บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง คือ Corynebacterium fascians (NRRL-B-15096) สร้างเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนสภายในเซลล์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. A.J. Lyons แห่ง United States Department of Agriculture (USDA) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วย

- mineral salt medium
- 0.2% nutrient broth
- 0.4% carbon source (fructose)
- 48-hr. culture of C. fascians

องค์ประกอบของ mineral salt

KH_2PO_4	0.20	กรัม
K_2HPO_4	0.15	กรัม
$NaH_2PO_4.H_2O$	2.00	กรัม
$NaHPO_4$	1.50	กรัม
NH_4NO_3	0.60	กรัม
$NaNO_3$	3.80	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.30	กรัม
$Fe(SO_4)_3.6H_2O$	0.054	มิลลิกรัม
$(NH_4)P(Mo_3O_{10})_4$	0.024	มิลลิกรัม
$ZnSO_4.5H_2O$	0.050	มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.0025	มิลลิกรัม

$MnSO_4$	0.0055	มิลลิกรัม
HBo_3	0.057	มิลลิกรัม
H_2O	1000	มิลลิลิตร

3.1.2 สารลิโมนินบริสุทธิ์ ($C_{26}H_{30}O_8$) ใช้ทำกราฟมาตรฐาน มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 295 องศาเซลเซียส ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Gordon Robertson และ Dr. R.L. Johnson แห่ง CSIRO ประเทศออสเตรเลีย

3.1.3 มะนาวสด ใช้เป็นแหล่งของสับสเตรทในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์

3.1.4 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. คลอโรฟอร์ม (Chloroform)	BDH Chemical Ltd. Poole England
2. 4-ไดเมทธิลอะมิโน เบนซัลดีไฮด์ (4-(Dimethylamino) benzaldehyde)	Mallinckrodt Inc. U.S.A.
3. กรดอะซีติก (Acetic acid)	BDH Chemical Ltd. Poole England
4. 70% กรดเปอร์คลอริค (70% Perchloric acid)	BDH Chemical Ltd. Poole England
5. ฟรุคโตส (Fructose)	Merck Chemical Company
6. โปแตสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate)	BDH Chemical Ltd. Poole England
7. ไดโปแตสเซียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate)	BDH Chemical Ltd. Poole England
8. ไตรโซเดียมซิเตรท (Trisodium citrate)	Merck Chemical Company

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)	Fluka Chemical Company
10. กลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde)	Fluka Chemical Company
11. แคปปา-คาร์ราจีแนน (Kappa-carrageenan)	Kobenhavns Pektinfabrik Denmark
12. โปแตสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)	Merck Chemical Company
13. แอล-แอสคอบิค แอซิด (L-ascorbic acid	Hopkin & Williams
14. กรดออกซาลิค (Oxalic acid)	Merck Chemical Company
15. โปแตสเซียมไฮโดรเจนพาธาเลท (Potassium hydrogen phothalate)	BDH Chemical Ltd. Polule England
16. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient broth)	Merck Chemical Company

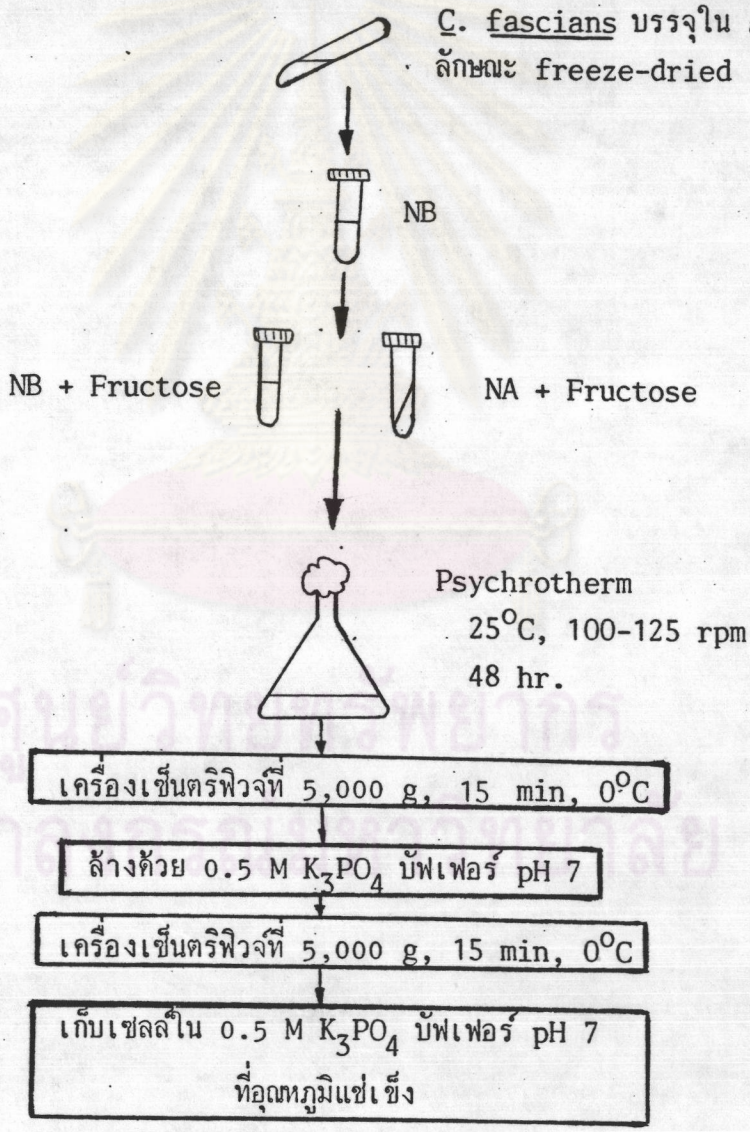
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 อุปกรณ์

ชนิดอุปกรณ์	แบบ	บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	Shimadzu UV-Visible UV-240	Shimadzu, Japan
2. เครื่องเขย่า	G10 Gyrotory Shaker	New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J., USA.
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	1. Psychrotherm	New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J., USA.
	2. Shaker bath Model 2563	Forma Scientific marietta ohio
4. เครื่องเซนตริฟิวจ์ (Refrigerated Centrifuge)	Varifuge K	Heraeus-Christ GMBH Osterode
5. เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Rotary Evaporator)	Type 51111	Heidolph, F.R. Germany
6. เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave model HA-3D	Hirayama Manufacturing Corperation, Japan
7. Vertex mixer	Super-Mixer	Lab-Line Instrument USA.
8. เครื่องปฏิกรณ์เซลล์ตรึงรูป-แบบถังกวน 2 ชั้น ขนาด 16×12×12 นิ้ว	-	-
9. Scanning Electron Microscope (SEM)	JEC-1100	JEOL
10. เครื่องเคลือบทอง	Ion Sputter Model	JEOL
11. เครื่องวัด pH	pH meter 220	Corning, U.S.A.

ชนิดอุปกรณ์	แบบ	บริษัทผู้ผลิต
12. เครื่องชั่งธรรมดา	Type 1518	Satorius Analytic
13. เครื่องชั่งละเอียด	Model A 2003	Satorius Analytic

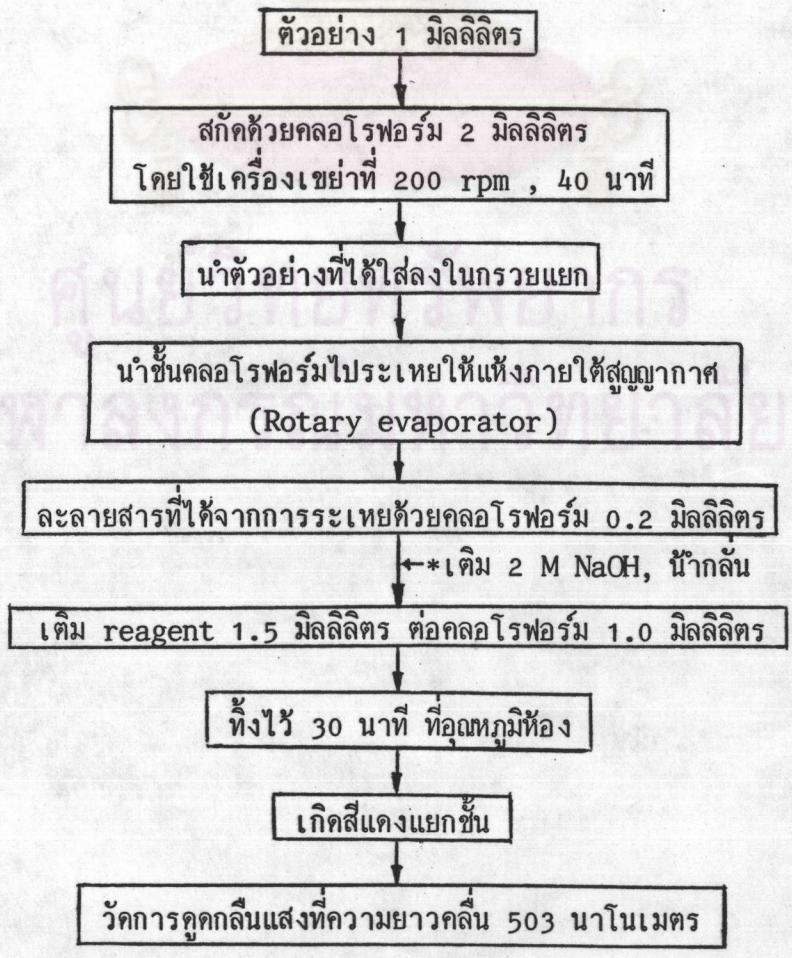
3.3 วิธีการเลี้ยงและเก็บเซลล์จุลินทรีย์ (U.S. Patent 4,447,456, 1984)



ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ C. fascians ซึ่งบรรจุใน ampule ลักษณะ freeze-dried ลงในหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ และเขี่ยเชื้อลงในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยฟรุคโตส แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้เป็น stock culture ส่วนหลอดที่บรรจุอาหารเหลวนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อนี้ 2 มิลลิลิตร ลงในขวดลูกชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าในเครื่องไซโครเทอร์ม (Psychrotherm) ที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 100-125 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออก โดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์ที่อัตรา 5,000 g ที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 0.5 โมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7 แล้วเซนตริฟิวจ์อีกครั้งที่สภาวะเดิม จากนั้นจึงเก็บเซลล์ที่ได้ในสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิแช่แข็ง

3.4 วิธีการวิเคราะห์

3.4.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณลิโมนิน (Vaks และ Lifshitz, 1981)



นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร โดยเครื่องเขย่าที่อัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที นำตัวอย่างใส่ในกรวยแยก แล้วนำชั้นคลอโรฟอร์มไประเหยให้แห้งภายใต้สูญญากาศด้วยเครื่อง Rotary evaporator ละลายสารที่ได้จากการระเหยด้วยคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติม reagent* 1.5 มิลลิลิตร ต่อสารละลายในคลอโรฟอร์ม 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vertex mixer ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายมีสีชั้นบนวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 503 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณลิโมนินจากสมการของกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ก

กรณีน้ำมะนาวทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้ว ต้องมีการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเป็นสารพวกเกลือโซเดียม ซึ่งทำโดยเติม 2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่นลงในสารละลายที่ได้จากการระเหยแล้วละลายในคลอโรฟอร์ม นำไปเขย่า จากนั้นดูดสารชั้นบนออก แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ reagent* แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 503 นาโนเมตร reagent* ประกอบด้วย

1. 0.1 gm of 4-(dimethylamino) benzaldehyde
2. 3.0 ml of acetic acid
3. 2.4 ml of 70% perchloric acid

3.4.2 <u>การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี</u> (Pearson, 1976)

เตรียมสารละลายสต๊อคของกรดแอสคอบิค 0.1% ในกรดออกซาลิค 0.4% เพื่อใช้ทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลาย dye มาตรฐาน โดยชั่ง 2,6 dichlorophenolindophenol มา 12 มิลลิกรัม ทำให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

เตรียมตัวอย่างหรือปรับความเข้มข้นของตัวอย่างด้วย 0.4% กรดออกซาลิค ปรับเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ให้เป็นศูนย์โดยใช้น้ำกลั่น แล้วหาค่า L_1 โดยใช้ 0.4% กรดออกซาลิค 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ dye 9 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ภายใน 15 วินาที จากนั้นปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้ไปปรับเครื่องให้เป็นศูนย์ แล้วปิเปตตัวอย่างเดิมนี้ 1 มิลลิลิตร ทำ

ปฏิกิริยากับ dye 9 มิลลิลิตร แล้ววัดการดูดกลืนแสงภายใน 15 วินาที ค่าที่ได้คือ L_2 คำนวณหาปริมาณวิตามินซีโดยนำผลต่างของ L_1 และ L_2 ไปอ่านหาค่าวิตามินซีจากสมการกราฟมาตรฐาน

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดซิตริก (Pearson, 1976)

ปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ใช้ฟีนอลธาลีน 1% 1-2 หยด เป็นอินดิเคเตอร์ จนถึงจุดยุติ นำค่าปริมาณสารละลายด่างที่ใช้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดซิตริก จากสูตร

$$\% \text{ กรดซิตริก} = \frac{\text{นอร์มอลของสารละลายด่าง} \times \text{มิลลิลิตรของสารละลายด่าง} \times \text{มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดซิ}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)}}$$

3.4.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solids, ^{o}Brix)

หยดตัวอย่างลงบนช่องแก้ว (prism) ของ hand refractometer อ่านค่าเป็นเปอร์เซ็นต์

3.4.5 การวัดค่า pH : วัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter

3.4.6 การวิเคราะห์ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning) (Rangana, 1977)

นำตัวอย่างมา 2 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาณ 3 มิลลิลิตร นำสารที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเปรียบเทียบกัน ตัวอย่างที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงแสดงว่ามีปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลสูง

3.5 การศึกษาภาวะการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในการลดปริมาณลิโมนิน

3.5.1 ระดับ pH

ใช้น้ำมะนาวสดเป็นสับสเตรท ปรับ pH โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ระดับ pH ที่ศึกษาคือ 2.2, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0 และ 10.0 นำน้ำมะนาว 15 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเซลล์ 0.3 กรัม ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาตามวิธีในภาคผนวก ก จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนิน การทดลองนี้ทำ 2 ซ้ำ

3.5.2 ระดับอุณหภูมิ

นำน้ำมะนาวสดปรับ pH ให้อยู่ที่ pH ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 3.5.1 แล้วควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องอังน้ำแบบเขย่าได้ (water bath shaker) ระดับอุณหภูมิที่ศึกษาคือ 10, 28, 35, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำมะนาว 15 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเซลล์ 0.3 กรัม เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยา จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณลิโมนิน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.5.3 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์

ปริมาณเซลล์ที่ศึกษาคือ 0.03, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 และ 0.60 กรัม ปรับ pH น้ำมะนาวให้อยู่ที่ pH ที่เหมาะสม นำมา 15 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเซลล์ปริมาณต่าง ๆ กันดังกล่าว ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.5.2 เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาและวิเคราะห์ปริมาณลิโมนิน ตามลำดับ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.5.4 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา

นำน้ำมะนาวมาปรับให้อยู่ที่ pH ที่เหมาะสม แล้วนำมา 15 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.5.3 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วเปลี่ยนแปลงระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่าง ๆ ตามลำดับ แล้วนำน้ำมะนาวที่ผ่านการทำปฏิกิริยาไปวิเคราะห์ปริมาณลิโมนิน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.5.5 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บ

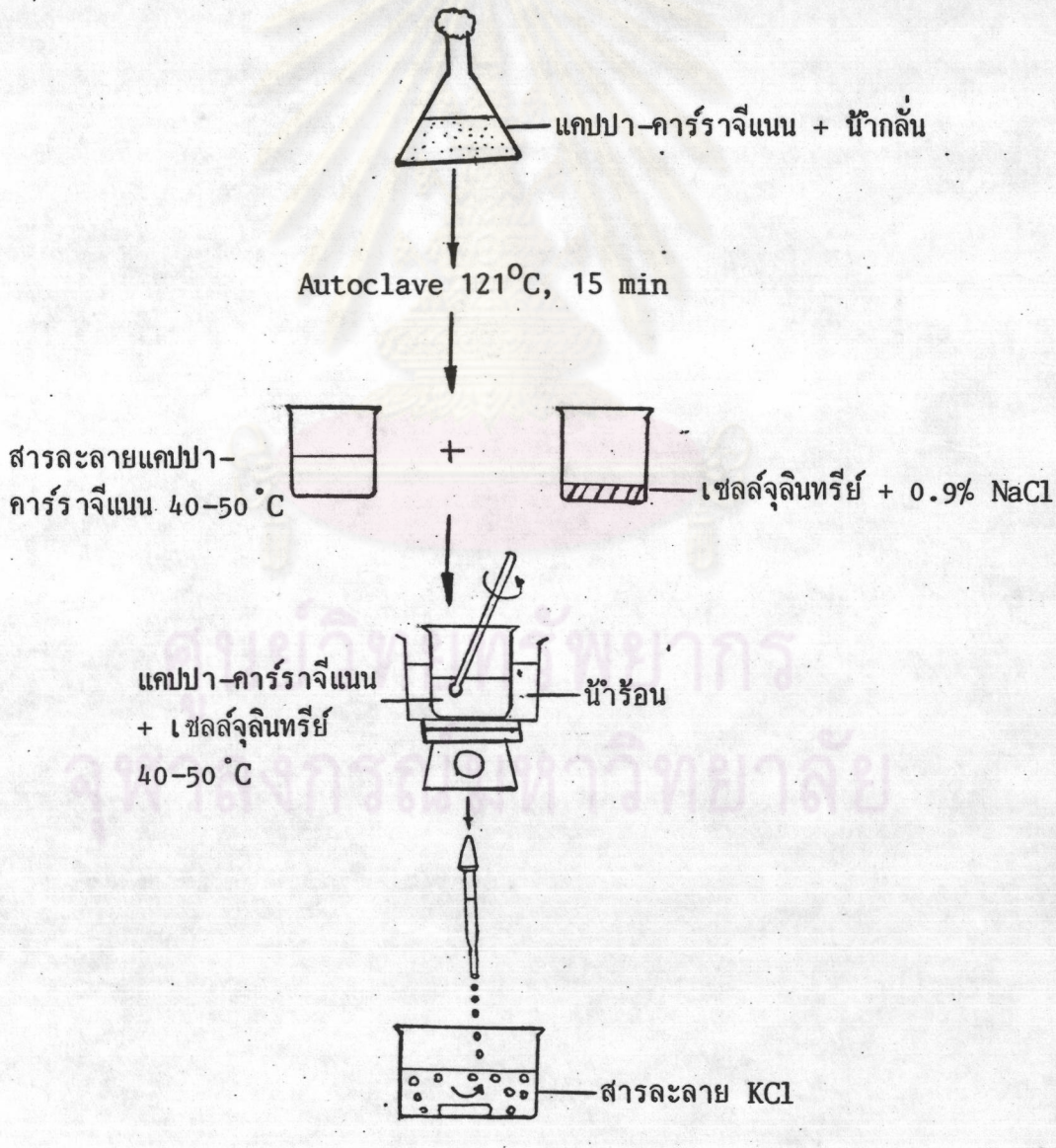
นำเซลล์จุลินทรีย์เก็บในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ผ่านการสเตอร์ริไรส์ โดยศึกษาการเก็บที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวัดแอคติวิตีที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 วัน ตามลำดับ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้นคือที่ระยะเวลาเก็บที่ 0 วัน โดยใช้เซลล์คงที่ที่ 0.3 กรัม ทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาว 15 มิลลิลิตร ที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.5.1, 3.5.2 และ 3.5.4 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเซลล์อิสระกับระยะเวลาของการเก็บในสภาวะที่กำหนด

3.5.6 หาค่าครึ่งชีวิต

อ่านค่าครึ่งชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ใน 3.5.5 ที่ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ มีค่าร้อยละ 50

3.6 การเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป



นำแคปปา-คาร์ราจีแนนผสมกับน้ำกลั่น ละลายที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนให้อยู่ที่ 40-50 องศาเซลเซียส นำมาผสมกับเซลล์จุลินทรีย์ (cell slurry) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน หยดของผสมลงในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ซึ่งกวนอยู่ตลอดเวลา เก็บจุลินทรีย์ตรึงรูปในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาวัดแอคติวิตี

3.6.1 หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน

เซลล์ 0.5 กรัม ผสมกับสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนเข้มข้น 2.0% แล้วเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ผสม ให้อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนเป็น 1:9, 1:7 และ 1:5 โดยน้ำหนักตามลำดับ โดยขึ้นรูปในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วนำจุลินทรีย์ตรึงรูปไปวัดแอคติวิตี โดยทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาวที่ pH 4.5 จำนวน 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยา ตามวิธีในภาคผนวก ก แล้วนำไปวิเคราะห์หาร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลง เส้นผ่านศูนย์กลางของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ได้ประมาณ 0.3-0.4 มิลลิเมตร

3.6.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป

3.6.2.1 กำหนดความเข้มข้นของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนนและโปแตสเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในการตรึงรูป

เตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปดังวิธีในข้อ 3.6 โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล 5×4 ซึ่งแปรความเข้มข้นของสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน (A) เป็น 5 ระดับ คือ ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนัก ความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (B) เป็น 4 ระดับคือ 0.3, 0.5, 1.0 และ 2.0 โมลาร์ และกำหนดปริมาณเซลล์คงที่เท่ากับ 0.5 กรัม โดยผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.6.1

พิจารณาสมบัติด้านความแข็งของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เตรียมได้จากแต่ละวิธี โดยการสังเกตลักษณะของเม็ดเจลและทดลองใช้มือสัมผัสหรือบีบเม็ดเจล และวัดแอคติวิตีโดยนำจุลินทรีย์ตรึงรูปทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาว pH 4.5 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาตามวิธีในภาคผนวก แล้ววิเคราะห์หาร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลง

3.6.2.2 กำหนดความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม

กำหนดให้ปริมาณเซลล์คงที่ ใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.6.2.1 ในการตรึงรูป แล้วแช่เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปที่ได้ในสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์ และมีการกวนตลอดเวลาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส แล้วนำจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาพิจารณาสมบัติด้านความแข็งและวัดแอคติวิตีเช่นเดียวกับวิธีการใช้ข้อ 3.6.2.1

3.6.2.3 กำหนดปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม

เตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 3.6.2.1 และ 3.6.2.2 แล้วแปรปริมาณเซลล์จุลินทรีย์เป็น 5 ระดับ คือ 0.30, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50 กรัม ตามลำดับ แล้วนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาพิจารณาสมบัติด้านความแข็งและแอคติวิตีเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.6.2.1

3.6.3 ศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

เตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปโดยใช้ภาวะที่ได้จากข้อ 3.6.2 5 ตัวอย่างในสภาวะเดียวกัน แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาว pH 4.5 5 ตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองจุลินทรีย์ตรึงรูปออกพร้อมกันทั้ง 5 ตัวอย่าง จากนั้น

- นำตัวอย่างที่ 1 มาวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนินทันที = 0 นาที
- นำตัวอย่างที่ 2 มาวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนินที่เวลา 15 นาที หลังจากกรองเซลล์ออก = 15 นาที
- นำตุ้วอย่างที่ 3 มาวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนินที่เวลา 30 นาที หลังจากกรองเซลล์ออก = 30 นาที
- นำตัวอย่างที่ 4 มาวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนินที่เวลา 60 นาที หลังจากกรองเซลล์ออก = 60 นาที
- นำตัวอย่างที่ 5 มาวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนินที่เวลา 90 นาที หลังจากกรองเซลล์ออก = 90 นาที

วิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีในภาคผนวก แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลงที่ระยะเวลาต่าง ๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบกันโดยใช้วิธีทางสถิติ

3.6.4 ศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์ตรึงรูปเปรียบเทียบกับแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ใช้เป็นตัวพยุง

นำแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ขึ้นรูปแล้วมา slice ให้เป็นแผ่นบาง ๆ แล้วเคลือบทองด้วยเครื่องเคลือบ Fine coat 5 นาที แล้วดูโครงสร้างของเม็ดเจลที่ไม่มีเซลล์นี้ด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 9,400 และ 10,000 เท่า

นำจุลินทรีย์ตรึงรูปมา slice ให้เป็นแผ่นบาง ๆ เติมสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร แช่นาน 3 ชั่วโมง แล้วเทสารนี้ออก เติมสารละลายออสเมียม-เตตรอกไซม์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง แล้วเทสารออสเมียม-เตตรอกไซด์ออก ระเหยน้ำบางส่วนออกจากจุลินทรีย์ตรึงรูปด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 อบจุลินทรีย์ตรึงรูปให้แห้งแล้วเคลือบทองด้วยเครื่อง Fine coat นาน 5 นาที จากนั้นดูโครงสร้างของจุลินทรีย์ตรึงรูปด้วย SEM ที่กำลังขยาย 3,600 และ 10,000 เท่า

3.6.5 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ตรึงรูป

3.6.5.1 เปรียบเทียบ pH profile ของแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ

เตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปในภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3.6.2 หาแอคติวิตีที่ระดับ pH ต่าง ๆ กัน คือ 2.2, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 9.0, 11.0 และ 13.0 ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 1.5 ชั่วโมง

เปรียบเทียบ pH profile ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของจุลินทรีย์ตรึงรูป และเซลล์อิสระกับ pH ต่าง ๆ ของน้ำมะนาว

3.6.5.2 เปรียบเทียบ temperature profile ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ

วัดแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ pH ที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.5.1 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 10, 20, 28, 35, 45, 55, 65, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเป็น 1.5 ชั่วโมง

เปรียบเทียบ temperature profile ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระกับอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาระหว่างจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระกับน้ำมะนาวที่ pH ที่เหมาะสมของแต่ละตัว

3.6.5.3 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา

วัดแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ภาวะที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 3.6.5.1 และข้อ 3.6.5.2 ที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ชั่วโมง ตามลำดับ

3.6.5.4 วัดค่า K_m และ V_{max} ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ

หาแอคติวิตีของเซลล์อิสระโดยใช้เซลล์ 0.40 กรัม ทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาว 15 มิลลิลิตร ที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.5.1, 3.5.2 และ 3.5.4 โดยแปรความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำมะนาวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH ที่เหมาะสมของการทำงานของเซลล์

วัดแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปซึ่งเตรียมในสภาวะที่ได้จากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 นำมาทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาวที่สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.6.5.1, 3.6.5.2 และ 3.6.5.3 โดยแปรความเข้มข้นของลิโมนินในน้ำมะนาวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH ที่เหมาะสมของการทำงานของจุลินทรีย์ตรึงรูป

ในการหาค่า K_m และ V_{max} นี้จะกำหนดให้สภาวะต่าง ๆ คงที่ยกเว้นความเข้มข้นของสับสเตรท ในที่นี้คือปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาว ซึ่งทำโดยการเจือจางน้ำมะนาวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และคำนวณหาความเข้มข้นของลิโมนิน แล้วเปลี่ยนให้อยู่ในหน่วยไมโครโมลและคำนวณหาอัตราเร็วในการลดปริมาณลิโมนินในหน่วยไมโครโมลต่อนาที นำค่าที่ได้ทั้ง 2 ค่ามาเขียนกราฟ โดยให้ค่า $\frac{1}{\text{ความเข้มข้นของสับสเตรท}}$ $[\text{ไมโครโมล}]^{-1}$ เป็นแกน x ส่วนค่า $\frac{1}{\text{อัตราเร็วในการลดปริมาณลิโมนิน}}$ $[\text{ไมโครโมล/นาที}]^{-1}$ เป็นแกน y แล้วคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} จากจุดตัดของกราฟบนแกน x และแกน y ตามลำดับ

เปรียบเทียบ Lineweaver Burk plot ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระในค่าของ K_m และ V_{max}

3.6.5.5 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บ

นำจุลินทรีย์ตรึงรูปเก็บในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ผ่านการสเตอร์ริไรส์ ศึกษาการเก็บที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาวัดแอคติวิตีที่ระยะเวลาต่าง ๆ คือ 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, และ 80 วัน ตามลำดับ โดยนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาวที่สภาวะที่เหมาะสม แล้วนำไปเปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น คือที่ระยะเวลาเก็บที่ 0 วัน

เปรียบเทียบเสถียรภาพระหว่างการเก็บด้วยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแอคติวิตีสัมพัทธ์ของจุลินทรีย์ตรึงรูปกับระยะเวลาของการเก็บในสภาวะที่กำหนด

3.6.5.6 หาค่าครึ่งชีวิต

อ่านค่าครึ่งชีวิตของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส ในข้อ 3.6.5.5 ที่ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์มีค่าร้อยละ 50

3.7 การลดความขมของน้ำมะนาวถนอมแบบพาสเจอร์ไรส์ โดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

3.7.1 ศึกษาผลของระดับ pH ต่อองค์ประกอบของน้ำมะนาว

นำน้ำมะนาวมาปรับ pH เป็น 2.5, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 9.0 และ 12.0 แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยให้ส่วนหนึ่งทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูป อีกส่วนหนึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูป แล้วนำน้ำมะนาวที่ได้จากทั้ง 2 ส่วน ไปวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี และกรดซิตริก

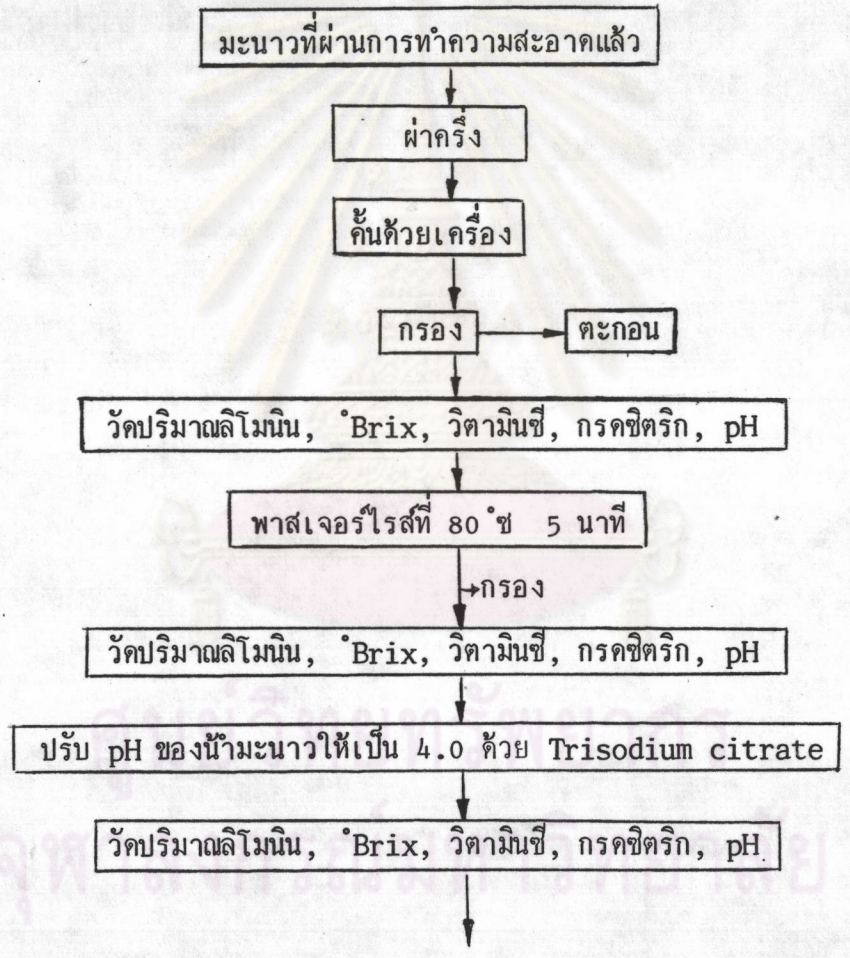
3.7.2 ศึกษาผลของระดับอุณหภูมิต่อองค์ประกอบของน้ำมะนาว

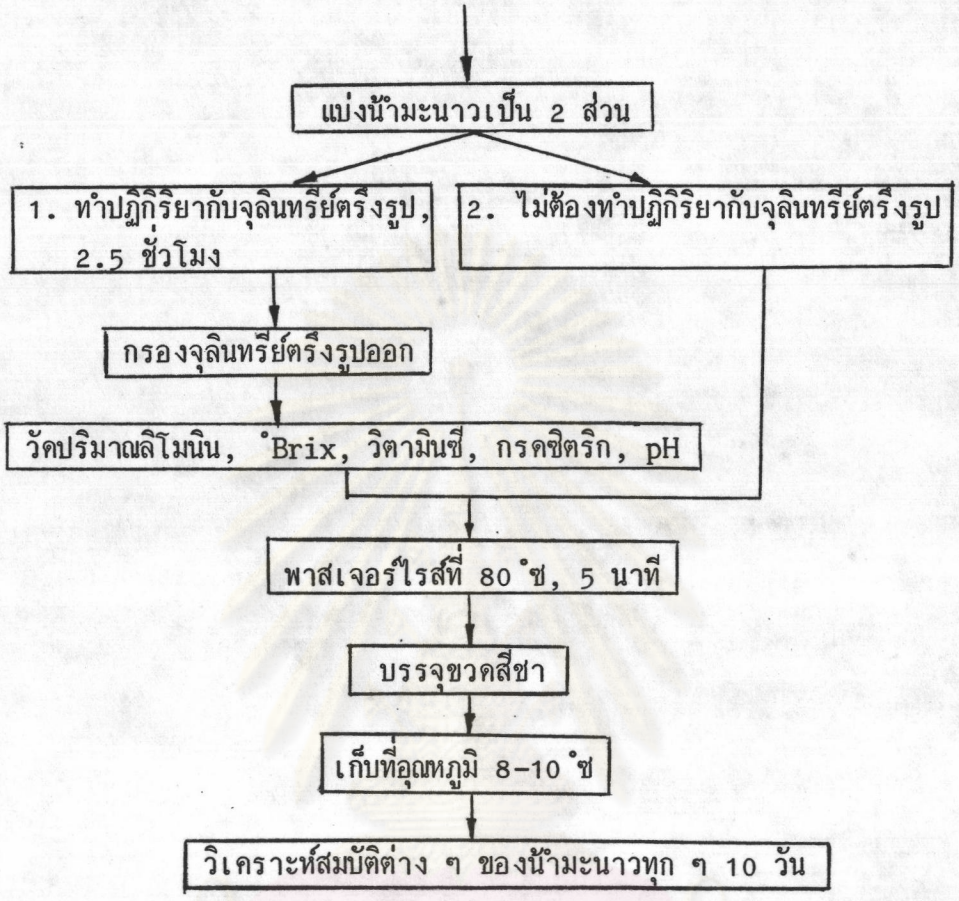
ระดับ pH ที่เลือกมาศึกษาผลของระดับอุณหภูมิคือ pH ตามธรรมชาติของน้ำมะนาวและที่ระดับ pH ที่เหมาะสมของการทำงานของจุลินทรีย์ตรึงรูป โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูป อีกส่วนไม่ทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูป นำน้ำมะนาวทั้ง 2 ส่วนมาศึกษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 10, 28, 35, 45, 55 และ 70 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาที่กำหนด แล้วนำน้ำมะนาวที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซีและกรดซิตริก ตามลำดับ

3.7.3 ศึกษาผลของระยะเวลาในการพาสเจอร์ไรส์ต่อปริมาณลิโมนิน

นำน้ำมะนาวมาปรับ pH ให้อยู่ที่ระดับ pH ที่เหมาะสมของการทำงานของจุลินทรีย์ตรึงรูป แล้วนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 5, 10, 15 และ 20 นาที จากนั้นจึงนำน้ำมะนาวที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณลิโมนิน

3.7.4 กระบวนการเตรียมและการลดความขมในน้ำมะนาวถนอม





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำน้ำมะนาวที่ผ่านการทำความสะอาดมาคั้นด้วยเครื่อง แล้วกรอง นำมาวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ แล้วนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที กรอง วิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ ปรับ pH ของน้ำมะนาวให้อยู่ที่ระดับ pH ที่เหมาะสมของการทำงานของจุลินทรีย์ตรึงรูป ด้วยเกลือไตรโซเดียม ซิเตรท และวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ ตามลำดับ จากนั้นแบ่งน้ำมะนาวเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูปในเครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน ดังรูปที่ 13 บรรจุน้ำมะนาวในถังสแตนเลส 2 ชั้น ขนาด 16×12×12 นิ้ว นำจุลินทรีย์ตรึงรูปบรรจุในตะแกรงแล้วจุ่มลงในถัง มีการกวนเป็นระยะสม่ำเสมอ เป็นระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง แล้วแยกจุลินทรีย์ตรึงรูปออก แล้วสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ แล้วนำไปพาสเจอร์ไรส์อีกครั้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที บรรจุลงขวดสีชา แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส อีกส่วนหนึ่งที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูป นำไปพาสเจอร์ไรส์อีกครั้งที่สภาวะเดิม บรรจุลงขวดสีชา เก็บที่สภาวะเดียวกัน แล้วนำมาวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ เปรียบเทียบกันทุก ๆ 10 วัน

สมบัติที่พิจารณาได้แก่ ปริมาณลิโมนิน, วิตามินซี, กรดซิตริก, ^{o}Brix, pH,และปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล

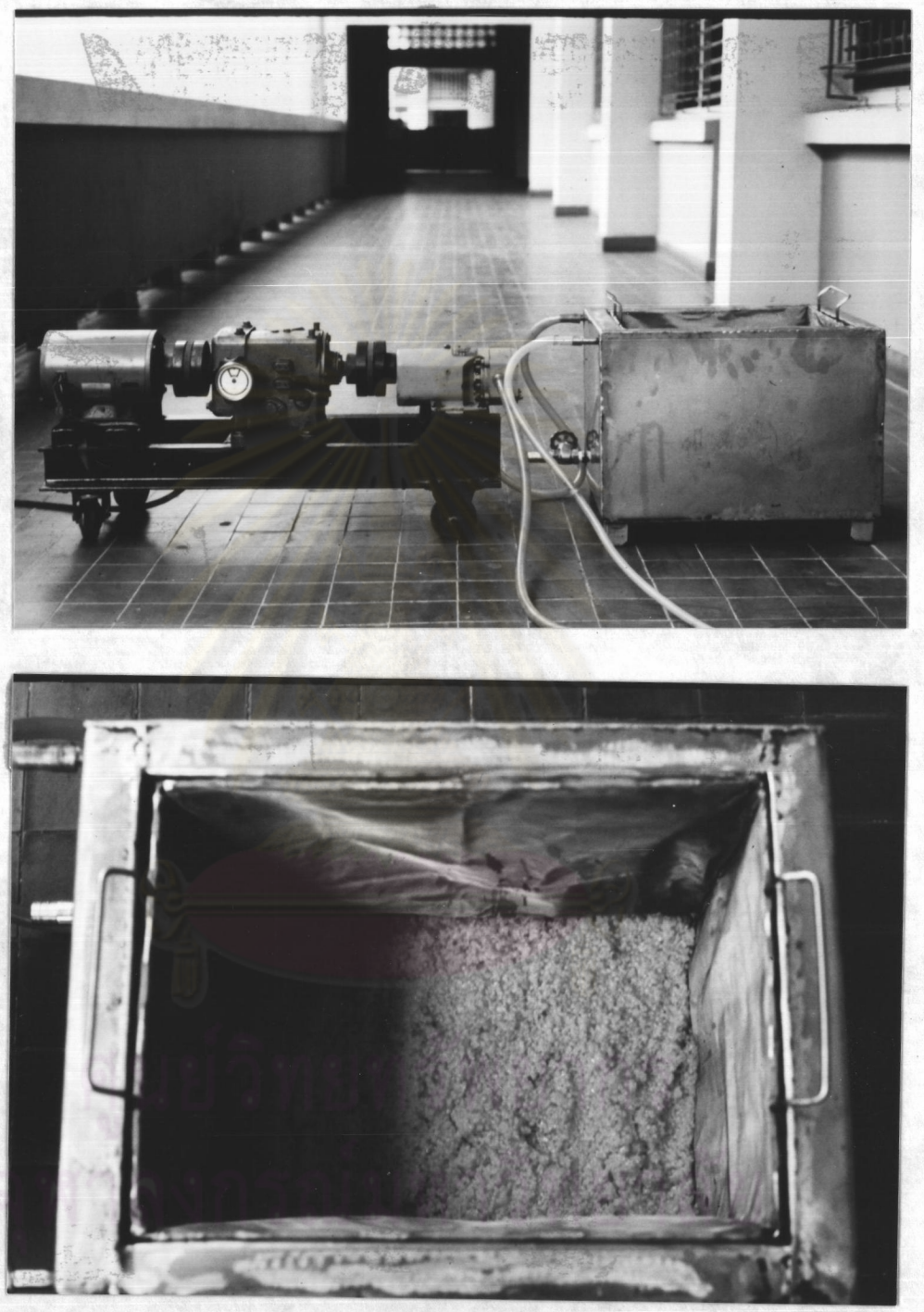
3.7.5 ศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำมะนาวถนอม

นำน้ำมะนาวถนอมที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูปมาทดสอบสมบัติด้านประสาทสัมผัส หลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 เดือน และ 3.5 เดือน ตามลำดับ นำมาพิจารณาสมบัติดังนี้คือ กลิ่น รส และการยอมรับรวม เปรียบเทียบสมบัติดังกล่าวของน้ำมะนาวทั้ง 2 ตัวอย่าง แล้วจัดลำดับว่าชอบตัวอย่างใดมากกว่า โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 6 คน ในการทดสอบ

ตารางการทดสอบประสาทสัมผัสแสดงในภาคผนวก ก

3.8 ศึกษาประสิทธิภาพการนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาใช้ใหม่

นำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาวที่สภาวะที่เหมาะสมเป็นระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง แล้วนำจุลินทรีย์ตรึงรูปนี้มาล้างด้วยสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาวชุดที่สภาวะเดิม ทำชุดเช่นนี้จนกระทั่งแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปมีค่าเป็นศูนย์หรือมีค่าต่ำ แล้วนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำงานของการใช้ชุดในแต่ละครั้ง



รูปที่ 13 กระบวนการลดความขมในน้ำมะนาวถนอมแบบพาสเจอร์ไรส์ โดยเครื่องปฏิกรณ์เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูปแบบถังกวน ขนาด 16 × 12 × 12"