บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์

เซลล์ของ Corynebacterium fascians ที่ได้จากการเลี้ยงในข้อ 3.3 นี้มีสีส้ม ลักษณะเป็นท่อน (rod shape) Gram positive ไม่สร้างสปอร์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) ปริมาณเซลล์หรือ yield ที่ได้ประมาณ 7 กรัมต่ออาหารเหลว 1.2 ลิตร

รูปที่ 12 เซลล์จุลินทรีย์ Corynebacterium fascians (NRRL-B-15096)

4.2 การศึกษาภาวะการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในการลดปริมาณลิโมนิน

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (ทุกการทดลองทำ 2 ซ้ำ)

4.2.1 ระดับ pH

จากการทดลองข้อ 3.5.1 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งวัดในค่าของร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลง (รูปที่ 14) พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในช่วง 5.0-6.0 โดยที่เซลล์มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ใน pH ช่วงนี้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้ pH ช่วงนี้ในการทดลอง

4.2.2 ระดับอุณหภูมิ

เมื่อทำการทดลองผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเซลล์จุลินทรีย์ตามข้อ 3.5.2 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 15 พบว่าอุณหภูมิที่เซลล์มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุดอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมินี้ปริมาณลิโมนินที่ลดลงแตกต่างกับที่อุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

4.2.3 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์

ตามการทดลองข้อ 3.5.3 วัดแอคติวิตีของเซลล์ที่ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.5.1 และ 3.5.2 โดยแปรระดับของเซลล์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 และตารางที่ 3 ในภาคผนวก ข พบว่าปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาว 15 มิลลิลิตร คือ 0.40 กรัม

4.2.4 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา

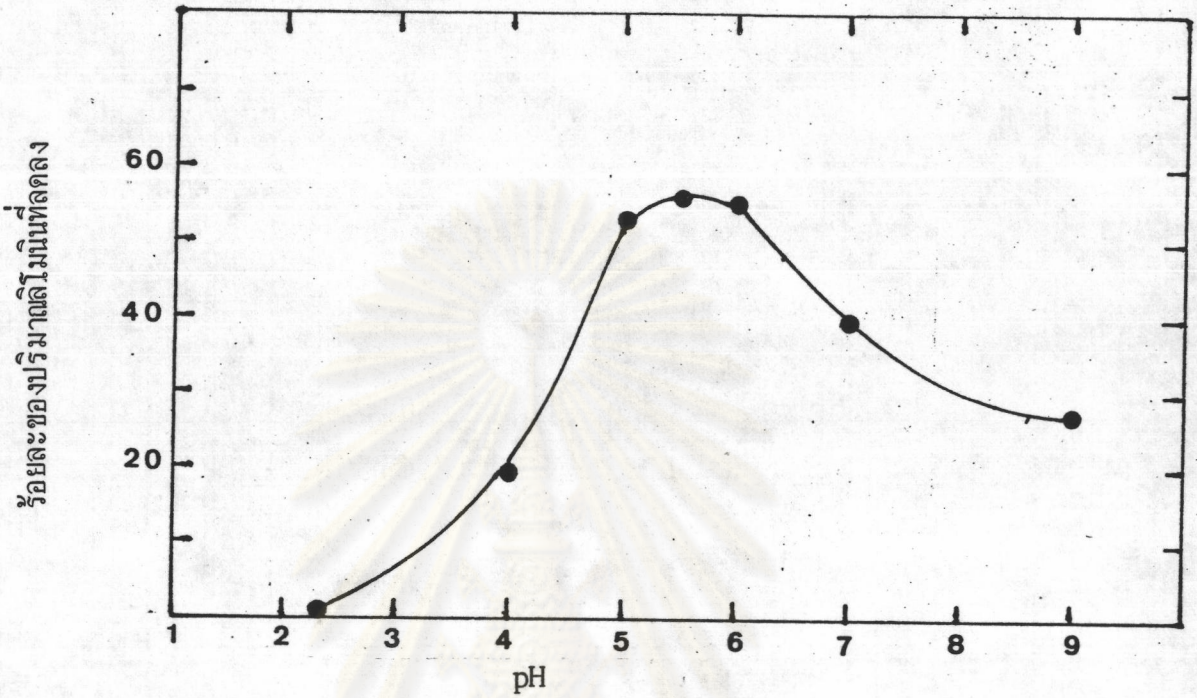
จากการทดลองข้อ 3.5.4 แสดงผลดังกราฟรูปที่ 17 และตารางที่ 4 ในภาคผนวก ข พบว่า ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมของเซลล์จุลินทรีย์คือ 2.0 ชั่วโมง ที่ระยะเวลานี้ปริมาณลิโมนินที่ลดลงมีค่าไม่แตกต่างกับที่ระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง แต่แตกต่างจากที่ระยะเวลาอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

4.2.5 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บ

จากการวัดแอคติวิตีของเซลล์จุลินทรีย์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามข้อ 3.5.5 คำนวณออกมาในรูปของเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ ดังตารางที่ 5 ในภาคผนวก ข และกราฟรูปที่ 18 พบว่า เมื่อระยะเวลาในการเก็บเซลล์จุลินทรีย์ดำเนินไปได้ 80 วัน ที่ภาวะอุณหภูมิห้อง เซลล์มีค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ลดลงร้อยละ 81.43 แต่ที่ภาวะอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส มีค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ลดลงร้อยละ 27.22

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

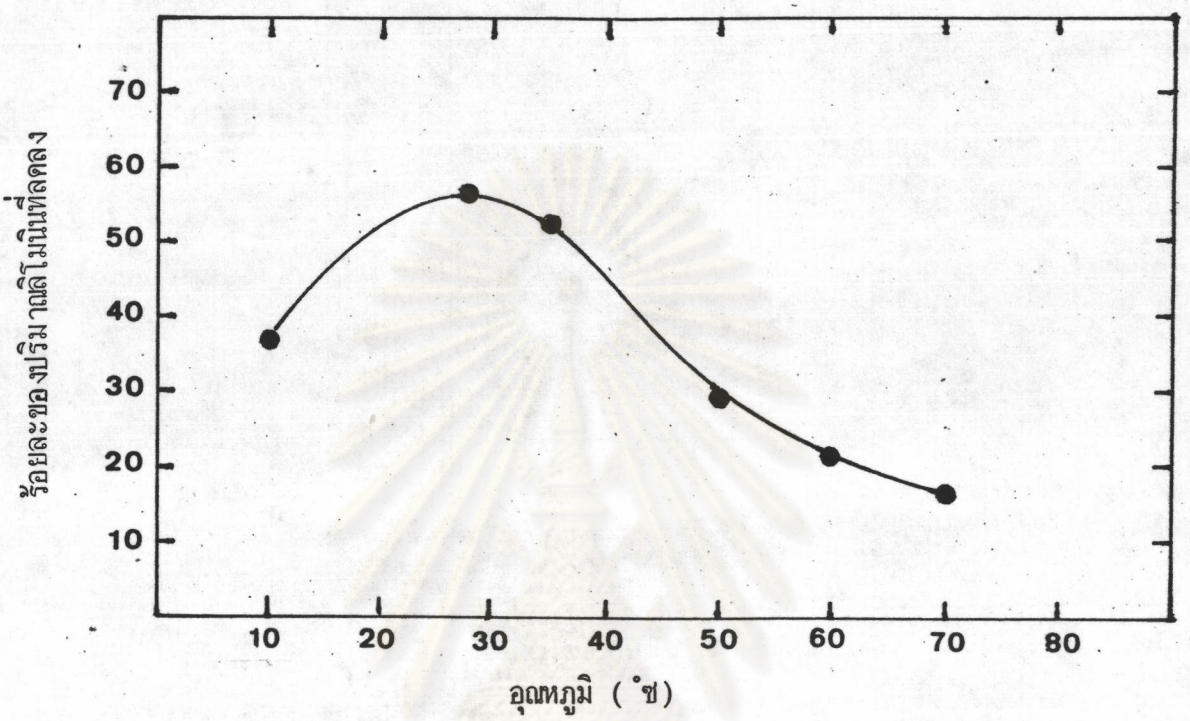
pH profile



รูปที่ 14 ผลของ pH ต่อการลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวสดโดยเซลล์จุลินทรีย์ C. fascians ที่ปริมาณ 20 กรัม ต่อน้ำมะนาว 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 1.5 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

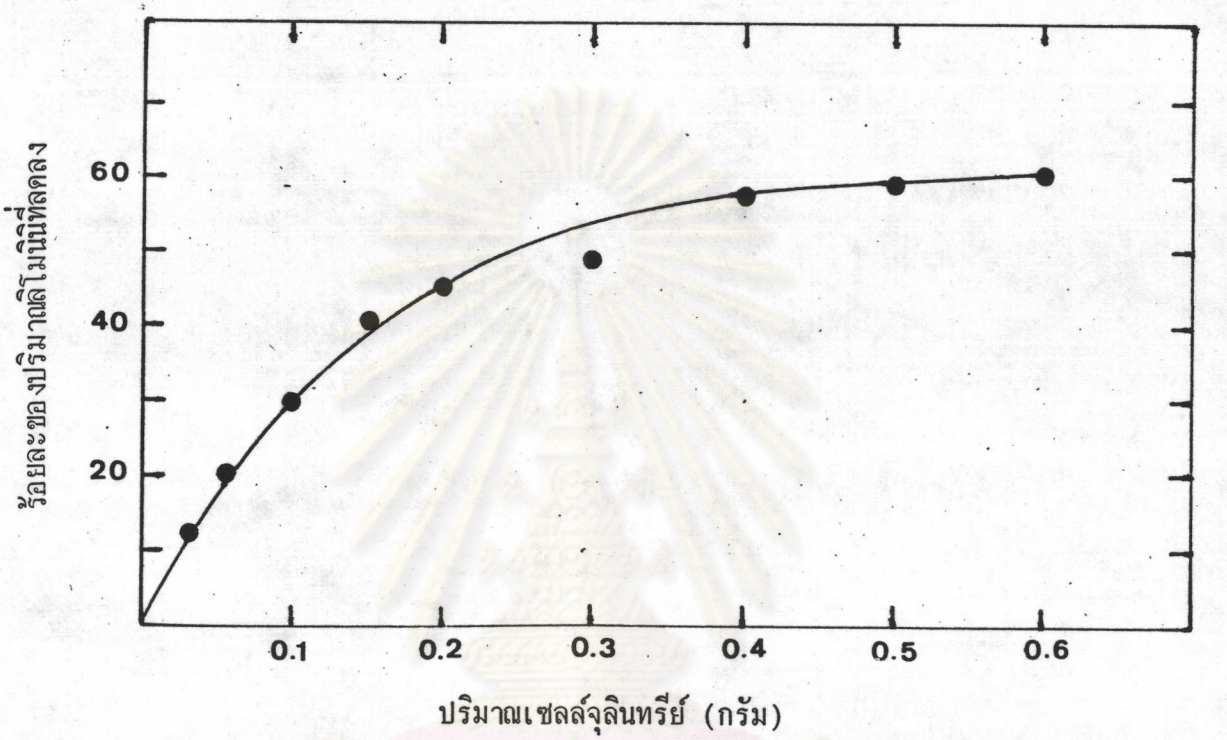
Temperature profile



รูปที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อการลดปริมาณลิโนนินในน้ำมะนาวสดโดยเซลล์จุลินทรีย์ C. fascians ปริมาณ 20 กรัม ต่อน้ำมะนาว 1 ลิตร ที่ pH 5.0-6.0 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 1.5 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

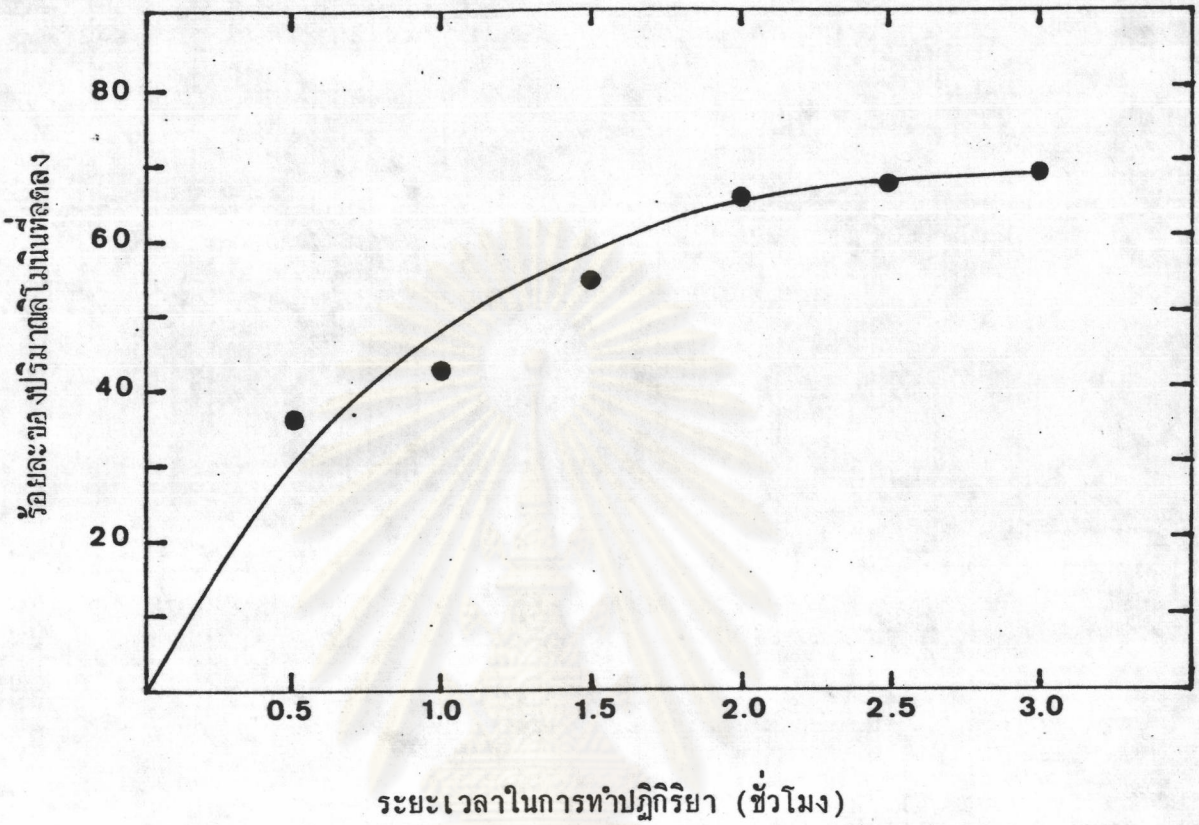
ศึกษาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 16 ผลของปริมาณเซลล์ต่อการลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวสดโดยเซลล์จุลินทรีย์ C. fascians ที่ pH 5.0-6.0 อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 1.5 ชั่วโมง

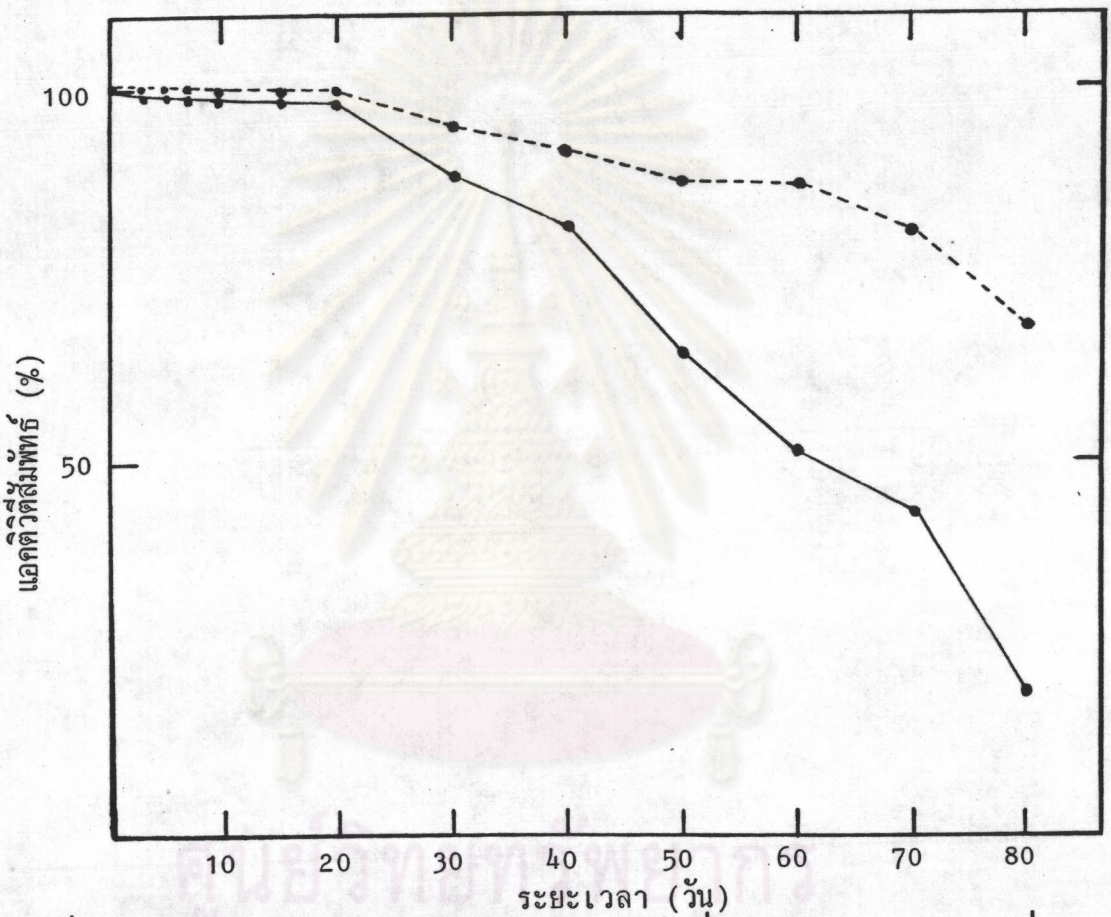
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 17 ผลของระยะเวลาต่อการลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวสดโดยเซลล์จุลินทรีย์ C. fascians ที่ pH 5.0-6.0 อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บของเซลล์อิสระที่อุณหภูมิห้อง (——) และที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส (----)

4.2.6 หาค่าครึ่งชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์

วิธีดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.5.6 เป็นการอ่านค่าครึ่งชีวิตในระยะเวลาการเก็บของเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ที่แอคติวิตีสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 50 ในกราฟรูปที่ 18 ตามผลการทดลองในข้อ 4.2.5 พบว่า ระยะเวลาในการเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิห้องนั้นค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ที่ระยะเวลาเก็บครบ 60 วัน ส่วนที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาเก็บ 80 วัน นั้นค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ยังลดลงไม่ถึงร้อยละ 50 ดังนั้นค่าครึ่งชีวิตของเซลล์อิสระที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส มีค่าเป็น 60 วัน และมากกว่า 80 วัน ตามลำดับ

4.3 การเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้วิธีทางสถิติ และเปรียบเทียบแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปโดยวิธี Duncan's new multiple range test

4.3.1 หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน

จากการทดลองข้อ 3.6.1 โดยเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปในภาวะที่ใช้เซลล์ 0.5 กรัม และความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนเป็นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก แล้วหาอัตราส่วนของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนที่เหมาะสม โดยพิจารณาในรูปของแอคติวิตี พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์และแคปปา-คาร์ราจีแนนคือ 1 : 7 ดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งจะใช้อัตราส่วนนี้ในการทดลองขั้นต่อไปที่ศึกษาถึงภาวะการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เหมาะสม

ตารางที่ 11 ผลของปริมาณแคปปา-คาร์ราจีแนนต่อแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูป

อัตราส่วนระหว่าง ปริมาณเซลล์ : แคปปา-คาร์ราจีแนน	ร้อยละ ของปริมาณลิโมนินที่ลดลง
1 : 9	18.83[a]
1 : 7	18.67[a]
1 : 5	17.01[b]

หมายเหตุ : a, b ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

4.3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป

4.3.2.1 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนและโปแตสเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

ตามการทดลองข้อ 3.6.2.1 ซึ่งเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปแบบแฟกตอเรียล 5×4 โดยแปรความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนเท่ากับร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์เท่ากับ 0.3, 0.5, 1.0 และ 2.0 โมลาร์ ปริมาณเซลล์เท่ากับ 0.5 กรัม นำค่าแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เตรียมได้มาวิเคราะห์วาเรียนซ์แบบสุ่มตลอด ดังตารางที่ 5 ภาคผนวก ข พบว่าความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนมีผลต่อแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูป อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และมีผลต่อความแข็งของเม็ดเจลด้วย ส่วนความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 แต่มีผลต่อความแข็งของเม็ดเจลที่ได้ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1.0 โมลาร์ ที่ความเข้มข้นนี้จะได้จุลินทรีย์ตรึงรูปที่มีความแข็งสูงกว่าที่ 0.3 และ 0.5 โมลาร์ แต่ไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ดังตารางที่ 12 และพิจารณาสมบัติด้านความแข็งของเม็ดเจลด้วย พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปมี 2 สภาวะ คือ ที่ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนร้อยละ 1.5 และ 2.0 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์คือ 1.0 โมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในรูปของร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลงในการหาความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน และโปแตสเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน (A) (%)	ความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ (B) (โมลาร์)			
	0.3	0.5	1.0	2.0
0.5	19.635[a]	19.607[a]	19.551[a]	19.081[a]
1.0	19.355[a]	19.635[a]	19.776[a]	19.074[a]
1.5	17.391[b]	17.279[b]	17.559[a]	16.774[b]
2.0	17.279[b]	17.111[b]	17.307[b]	16.830[b]
2.5	13.015[c]	12.987[c]	13.015[c]	12.931[c]

หมายเหตุ : a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

4.3.2.2 กำหนดความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 4.3.2.1 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป คือความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนร้อยละ 1.5 และ 2.0 และความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ดังนั้นการทดลองในข้อ 3.6.2.2 จึงศึกษาผลของกลูตารัลดีไฮด์ต่อแอคติวิตีและความแข็งของเม็ดเจลจากตารางที่ 12 และ 13 พบว่า กลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 และไม่มีผลต่อความแข็งของเม็ดเจลด้วย ดังนั้นในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปเพื่อศึกษาขั้นต่อไปจึงไม่ใช้กลูตารัลดีไฮด์ในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป

เนื่องจากผลการทดลองในข้อ 4.3.2.1 พบว่าความแข็งของเม็ดเจลจะแปรตามความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน และที่ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์จีแนนร้อยละ 1.5 และ 2.0 ได้จุลินทรีย์ตรึงรูปมีแอคติวิตีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนร้อยละ 0.5 และ 1.0 ได้จุลินทรีย์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุด แต่เม็ดเจลค่อนข้างเละ ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน

ร้อยละ 2.0 และความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์เป็น 1 โมลาร์ ในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปเพื่อศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 13 ร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลงในน้ำมะนาวที่ทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน (A) (ร้อยละ)	ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ (โมลาร์)			
	0	0.1	0.2	0.3
1.5	17.801[a]	17.764[a]	17.708[a]	17.595[a]
2.0	17.709[a]	17.680[a]	17.652[a]	17.568[a]

หมายเหตุ : a ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

4.3.2.3 กำหนดปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม

จากการทดลองในข้อ 3.6.2.3 ด้วยวิธีการวัดแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เตรียมโดยมีความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนร้อยละ 2.0 ความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ และไม่ต้องใช้กลูตารัลดีไฮด์ โดยมีปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เป็นตัวแปร พบว่าปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปในภาวะดังกล่าวคือ 0.75 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลในการหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการตรึงรูป (กรัม)	ร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลง
0.30	15.62[a]
0.50	17.95[b]
0.75	27.14[c]
1.00	27.27[c]
1.50	25.70[d]

หมายเหตุ : a, b, c, d ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

รูปที่ 19 จุลินทรีย์ตรึงรูปด้วยแคปปา-คาร์ราจีแนน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3 ศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

จากการทดลองในข้อ 3.6.3 ศึกษาโอกาสที่เซลล์จะหลุดจากตัวพยุง พบว่าจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เตรียมในภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมีประสิทธิภาพการเกาะเกี่ยวระหว่างเซลล์กับตัวพยุงสูง คือ ปริมาณลิโมนินที่ลดลงที่ระยะเวลาในการหยุดปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน โดยการเติมคลอโรฟอร์มหลังจากกรองจุลินทรีย์ตรึงรูปออก ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 คือโอกาสที่เซลล์หลุดจากตัวพยุงมีค่าต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ปริมาณลิโมนินที่ลดลงในน้ำมะนาวที่หยุดปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

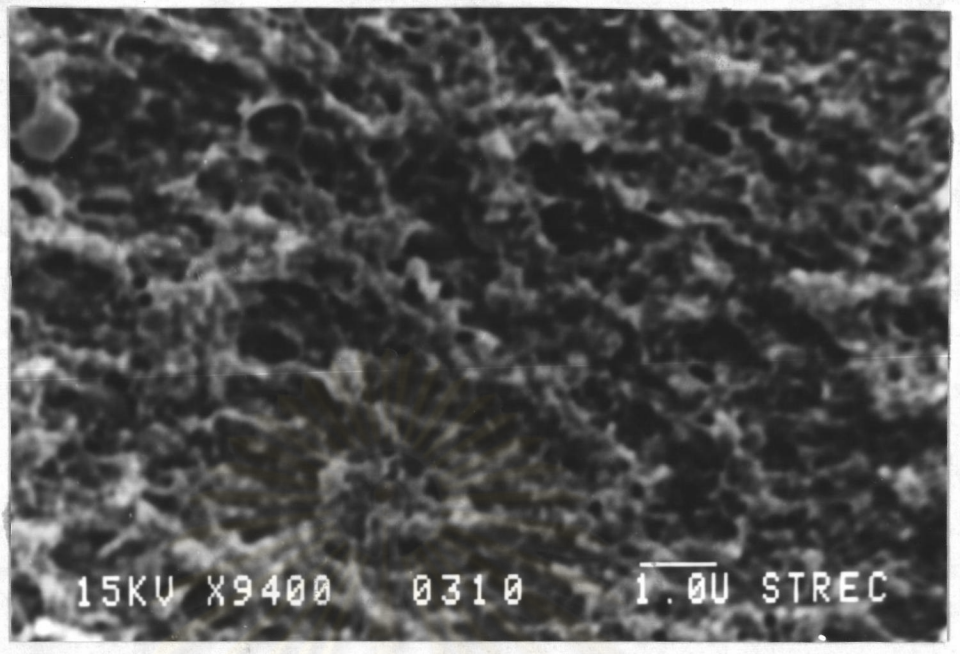
เวลาที่หยุดปฏิกิริยา (นาที)	ร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลง
0	26.67[a]
15	26.73[a]
30	26.85[a]
60	27.19[a]
90	27.23[a]

หมายเหตุ : a ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

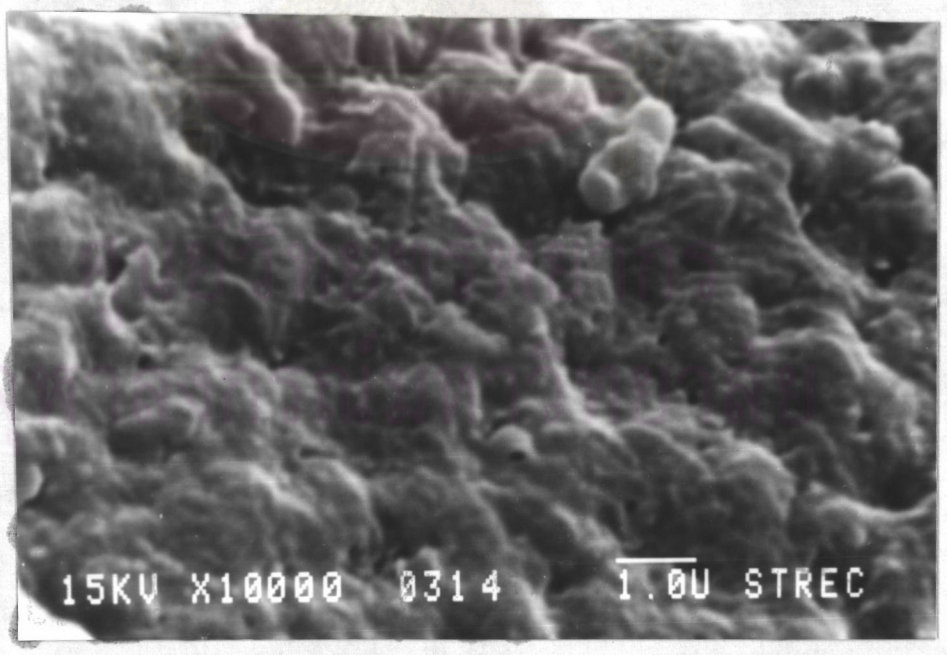
4.3.4 ศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ใช้เป็นตัวพยุง

จากการทดลองในข้อ 4.3.4 ซึ่งเป็นการศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์ตรึงตรึงรูปที่เตรียมด้วยความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนร้อยละ 2.0 ความเข้มข้นของโปแตส-เซียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ และปริมาณเซลล์ 0.75 กรัม อัตราส่วนของปริมาณเซลล์และแคปปา-คาร์ราจีแนนเท่ากับ 1:7 เปรียบเทียบกับตัวพยุงที่ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์

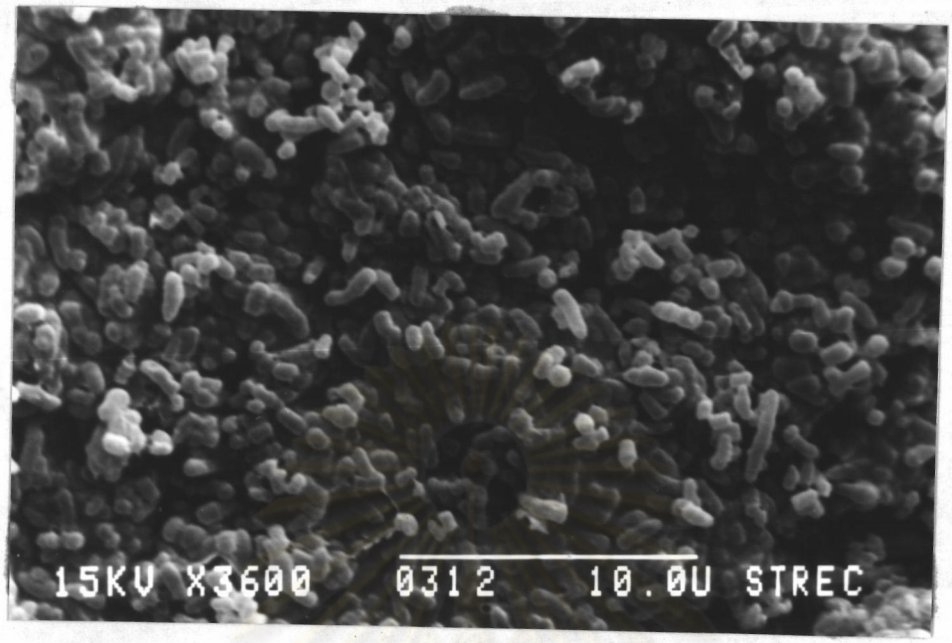
พิจารณาโครงสร้างจากภาพถ่ายด้วย SEM ของตัวพยุง ดังรูปที่ 20 และ 21 จะเห็นว่าพื้นผิวมีความพรุน ส่วนรูปที่ 22 และ 23 เป็นภาพของจุลินทรีย์ตรึงรูปจะเห็นว่าบนพื้นผิวมีเซลล์ลักษณะเป็นท่อนเกาะอยู่จำนวนมาก



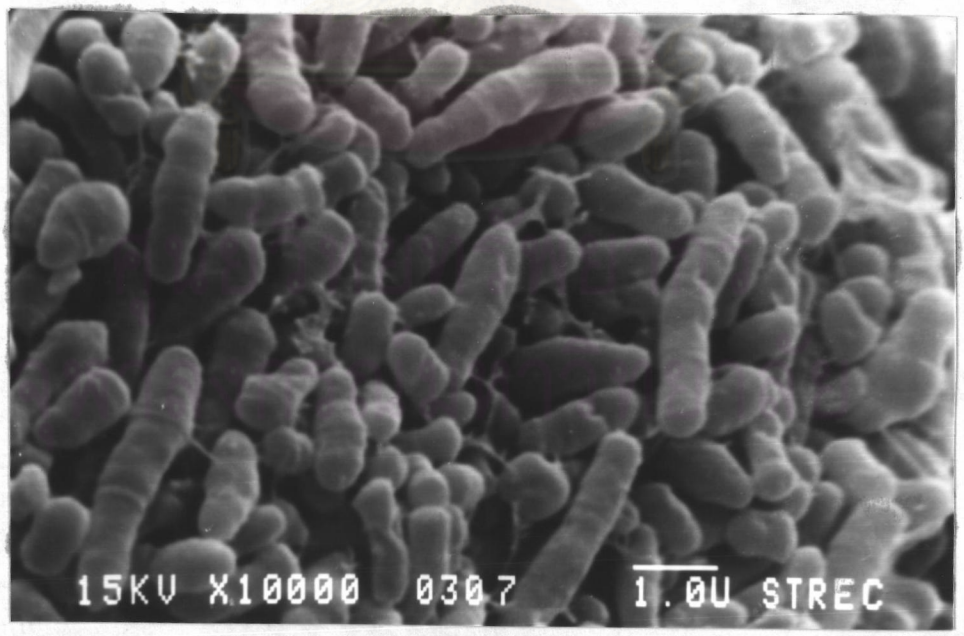
รูปที่ 20 พื้นผิวแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ (กำลังขยาย 9400 เท่า)



รูปที่ 21 พื้นผิวแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์ (กำลังขยาย 10,000 เท่า)



รูปที่ 22 พื้นผิวจุลินทรีย์ตรึงรูปในแคปปา-คาร์ราจีแนน (กำลังขยาย 3600 เท่า)



รูปที่ 23 พื้นผิวจุลินทรีย์ตรึงรูปในแคปปา-คาร์ราจีแนน (กำลังขยาย 10,000 เท่า)

4.3.5 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ตรึงรูป

4.3.5.1 เปรียบเทียบ pH profile ของแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ

จากการศึกษาผลของระดับ pH ต่อแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปในข้อ 3.6.5.1 เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ กับ pH ดังแสดงในรูปที่ 24 จะเห็นว่าจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระมี pH profile ลักษณะใกล้เคียงกัน แต่ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ตรึงรูปอยู่ในช่วง 4.0-5.0 ส่วนของเซลล์อิสระอยู่ในช่วง 5.0-6.0

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลการศึกษาผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเซลล์อิสระและจุลินทรีย์ตรึงรูปด้วย Duncan's new multiple range test แสดงในตารางที่ 1 และ 8 ตามลำดับ ในภาคผนวก ข

4.3.5.2 เปรียบเทียบ temperature profile ของแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ

จากการทดลองข้อ 3.6.5.2 แสดงผลในรูปที่ 25 พบว่าจุลินทรีย์ตรึงรูปมี temperature profile กว้างกว่าเซลล์อิสระ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ตรึงรูปอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ส่วนของเซลล์อิสระอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ของเซลล์อิสระและจุลินทรีย์ตรึงรูป แสดงในตารางที่ 2 และ 9 ตามลำดับ ในภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.5.3 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ตรึงรูป

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาวในข้อ 3.6.5.3 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 26 และตารางที่ 10 ในภาคผนวก ข พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 2.5 ชั่วโมง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนินไม่แตกต่างกับที่ระยะเวลา 3.0 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

4.3.5.4 วัดค่า K_m และ V_{max} ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ

ดังการทดลองในข้อ 3.6.5.4 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบ Lineweaver Burk ของจุลินทรีย์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ ได้ผลดังรูปที่ 27 จากการคำนวณจากกราฟที่จุดตัดแกน x ซึ่งมีค่าเท่ากับ $-\frac{1}{K_m}$ พบว่า K_m ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระมีค่าเท่ากับ 3.6×10^2 และ 6.7×10^2 มิลลิโมล ตามลำดับ และจากการคำนวณจากกราฟที่จุดตัดแกน y ซึ่งมีค่าเท่ากับ $\frac{1}{V_{max}}$ พบว่า V_{max} ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระมีค่าเท่ากับ 1.11 และ 4.00 มิลลิโมล/นาที ตามลำดับ

4.3.5.5 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บของจุลินทรีย์ตรึงรูป

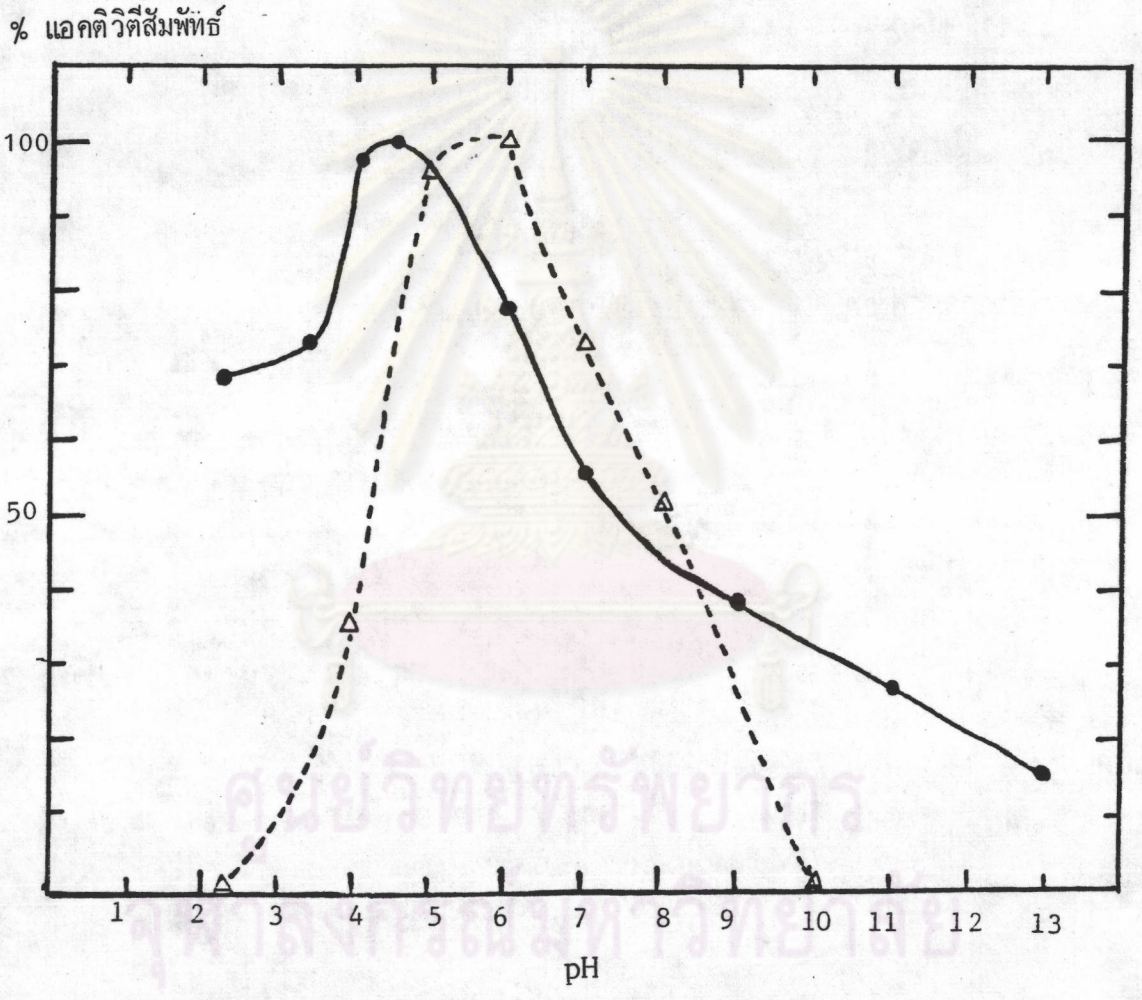
จากการทดลองในข้อ 3.6.5.5 ศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บ ได้แสดงผลในตารางที่ 11 ในภาคผนวก ข และแสดงด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์กับระยะเวลาในการเก็บที่สภาวะที่กำหนด ดังรูปที่ 28 พบว่า เมื่อระยะเวลาในการเก็บจุลินทรีย์ตรึงรูปดำเนินไปได้ 80 วัน แล้วที่ภาวะอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีลดลงร้อยละ 1.05 และที่ภาวะอุณหภูมิห้องมีค่าลดลงร้อยละ 45.17

4.3.5.6 หาค่าครึ่งชีวิตของจุลินทรีย์ตรึงรูป

งานวิจัยในข้อ 3.6.5.6 เป็นการอ่านค่าครึ่งชีวิตในระยะเวลาการเก็บจุลินทรีย์ตรึงรูปที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ที่แอคติวิตีสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 50 ในกราฟรูปที่ 28 ตามผลการทดลองในข้อ 4.3.5.5 พบว่าที่ระยะเวลาในการเก็บจุลินทรีย์ตรึงรูปที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส 80 วัน นั้นค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ยังลดลงไม่ถึงร้อยละ 50 ดังนั้นค่าครึ่งชีวิตของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่า 80 วัน

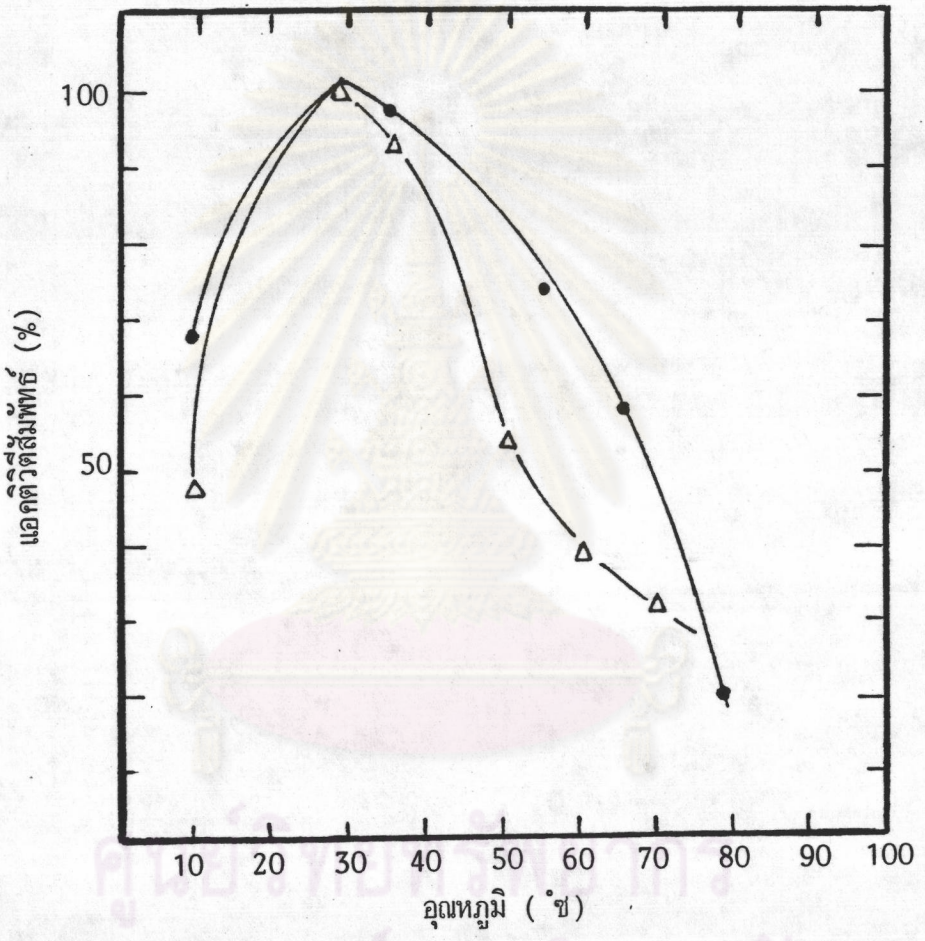
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

pH profile



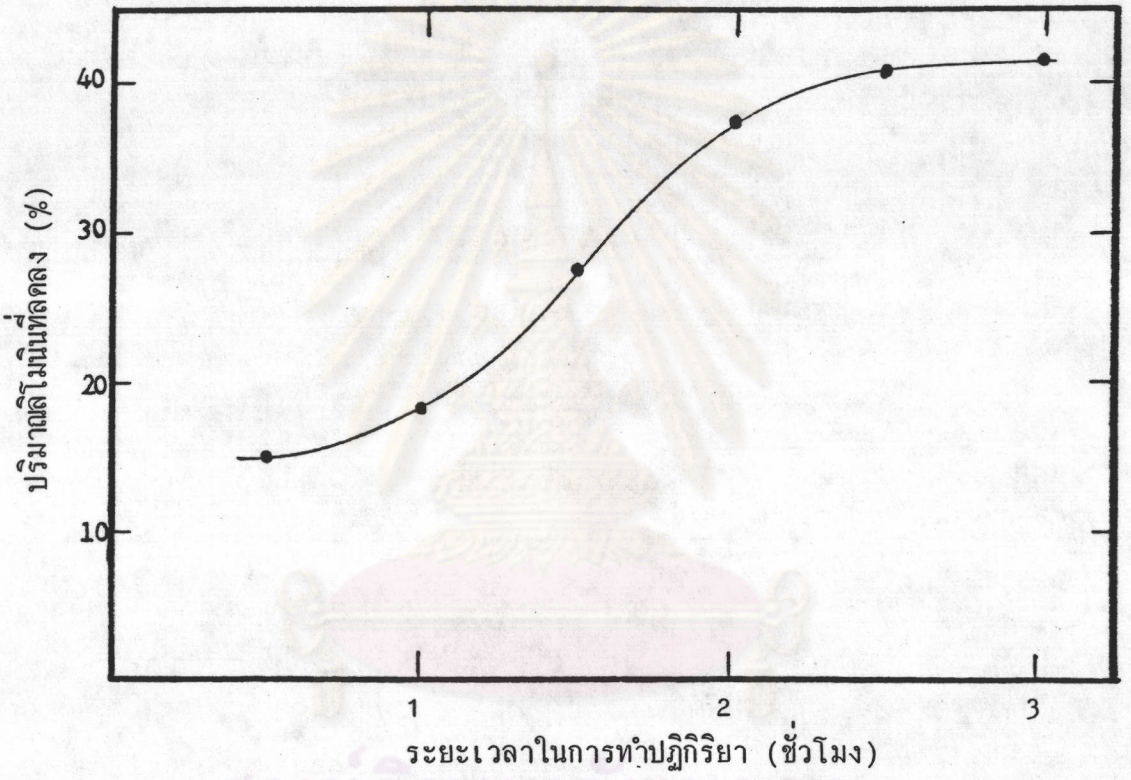
รูปที่ 24 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของจุลินทรีย์ตรึงรูป (●---●) และเซลล์อิสระ (Δ---Δ) กับ pH

Temperature profile



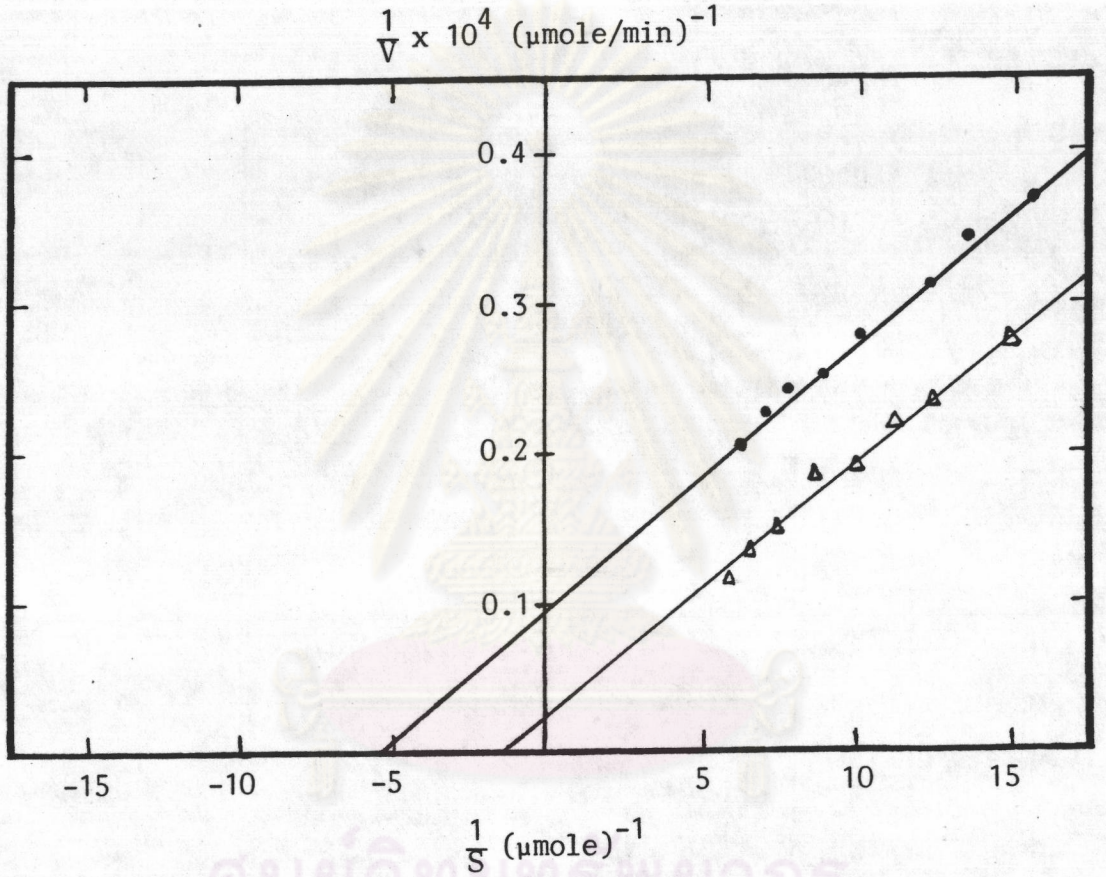
รูปที่ 25 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของจุลินทรีย์ตรึงรูป (●—●) และเซลล์อิสระ (Δ—Δ) กับอุณหภูมิ

ศึกษาระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ตรึงรูป



รูปที่ 26 ผลของระยะเวลาต่อการลดลงของปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาว ที่ pH 4.0 โดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

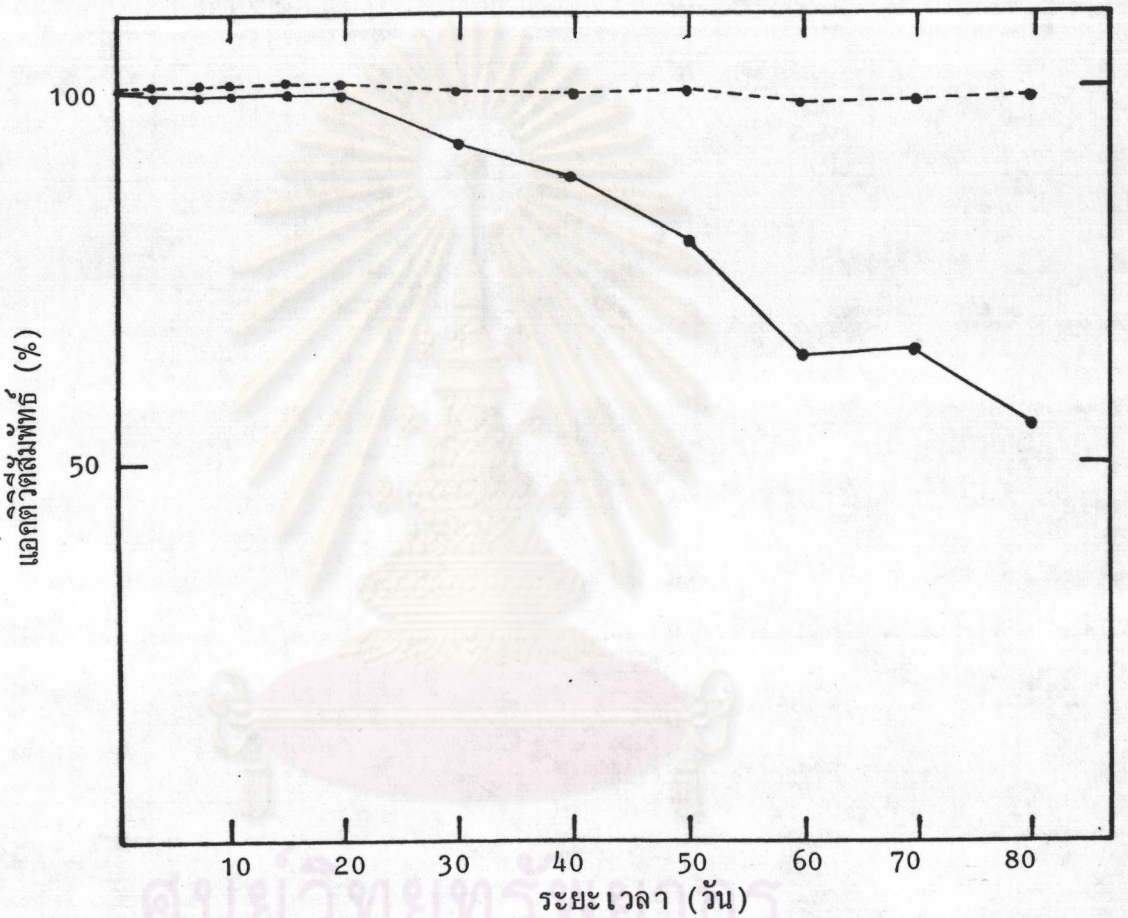
ศึกษา K_m และ V_{max}



รูปที่ 27 เปรียบเทียบ Lineweaver Burk plot ของเซลล์อิสระและจุลินทรีย์ตรึงรูป

เซลล์อิสระ (Δ) : K_m 6.7×10^2 mM, V_{max} 4.00 mM. min^{-1}

จุลินทรีย์ตรึงรูป (●) : K_m 3.6×10^2 mM, V_{max} 1.11 mM. min^{-1}



รูปที่ 28 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่อุณหภูมิห้อง (——) และที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส (---)

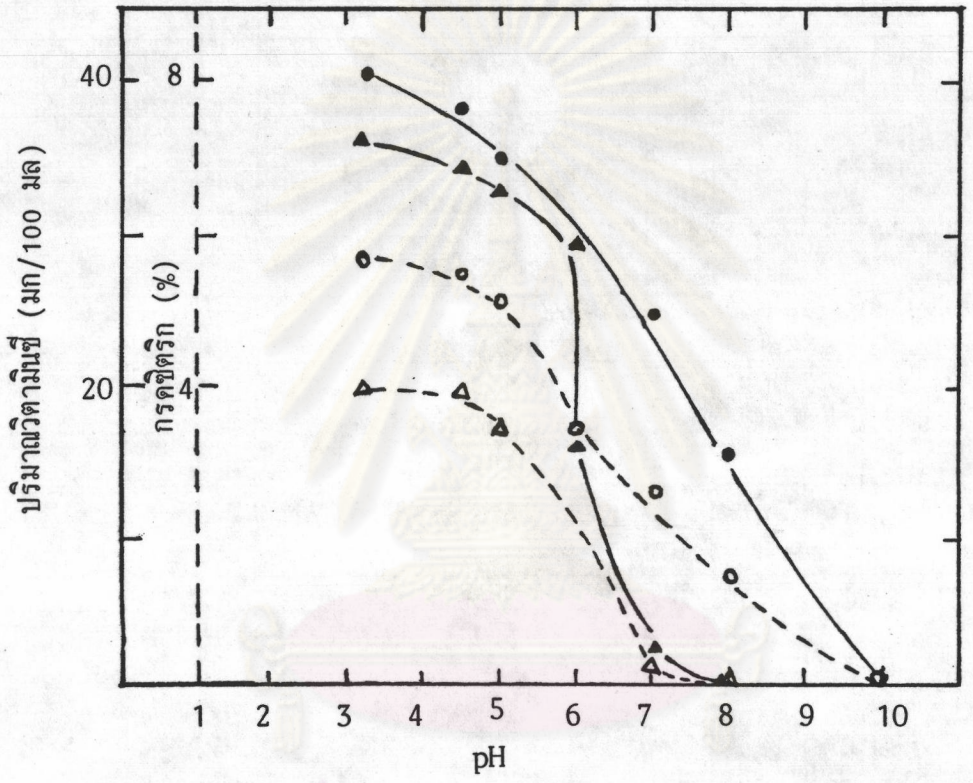
4.4 การลดความขมของน้ำมะนาวถนอมแบบพาสเจอร์ไรส์โดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

4.4.1 ศึกษาผลของระดับ pH ต่อองค์ประกอบของน้ำมะนาว

จากการทดลองในข้อ 3.7.1 ศึกษาผลของ pH ต่อองค์ประกอบของน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 29 และตารางที่ 12 ในภาคผนวก พบว่าเมื่อ pH สูงขึ้น ปริมาณวิตามินซีและกรดซิตริกมีค่าลดลงตามลำดับ และน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขมจะมีปริมาณสารทั้ง 2 ตัว ต่ำกว่าน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลกระทบของ pH ต่อองค์ประกอบของน้ำมะนาวถนอม



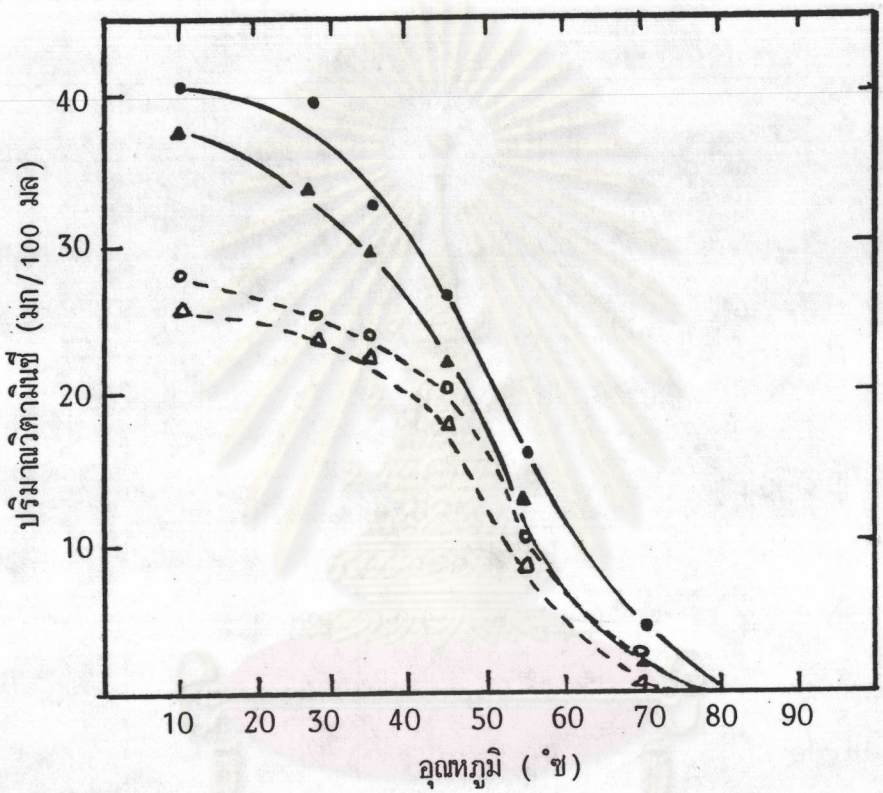
รูปที่ 29 ผลของ pH ต่อปริมาณวิตามินซี (o,●) และกรดซิตริก (Δ,▲) ของน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขม (----) และน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขม (———) โดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

4.4.2 ศึกษาผลของระดับอุณหภูมิต่อองค์ประกอบของน้ำมะนาว

ผลการทดลองในข้อ 3.9.2 แสดงในรูปที่ 30 , 31 และตารางที่ 13 และ 14 ในภาคผนวก ข พบว่าที่ pH ทั้ง 2 คือ pH ตามธรรมชาติของน้ำมะนาว (pH = 2.2) และที่ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของจุลินทรีย์ตรึงรูป (pH = 4) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณวิตามินซีจะมีค่าลดลง ส่วนปริมาณกรดซิตริกนี้จะไม่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ ทั้งน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขม

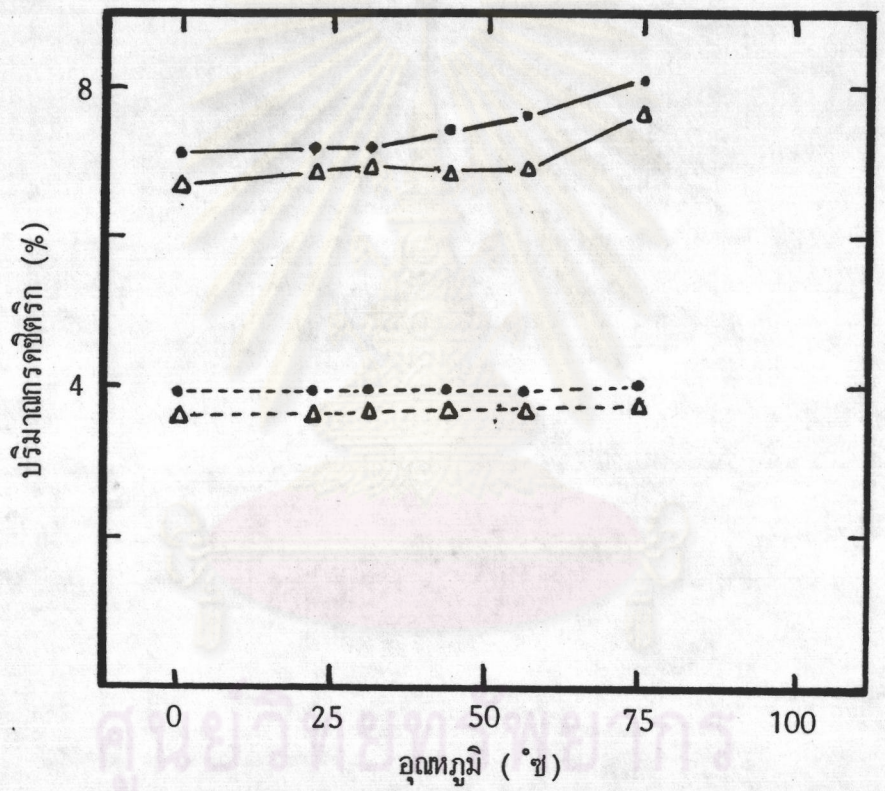
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณวิตามินซี



รูปที่ 30 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณวิตามินซีของน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขม (-----) และน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขม (———) โดยจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ pH 2.2 (o,●) และ pH 4.0 (Δ,▲)

ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณกรดซิตริก



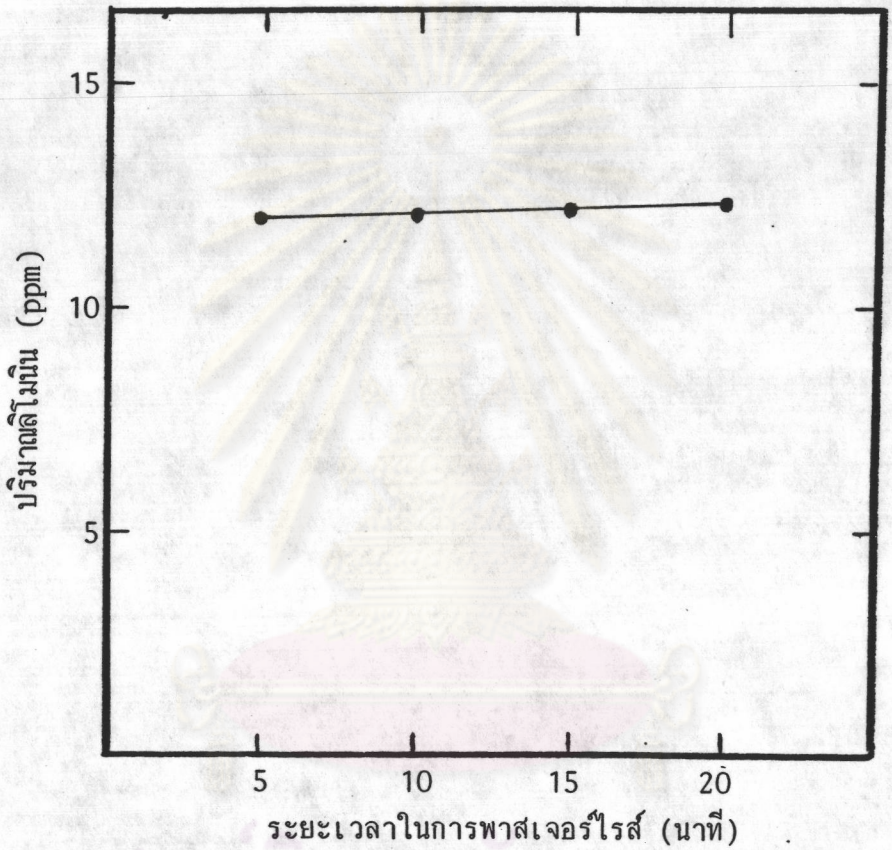
รูปที่ 31 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณกรดซิตริกของน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความชม (----) และน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความชม (——) โดยจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ pH 2.2 (●) และ pH 4.0 (Δ)

4.4.3 ศึกษาผลของระยะเวลาในการพาสเจอร์ไรส์ต่อปริมาณลิโมนิน

จากการวิเคราะห์ปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ในข้อ 3.9.3 ได้แสดงผลในกราฟรูปที่ 32 จะเห็นได้ว่า ปริมาณลิโมนินที่เพิ่มขึ้นในน้ำมะนาวที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศึกษาระยะเวลาในการพาสเจอร์ไรส์ต่อปริมาณลิโมนิน



รูปที่ 32 ผลของระยะเวลาในการพาสเจอร์ไรส์ต่อปริมาณลิโมนิน ในน้ำมะนาวที่อุณหภูมิ 80 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.4 กระบวนการเตรียมและการลดความขมในน้ำมะนาวถนอม

จากการเตรียมน้ำมะนาวเพื่อทดลองลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป และยืดอายุการเก็บในข้อ 3.9.4 ผลการดทลองแสดงในตารางที่ 16 พบว่า น้ำมะนาวสดมีปริมาณลิโมนิน 5.29 ppm หลังจากผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที ปริมาณลิโมนินเพิ่มเป็น 12.21 ppm และหลังจากผ่านกระบวนการลดความขม และพาสเจอร์ไรส์ครั้งที่ 2 ปริมาณลิโมนินจะลดลงเหลือ 7.11 ppm ส่วนน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขมและผ่านการพาสเจอร์ไรส์ครั้งที่ 2 ที่ปริมาณลิโมนินเท่ากับ 12.29 ppm ปริมาณวิตามินซีในน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขม และผ่านการพาสเจอร์ไรส์ครั้งที่ 2 มีค่าเท่ากับ 15.35 และ 25.86 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดซิตริกมีค่าเท่ากับ 5.21 และ 7.95 เปอร์เซ็นต์ และ ^{o}Brix มีค่าเท่ากับ 13.5 และ 17.4 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 สมบัติของน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

รายการ	ปริมาณลิโมนิน (ppm)	ปริมาณวิตามินซี (มก/100 มล)	ปริมาณกรดซิตริก (%)	pH	^{o}Brix
– น้ำมะนาวสด	5.29	37.89	7.91	2.14	7.6
– น้ำมะนาวผ่านการพาสเจอร์-ไรส์ที่ 80 °ซ, 5 นาที ครั้งที่ 1	12.21	28.95	7.85	2.13	7.8
– น้ำมะนาวที่ปรับ pH = 4	12.19	26.42	7.59	4.00	17.4
– น้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขม	7.07	16.55	4.95	4.00	13.4
– น้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขมแล้วพาสเจอร์-ไรส์ ครั้งที่ 2	7.11	15.35	5.11	4.02	13.5
– น้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขมและพาสเจอร์ไรส์ ครั้งที่ 2	12.29	25.86	7.85	4.01	17.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.5 ศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำมะนาวถนอม

จากการทดสอบสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำมะนาวถนอมที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมเพื่อเปรียบเทียบกันในข้อ 3.9.5 ได้แสดงผลของคะแนนเฉลี่ยของสมบัติด้านกลิ่น รส และการยอมรับรวม ในตารางที่ 17 จะเห็นได้ว่าคะแนนเฉลี่ยของสมบัติด้านกลิ่นในน้ำมะนาวทั้ง 2 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สมบัติด้านรสของน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมมีค่าคะแนนเฉลี่ยหลังจากเก็บเป็นระยะเวลา 2 เดือน เท่ากับ 2.5 และ 1.3 ตามลำดับ และสมบัติการยอมรับรวมมีค่าคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 3.2 และ 1.5 และหลังจากเก็บครบ 3.5 เดือน คะแนนเฉลี่ยของสมบัติด้านรสของน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านการลดความขมมีค่าเท่ากับ 2.3 และ 1.2 ส่วนสมบัติด้านการยอมรับรวมมีค่าเท่ากับ 3.1 และ 1.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 17 คะแนนเฉลี่ยผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำมะนาวถนอมที่ระยะเวลาเก็บ 2 และ 3.5 เดือน ตามลำดับ

ระยะเวลาที่เก็บ (เดือน)	ตัวอย่าง	คะแนนเฉลี่ย		
		กลิ่น	รส	การยอมรับรวม
2	A	2.2^{a}	2.5^{b}	3.2^{d}
	B	2.0^{a}	1.3^{c}	1.5^{e}
3.5	A	2.1^{a}	2.3^{b}	3.1^{d}
	B	2.2^{a}	1.2^{c}	1.3^{e}

A = น้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

B = น้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

หมายเหตุ : a, b, c, d, e ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรเหมือนกันจะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

4.4.6 เปรียบเทียบสมบัติต่าง ๆ ของน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เก็บไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

จากการทดลองในข้อ 3.9.4 โดยสุ่มตัวอย่างน้ำมะนาวมาวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ ทุก ๆ 10 วัน จนครบ 120 วัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 18 พบว่า ^{o}Brix, pH และปริมาณกรดซิตริกมีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย หรือไม่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่เก็บ ปริมาณวิตามินซีของน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมมีค่าลดลงร้อยละ 66.12 และ 41.65 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 34 ส่วนปริมาณลิโมนินแสดงดังกราฟรูปที่ 33 จะเห็นว่าเมื่อเก็บครบ 4 เดือน มีค่าเท่ากับ 7.43 และ 17.12 ppm ตามลำดับ และน้ำมะนาวที่ผ่านการลดความขมมีปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลน้อยกว่าน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

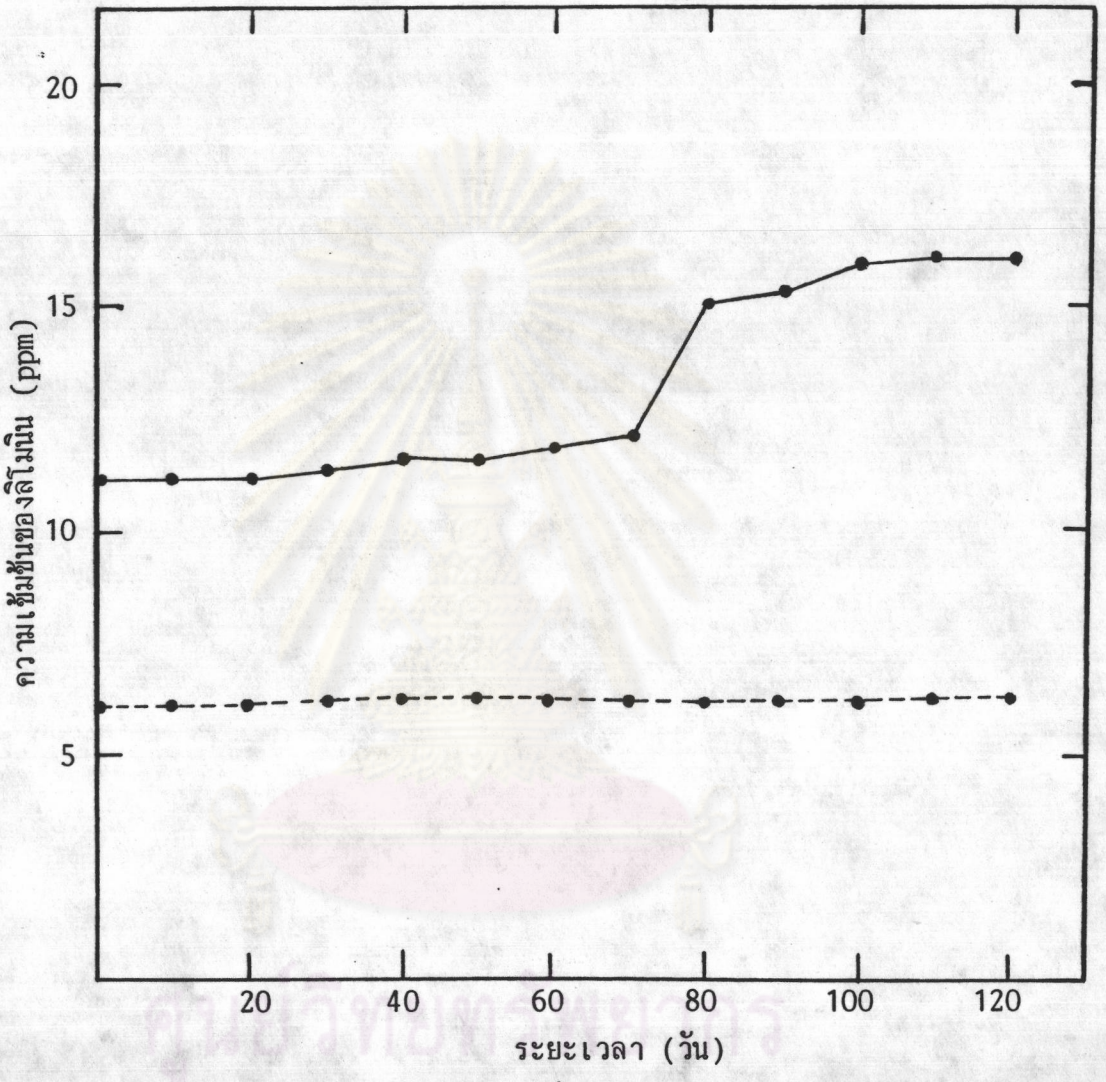
ตารางที่ 18 สมบัติต่าง ๆ ของน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมที่เก็บไว้ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ระยะเวลาที่เก็บ (วัน)	pH		°Brix		ปริมาณกรดซิตริก (%)		ปริมาณวิตามินซี (มก./100 มล.)		ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล**		ปริมาณลิโมนิน (ppm)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0	4.01	4.02	17.4	13.5	7.85	5.11	25.86	15.35	++	+	12.29	7.11
10	4.03	4.00	17.4	13.4	7.86	5.09	25.77	15.33	++	+	12.28	7.05
20	4.05	4.03	17.5	13.5	7.81	5.06	24.94	14.21	++	+	12.31	7.19
30	4.02	4.01	17.7	13.6	7.83	5.05	22.16	7.65	++	+	12.68	7.35
40	4.03	4.05	17.6	13.4	7.86	5.09	20.01	7.25	+++	++	13.01	7.38
50	4.06	4.03	17.5	13.7	7.87	5.11	16.95	5.45	+++	++	13.11	7.36
60	4.09	4.01	17.5	13.5	7.79	5.06	15.05	5.19	+++	++	13.49	7.40
70	4.02	4.04	17.4	13.6	7.85	5.05	15.04	5.20	+++	++	14.01	7.45
80	4.04	4.05	17.6	13.6	7.81	5.07	15.03	5.15	++++	+++	15.09	7.38
90	4.03	4.07	17.5	13.4	7.85	5.10	14.76	4.79	++++	+++	15.53	7.39
100	4.05	4.05	17.6	13.5	7.76	5.12	15.01	5.21	++++	+++	16.79	7.41
110	4.01	4.04	17.6	13.7	7.82	5.11	15.12	5.17	++++	+++	17.22	7.51
120	4.03	4.03	17.5	13.6	7.85	5.08	15.09	5.20	++++	+++	17.12	7.43

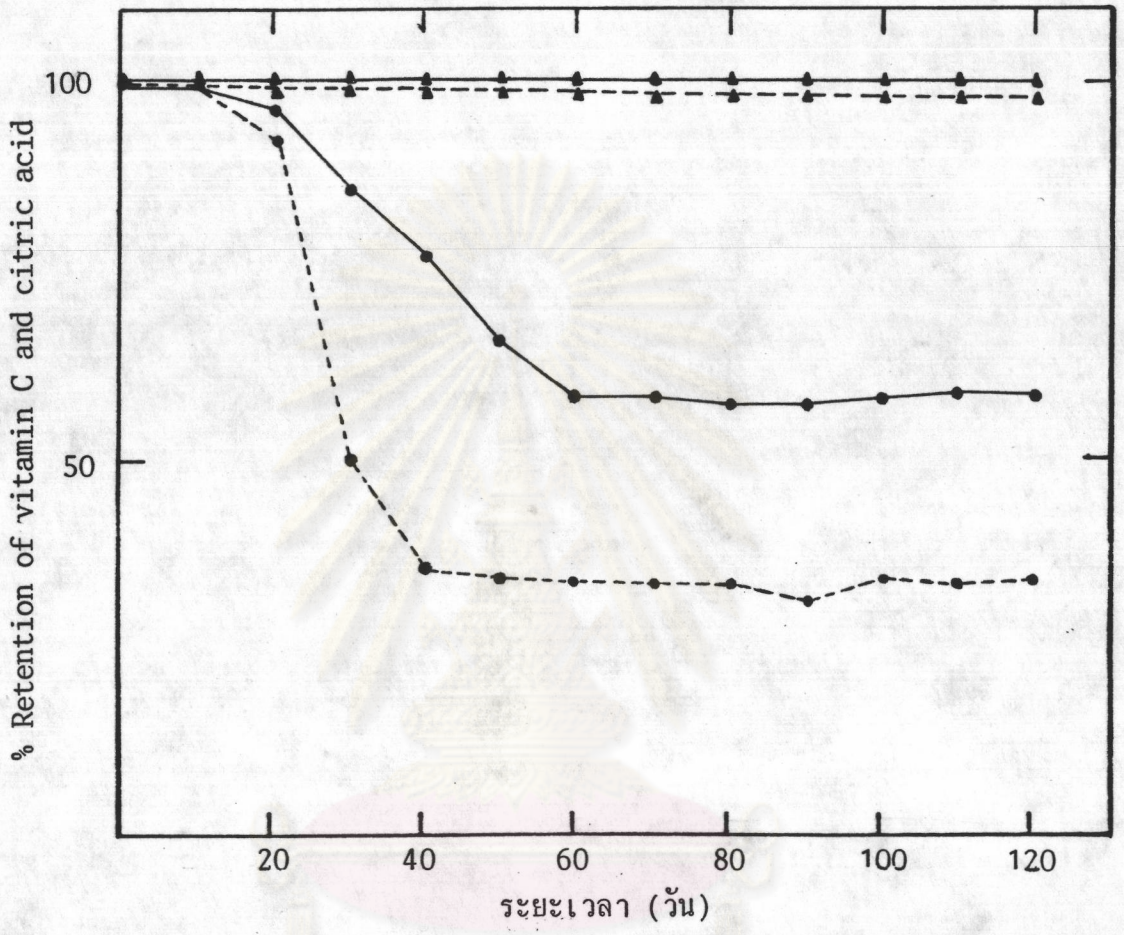
A = น้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

B = น้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล** : ใช้สัญญลักษณ์ + แทน โดยเปรียบเทียบกับน้ำมะนาวสด ให้น้ำมะนาวสด = 0



รูปที่ 33 ความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขม (----) และที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขม (——) โดยจุลินทรีย์ตรึงรูปเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ



รูปที่ 34 ปริมาณวิตามินซี (●) และกรดซิตริก (▲) สัมพัทธ์ของน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขม (---) และที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขม (——) โดยจุลินทรีย์ตรึงรูป เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

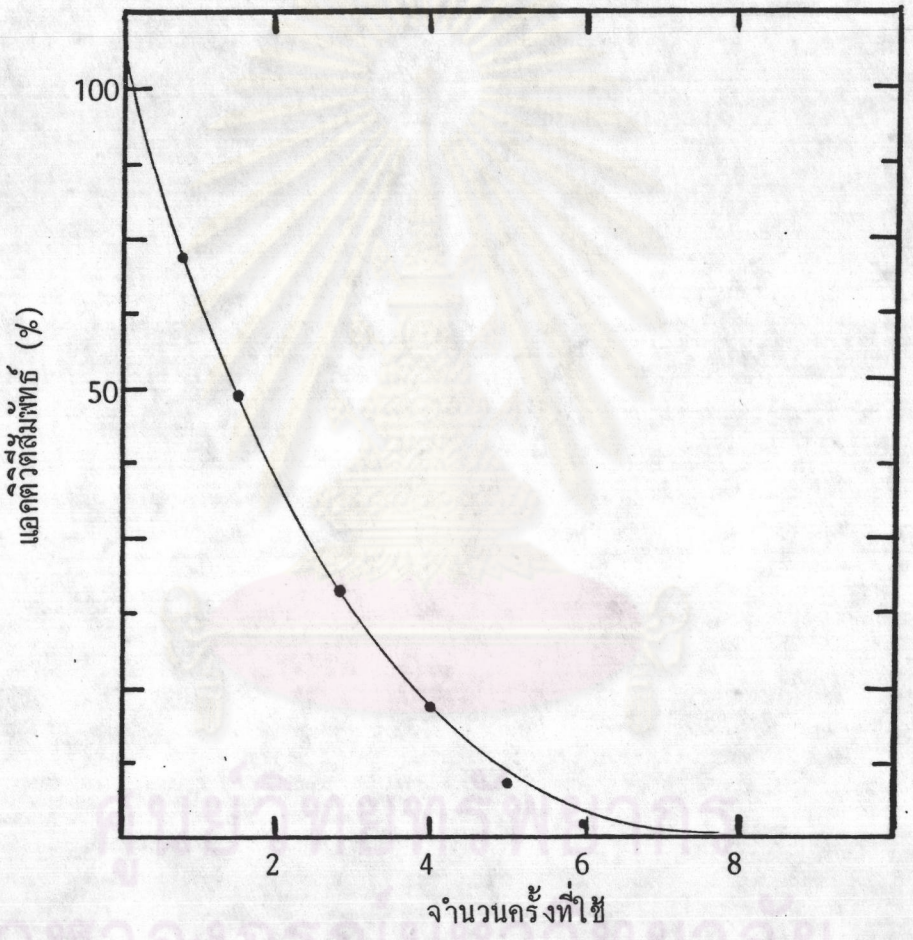
4.5 ศึกษาประสิทธิภาพการนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาใช้ใหม่

ผลการทดลองในข้อ 3.10 แสดงดังกราฟในรูปที่ 35 ซึ่งแสดงในค่าของเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ พบว่าหลังจากนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำครั้งที่ 1 แอคติวิตีลดลงเหลือร้อยละ 77.36 และมีค่าเป็นศูนย์หลังจากใช้ซ้ำครั้งที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศึกษาประสิทธิภาพนำเซลล์ตรึงรูปมาใช้ใหม่

- ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 2.5 ชั่วโมง



รูปที่ 35 ประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงรูปมาใช้ใหม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย