระดับต่างๆ ด้วยวิธี DMRT

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	ร้อยละของลิโมนินที่ลดลง
10	18.00[c]
20	28.3[a]
28	31.54[a]
35	30.225[a]
45	21.135[b]
55	16.625[c]
65	12.76[d]

หมายเหตุ ค่าของข้อมูลที่ตามด้วยอักษร a b c และ d เหมือนกันจะไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 23

แสดงการวิเคราะห์ผลการทดลองการศึกษาการเติมอากาศที่เหมาะสมในน้ำส้มก่อนทำปฏิกิริยาใน ท่อปฏิกรณ์ ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด หรือ CRD

	DF	SS	MS	F-value
Treatment	4	13.376	3.344	4.28 [ns]
Error	5	3.90	0.780	
Total	9	17.278		

หมายเหตุ Treatment หมายถึงระยะเวลาที่วัดกิจกรรมหลังการกรองเม็ด*R. fascians* ตรึงรูป

ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 24

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลิโมนินและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC

ปริมาณลิโมนิน (X , ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ (Y)	Y = a X
15	1479	1245
30	2757	2490
90	9126	7470
125	10096	10375
250	23231	20750
500	41464	41500

จากความสัมพันธ์ $Y = a X + b$

$$a = [\, n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y) \,] / [\, (n \sum X^2) - (\sum X)^2 \,]$$

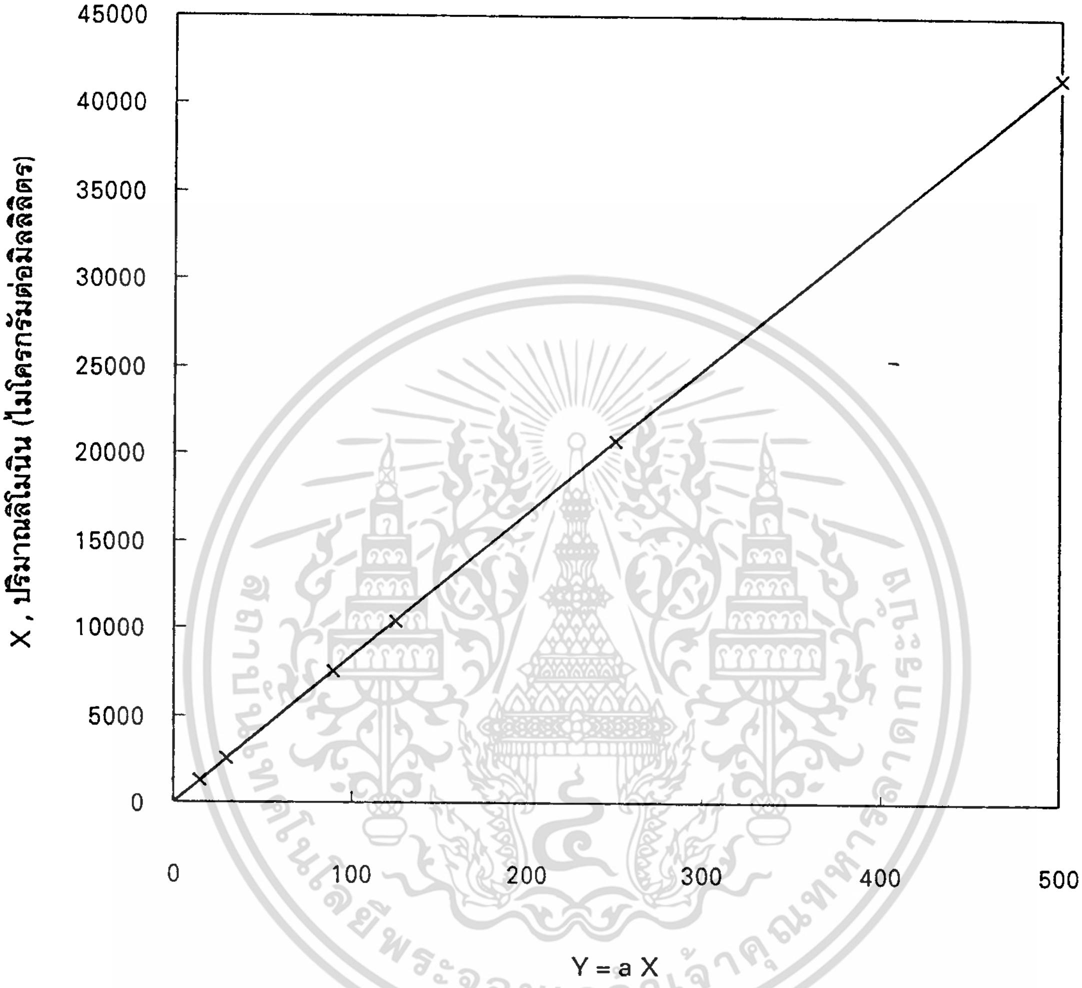
$$= [\, 6\,(28728285) - (1010)\,(88153) \,] / [\, 6\,(337350) - (1010)^2 \,]$$

$$= 83$$

กำหนดให้กราฟผ่านจุดกำเนิด ดังนั้น $b = 0$ จะได้ความสัมพันธ์ $Y = 83\,X$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 35



แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณลิโมนินด้วยเครื่องเอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล (nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm. ที่อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็นไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตร และใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ความยาวคลื่นที่ 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 25

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC

กลูโคส (X) (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ (Y)	Y = a X
0.5	37961	36107
1	75665	72215
2	148919	144430
5	363669	361076

จากความสัมพันธ์ Y = a X + b

$$a = [\, n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)\,] / [\,(n \sum X^2) - (\sum X)^2\,]$$

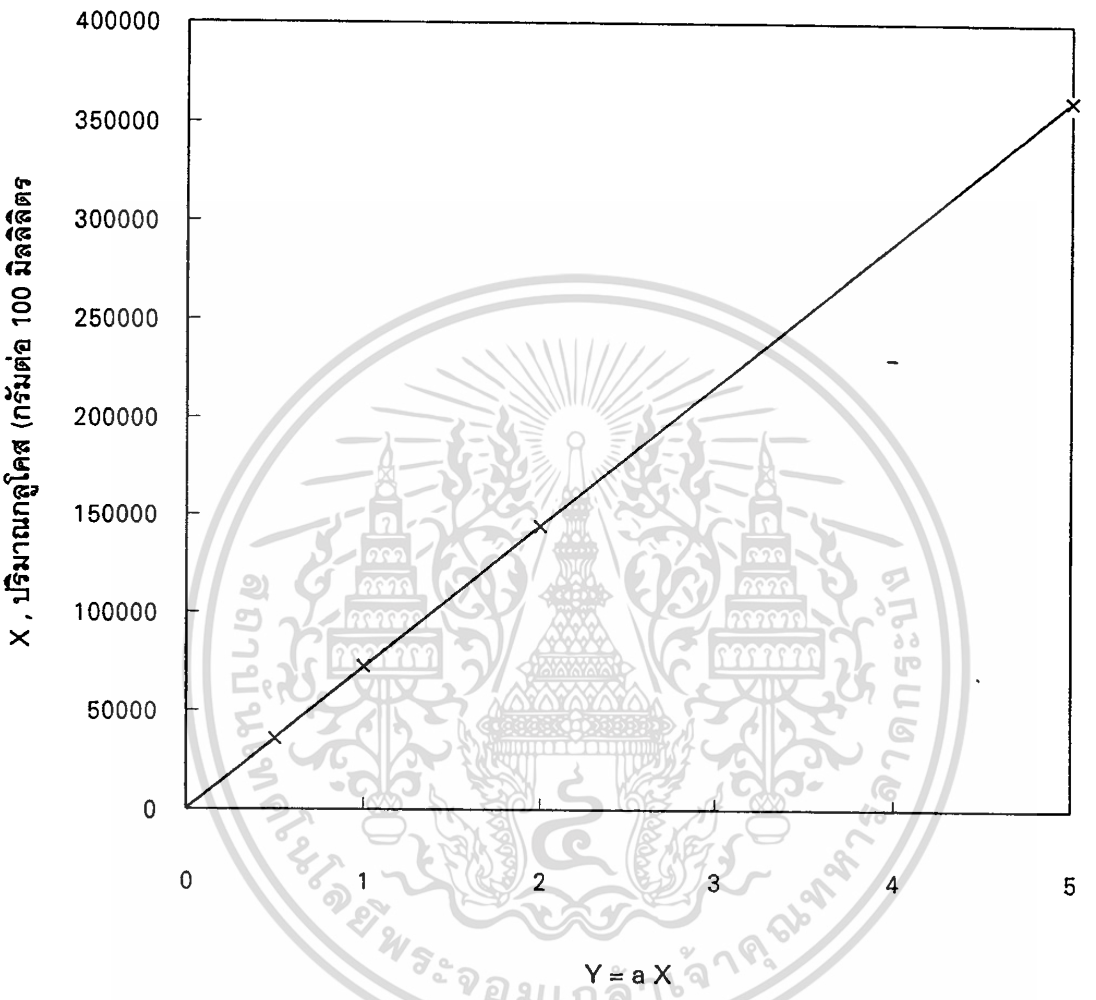
$$= [\,4\,(2210828.5) - (8.5)\,(626214)\,] / [\,4\,(30.25) - (8.5)^2\,]$$

$$= 72215.28$$

กำหนดให้กราฟผ่านจุดกำเนิด ดังนั้น b = 0 จะได้ความสัมพันธ์ Y = 72215.28 X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 36



แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยวิธี เอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล (nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm. อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตร โดยใช้ยูวีดีเทคเตอร์ที่ความยาวคลื่นที่ 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 26

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟรุคโตสและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC

ปริมาณฟรุคโตส (X) (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ (Y)	Y = a X
0.5	29212	35617
1	66820	71235
2	134535	142470
5	350483	356176

จากความสัมพันธ์ Y = a X + b

$$a = [\, n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)\,] / [\,(n \sum X^2) - (\sum X)^2\,]$$

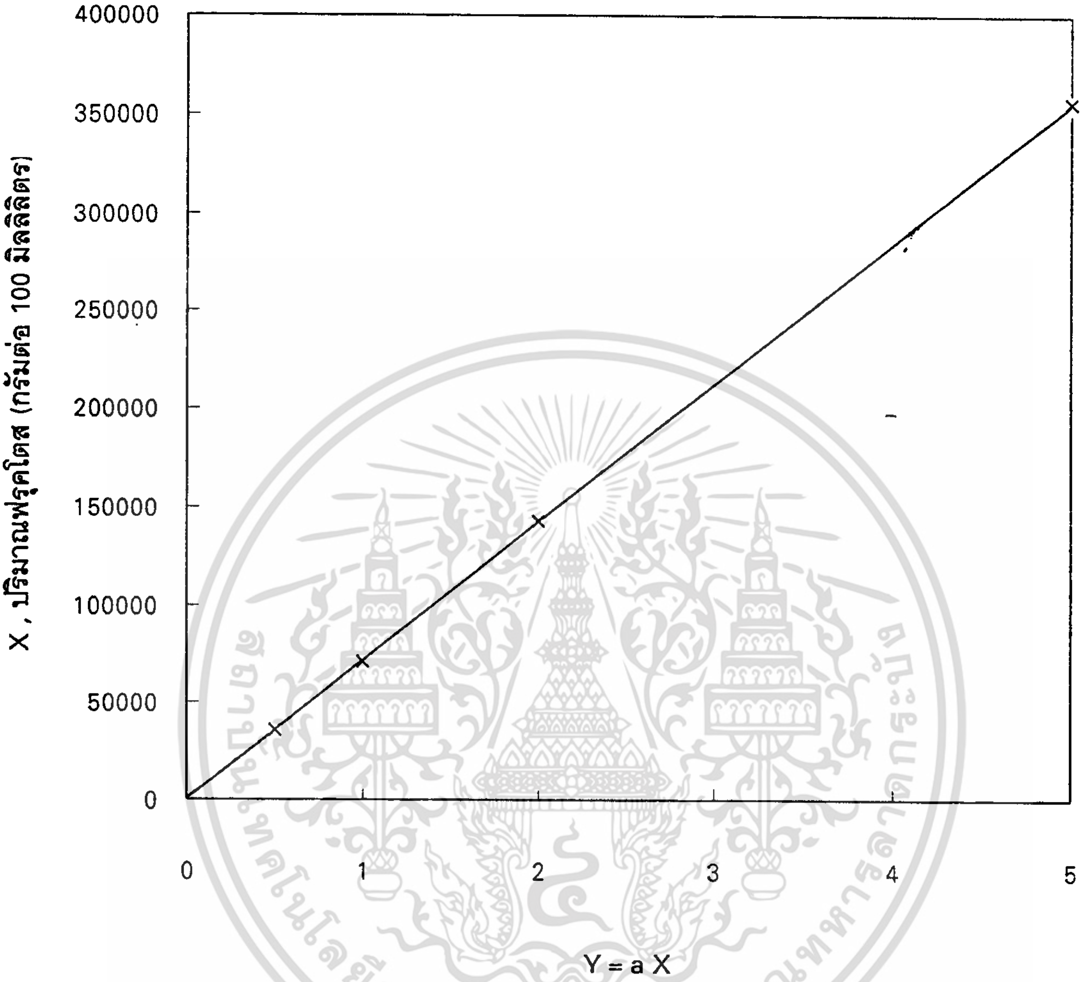
$$= [\, 4\,(2102911) - (8.5)\,(581050)\,] / [\, 4\,(30.25) - (8.5)^2\,]$$

$$= 71235.26$$

กำหนดให้กราฟผ่านจุดกำเนิด ดังนั้น b = 0 จะได้ความสัมพันธ์ Y = 71235.26 X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 37



แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟรุคโตสด้วยวิธี เอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล (nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm. อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตร โดยใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นที่ 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 27

แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณซูโครสและพื้นที่ใต้กราฟด้วยวิธี HPLC

ปริมาณซูโครส (X) (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ (Y)	Y= a X
1	92481	66916
2	149731	133832
4	285409	267665
10	697561	669162

จากความสัมพันธ์ $Y = aX + b$

$$a = [\, n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)\,] / [\,(n \sum X^2) - (\sum X)^2\,]$$

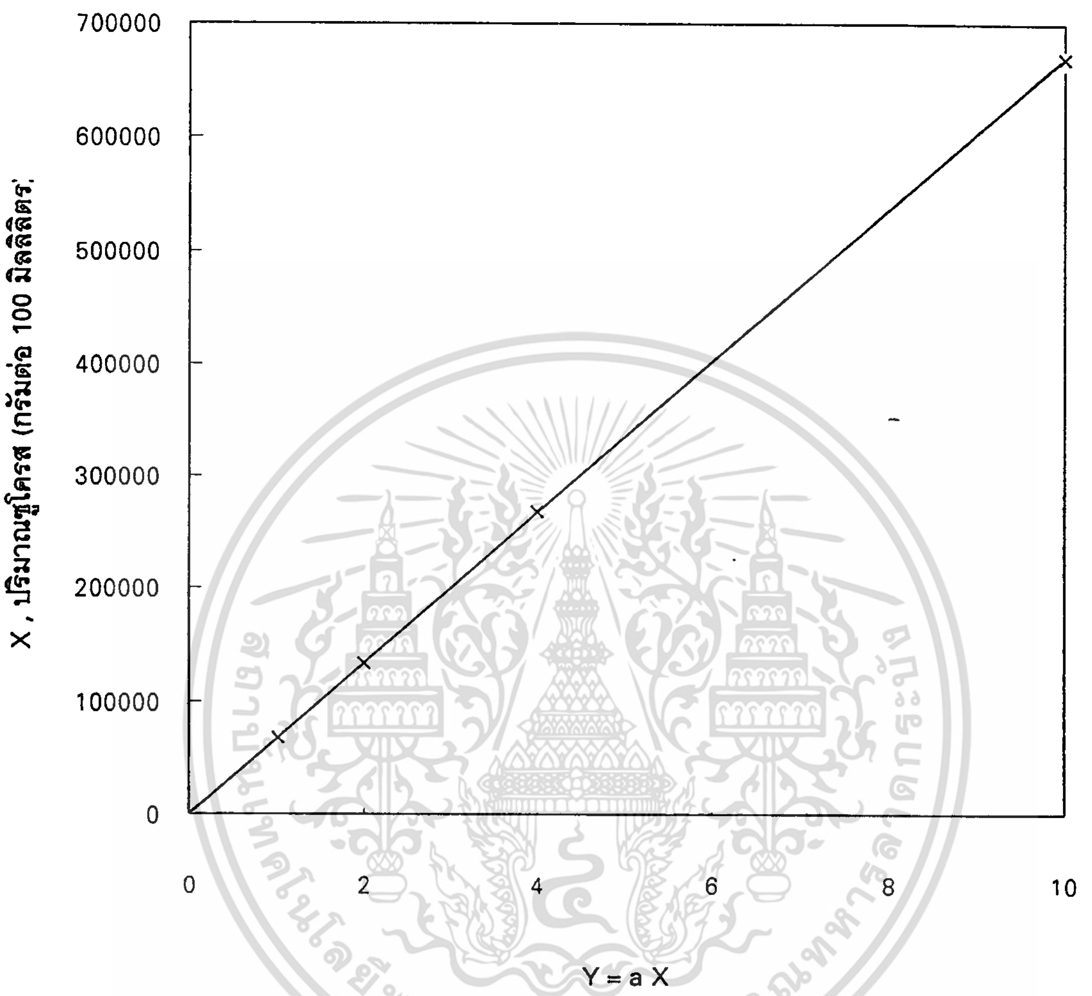
$$= [\,4\,(8469189) - (17)\,(1225182)\,] / [\,4\,(121) - (17)^2\,]$$

$$= 66916.21$$

กำหนดให้กราฟผ่านจุดกำเนิด ดังนั้น $b = 0$ จะได้ความสัมพันธ์ $Y = 66916.21\,X$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

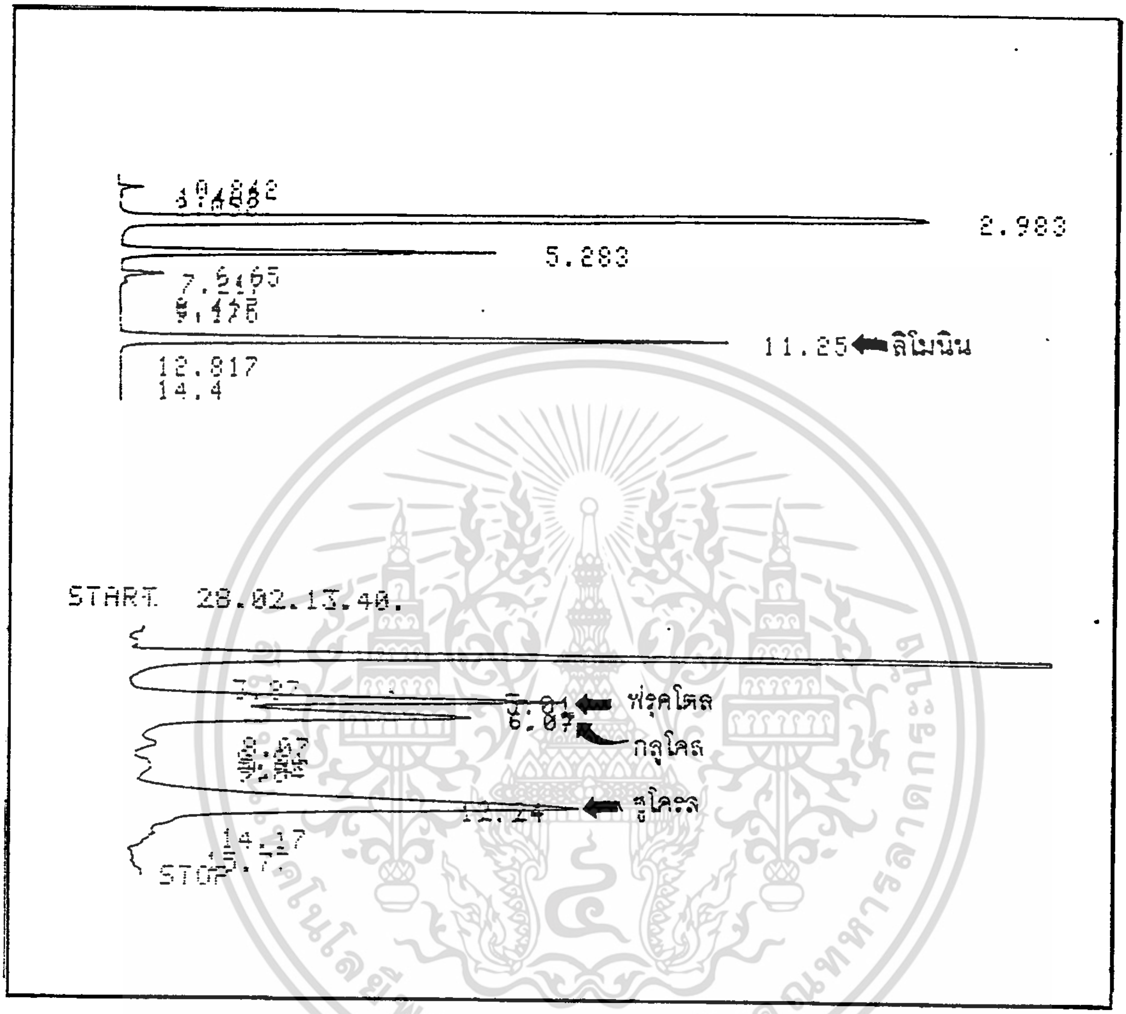
ภาพที่ 38



แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณซูโครสด้วยวิธี เอชพีแอลซี โดยใช้คอลัมน์ไนไทร์ล (nitrile or CN type techsphere 5 CN) ขนาด 4.5 x 250 mm. อุณหภูมิห้อง อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) เป็น ไอโซโพรพานอล : เฮปเทน : เมทานอล เท่ากับ 12 : 11 : 2 โดยปริมาตร โดยใช้ยูวีดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่นที่ 207 นาโนเมตร และฉีดสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 39



แสดงโครมาโตแกรมของลิโมนิน กลูโคส ฟรุคโตส และซู โครส จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอชพีแอลซี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายธนากร สว่างชาติ เกิดที่กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2534 โครงงานพิเศษระดับปริญญาตรีเรื่อง กลูโคสเซนเซอร์สำหรับตรวจวัดปริมาณกลูโคส โดยมีอาจารย์อรไท สุขเจริญ เป็นที่อาจารย์ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้