บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์

เซลล์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ Corynebacterium fascians (NARRL-B-15096) สามารถผลิตเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส จุลินทรีย์นี้แยกได้จากดิน จัดเป็นพวก aerobic bacteria สามารถเจริญได้ในแหล่ง C-source อื่น นอกจากสารพวกลิโมนอยด์ เช่น กลูโคส กาแลคโตส ฟรุคโตส และเจริญได้ดีที่สุดในฟรุคโตส (Hasegawa และ King, Jr, 1983) จุลินทรีย์ตัวอื่นที่ใช้ในการศึกษาเรื่องการลดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้มอื่น ๆ ที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว เช่น A. globiformis, Pseudomonas (Hasegawa และคณะ, 1972, 1974) Acinetobacter sp. (Vaks และคณะ, 1981) เป็นต้น ต้องการสารลิโมนอยด์ในการเจริญ การใช้จุลินทรีย์ตัวนี้จึงมีข้อได้เปรียบคือ สามารถเจริญได้ในแหล่ง C-source ที่มีราคาถูกและหาง่าย

จากการทดลองเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ตามวิธีในข้อ 3.3 จะได้เซลล์มีสีส้ม ดังแสดงในรูปที่ 12 ลักษณะเซลล์เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์มีลักษณะดังนี้คือ เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ กรัมบวก ลักษณะเซลล์ที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับที่กล่าวใน U.S. Pat. 4,447,456

5.2 การศึกษาภาวะการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในการลดปริมาณลิโมนิน

5.2.1 ระดับ pH

ในการศึกษาผลกระทบของ pH ต่อประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ได้ผลดังในข้อ 4.2.1 จะเห็นว่าที่ pH ตามธรรมชาติของน้ำมะนาว (pH = 2.2) เอนไซม์นี้ไม่มีประสิทธิภาพในการทำงาน คือไม่สามารถลดปริมาณลิโมนินที่ระดับ pH ของน้ำมะนาว pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง pH 5.0-6.0 เมื่อ pH สูงกว่าช่วงนี้ แอคติวิตีของเอนไซม์ก็ลดลงเช่นกัน สาเหตุอาจเกิดจากในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างมาก อาจทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ซึ่งจัดเป็นพวกโปรตีนเกิดเสียสภาพธรรมชาติ อีกสาเหตุหนึ่งอาจเนื่องจากการที่เอนไซม์จับกับสับสเตรทนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการเป็นกรดหรือด่างของ side chain ของกรดอะมิโน

บริเวณเร่งของเอนไซม์ เมื่อ pH เป็นกรดหรือด่างมากไป side chain นี้อาจได้หรือ สูญเสียโปรตอนเป็นผลให้ลิโมนินจับกับเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส ได้ไม่ดี จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานมีค่าลดลง

จากผลงานของ Hasegawa และคณะ (1972, 1974) ได้ทดลองสกัดเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส จาก A. globiformis และ Pseudomonas พบว่าเอนไซม์ที่ได้มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 9.5 และ 8.0 ตามลำดับ และ Hasegawa และคณะ (1983) ได้สกัดเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนสจาก C. fascians (NRRLB-15096) ด้วย พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 8.2 ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การใช้เซลล์จุลินทรีย์ในการลดปริมาณลิโมนินมีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ลดขั้นตอนการสกัดและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และเอนไซม์ยังสามารถทำงานหรือลดปริมาณลิโมนินได้ที่ pH ต่ำกว่า (pH 5.0-6.0) คือสามารถทำปฏิกิริยาที่ pH ใกล้เคียงกับ pH ตามธรรมชาติของน้ำผลไม้

5.2.2 ระดับอุณหภูมิ

จากผลการทดลองข้อ 4.2.2 จะเห็นว่า เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าที่ 25-28 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา แอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลง อาจเนื่องจากเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นโปรตีนเกิดเสียสภาพธรรมชาติเป็นเหตุให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงเป็นผลให้แอคติวิตีลดลงด้วย ฉะนั้นการใช้เซลล์จุลินทรีย์ตัวนี้จึงมีข้อได้เปรียบ คือสามารถทำปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้สะดวกในการทดลองศึกษาและการนำไปใช้

5.2.3 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาผลของปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ต่อประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนินในข้อ 4.2.3 พบว่า ปริมาณลิโมนินที่ลดลงแปรผันตามปริมาณเซลล์ ที่ปริมาณเซลล์ที่ 0.4 และ 0.5 กรัม ปริมาณลิโมนินที่ลดลงมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ 0.4 กรัม แตกต่างกับที่ 0.6 กรัม แต่ปริมาณลิโมนินที่ลดลงมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

และเมื่อพิจารณาความเหมาะสมด้านอื่น ๆ ประกอบด้วย เช่น เมื่อใช้เซลล์ในปริมาณมาก ลักษณะปรากฏและกลิ่น รส ของน้ำมะนาวจะเปลี่ยนไป และเป็นการสิ้นเปลืองเซลล์เมื่อเทียบกับร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลง ซึ่งมีค่าไม่สูงมาก ฉะนั้นจึงเลือกปริมาณเซลล์ที่ 0.4 กรัม ในการทำปฏิกิริยากับน้ำมะนาว 15 มิลลิลิตร

5.2.4 ระยะเวลาการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.4 จะเห็นได้ว่า เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวที่ลดลงจะมีค่าสูงขึ้นด้วย อาจเนื่องจากเอนไซม์ภายในเซลล์มีโอกาสสัมผัสกับสับสเตรทหรือลิโมนินนานขึ้น ทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้ดีขึ้น ประสิทธิภาพการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์จึงสูงขึ้นด้วย ที่ระยะเวลา 2.0 และ 2.5 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกับที่ 3.0 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมอื่น เช่น ปริมาณลิโมนินที่ลดลงเมื่อเทียบเวลาเป็น 3.0 ชั่วโมง มีค่าสูงกว่าที่เมื่อใช้เวลาทำปฏิกิริยานาน 2.0 และ 2.5 ชั่วโมง เพียงเล็กน้อย เนื่องจากเอนไซม์ภายในเซลล์อาจไม่เสถียรที่สภาวะของน้ำมะนาวนี้ เอนไซม์บางส่วนอาจเกิดการเสียสภาพ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์เมื่อระยะเวลานานขึ้นมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย หรืออาจเนื่องจากการเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาโดยผลิตภัณฑ์ (Product inhibition) หรือการทำงานของเอนไซม์ต้องอยู่ในสภาพที่มีสับสเตรท excess เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไประยะเวลาหนึ่ง ปริมาณสับสเตรทหรือลิโมนินลดลง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานมีค่าไม่สูงเท่าที่ควรเมื่อระยะเวลาทำปฏิกิริยานานขึ้น

5.2.5 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บ

จากผลการวิจัยในข้อ 4.2.5 ดังรูปที่ 18 พบว่า เอนไซม์ของเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพสูงกว่าเอนไซม์ของเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง อาจเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงอาจมีผลให้เอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส มีโอกาสเสียสภาพธรรมชาติได้ง่ายขึ้น

5.2.6 ค่าครึ่งชีวิต

จากการอ่านค่าครึ่งชีวิตจากรูปที่ 18 ตามผลการทดลองในข้อ 4.2.6 พบว่าค่าครึ่งชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีค่า 60 วัน ส่วนที่เก็บที่อุณหภูมิ 8-10 องศา-

เซลเซียส มีค่ามากกว่า 80 วัน อาจเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงมีผลต่อการแปรสภาพของเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์

5.3 การเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป

ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาวิจัยถึงการตรึงเซลล์ C. fasciansโดยวิธีห่อหุ้มเซลล์ภายในตัวพยุง (entrapment) ในแคปปา-คาร์ราจีแนน ปัจจุบันการตรึงเซลล์โดยวิธีนี้เป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยกันมาก ทั้งนี้เพราะมีข้อได้เปรียบดังนี้ (Nilson และคณะ, 1983)

ก. เป็นวิธีทำได้ง่ายในการห่อหุ้มเซลล์ไว้ให้อยู่ภายในร่างแหโพลีเมอร์

ข. เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้สภาวะการตรึงเซลล์รุนแรง ในบางกรณีสามารถใช้ตรึงเซลล์มีชีวิตได้

ค. เป็นวิธีที่เก็บเซลล์ไว้ได้ดีโดยมีการรั่วไหลออกภายนอกได้น้อย

ง. เป็นวิธีที่ตรึงเซลล์ได้ครั้งละมาก ๆ

แคปปา-คาร์ราจีแนนได้ถูกใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ในการผลิตกรดมาลิกทางการค้ามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1977 (Chibata, 1980) และในปี 1978 นักวิทยาศาสตร์กลุ่มเดียวกันนี้ได้ใช้คาร์ราจีแนนเป็นวัสดุตรึงเพื่อการผลิตกรดแอสพาร์ติกในอุตสาหกรรมเช่นกัน

ในการวิจัยนี้เลือกใช้คาร์ราจีแนนเป็นวัสดุตรึงเซลล์ ตัวพยุงนี้จัดเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ สามารถใช้กับอาหารได้โดยไม่มีผลกระทบข้างเคียง นอกจากนี้ยังเป็นการตรึงเซลล์แบบ two phase system ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีตรึงเซลล์แบบอื่น ๆ ที่ได้เม็ดเจลลักษณะสัณฐานกลมเป็นส่วนใหญ่ จึงมีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการทำปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องในคอลัมน์ได้ดี

การใช้จุลินทรีย์ตรึงรูปในการลดความขมในน้ำมะนาวถนอมมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์อิสระ คือสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ และป้องกันการปนเปื้อนหรือการตกค้างของเซลล์จุลินทรีย์ในน้ำมะนาว สามารถแยกจุลินทรีย์ตรึงรูปออกจากสารละลายที่มีปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ง่าย

5.3.1 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และสารละลายแคปปา-คาร์ราจีแนน

จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์และตัวพยุง ดังผลการทดลองในข้อ 4.3.1 พบว่า ที่อัตราส่วน 1:9 และ 1:7 จุลินทรีย์ตรึงรูปมีแอคติวิตีไม่แตกต่างกัน และมีค่าสูงกว่าที่อัตราส่วน 1:5 ซึ่งอาจเนื่องจากเมื่อปริมาณแคปปา-คาร์ราจีแนนสูง ทำให้มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์สูง โอกาสที่เซลล์สูญเสียไปมีค่าน้อย และมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับสับสเตรทหรือลิโมนินมาก จึงทำให้แอคติวิตีมีค่าสูงกว่าที่อัตราส่วนของตัวพยุงต่ำ

5.3.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์

5.3.2.1 กำหนดความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน และโปแตสเซียม-คลอไรด์ที่เหมาะสม

จากผลการทดลองในข้อ 4.3.2.1 พบว่า ความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูป แต่มีผลต่อความแข็งของเม็ดเจล คือเมื่อความเข้มข้นของสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ความแข็งของเม็ดเจลก็เพิ่มขึ้นด้วย ดังผลงานของ Tosa และคณะ (1974) พบว่าอิออนของโลหะหลายชนิด เช่น โปแตสเซียม รูบิเดียม และซีเซียม รวมทั้ง aliphatic diamine หลายชนิด สามารถเพิ่มความแข็งของเม็ดเจลแคปปา-คาร์ราจีแนนได้ ผลจากการวิจัยในที่นี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์มีผลกระทบต่อความแข็งของจุลินทรีย์ตรึงรูป แต่ที่ความเข้มข้นสูง ๆ จะมีผลต่อความแข็งของเม็ดเจลน้อยลง จากผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 2 โมลาร์ จะได้เม็ดเจลมีความแข็งไม่แตกต่างกัน ฉะนั้นจึงใช้ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป

ความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนมีผลต่อแอคติวิตีและความแข็งของจุลินทรีย์ตรึงรูป คือ เมื่อความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนสูงขึ้น แอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปมีค่าลดลง อาจเนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำ เม็ดเจลมีความพรุนมากกว่า ฉะนั้นโอกาสที่

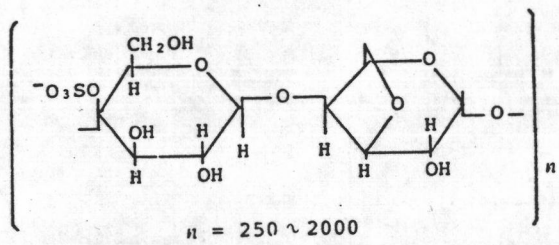
สับสเตรทจะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่อยู่ภายในมีค่ามาก จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณลิโมนินสูง และพบที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 แอคติวิตีมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างกับที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 ซึ่งที่ 1.5 และ 2.0 แอคติวิตีก็มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 จุลินทรีย์ตรึงรูปมีค่าแอคติวิตีต่ำสุด ส่วนความแข็งของเม็ดเจลจะแปรผันตามความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนน

ในการเลือกความเข้มข้นของแคปปา-คาร์ราจีแนนเพื่อใช้ในการตรึงรูปนี้นอกจากพิจารณาด้านแอคติวิตีแล้วยังพิจารณาถึงความเหมาะสมในการนำกลับมาใช้ใหม่ด้วย ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 ถึงแม้จะได้จุลินทรีย์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น แต่เม็ดเจลที่ได้ค่อนข้างเละ ไม่เหมาะสมนำกลับมาใช้ใหม่ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 ได้เม็ดเจลที่มีความแข็งพอสมควร และมีแอคติวิตีสูงกว่าที่ 2.5 ฉะนั้นจึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ 2.0 มาพิจารณาตัวแปรอื่นต่อไป

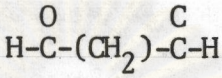
5.3.2.2 กำหนดความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่เหมาะสม

การตรึงเซลล์โดยวิธีแบบห่อหุ้มนี้ สามารถเสริมความแข็งของเม็ดเจลให้เพิ่มได้ด้วยสารพวก polyfunctional reagent (Klein และ Wagner, 1983) สารที่ช่วยเสริมความแข็งของเม็ดเจล เช่น กลูตารัลดีไฮด์ หรือกลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองเพิ่มความแข็งของเม็ดเจลด้วยกลูตารัลดีไฮด์ ผลการทดลองแสดงในข้อ 4.3.2.2 พบว่ากลูตารัลดีไฮด์ไม่มีผลต่อความแข็งและแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงสร้างของแคปปา-คาร์ราจีแนน



กลูตารัลดีไฮด์

จากโครงสร้างของแคปปา-คาร์ราจีแนน และกลูตารัลดีไฮด์ จะเห็นได้ว่ากลูตารัลดีไฮด์อาจไม่มีผลต่อการเกิด cross-linking ระหว่างโมเลกุลของแคปปา-คาร์ราจีแนน จึงไม่มีผลในการเสริมความแข็งของเม็ดเจล

โดยทั่วไป CHO-group จะทำปฏิกิริยากับ NH_2-group บนเอนไซม์ แต่กรณีที่เป็นเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ อาจเกิด steric effect ทำให้กลูตารัลดีไฮด์เข้าทำปฏิกิริยา coupling กับ NH_2-group บนเอนไซม์ได้ยาก กลูตารัล-ดีไฮด์จึงไม่มีผลต่อแคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูป และในทางอาหารไม่นิยมใช้สารตัวนี้ในกระบวนการเพราะมีกลิ่นฉุน และอาจทำให้เกิดความเป็นพิษได้ นับเป็นข้อได้เปรียบของการตรึงเซลล์ C. fascians โดยไม่ต้องใช้กลูตารัลดีไฮด์ในการตรึง

ข้อเสนอแนะ : ในการเสริมความแข็งของเม็ดเจลอาจใช้กลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีน ซึ่งผลงานของ Nishida และคณะ (1979) ได้ตรึงเซลล์ E. coli ในแคปปา-คาร์ราจีแนนกับกลูตารัลดีไฮด์ร่วมกับเฮกซาเมทธิลีนไดอามีน พบว่าจุลินทรีย์ตรึงรูปมีความเสถียรมากขึ้น Tosa และคณะ (1979) ได้แสดงให้เห็นว่าเฮกซาเมทธิลลีนไดอามีนสามารถช่วยทำให้ความแข็งของเม็ดเจลเพิ่มได้เช่นกัน

5.3.2.3 กำหนดปริมาณจุลินทรีย์ที่เหมะสม

ผลการทดลองในข้อ 4.3.2.3 แสดงให้เห็นว่าแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปมีค่าแปรผันตามปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรึงรูปถึงจุด ๆ หนึ่ง คือ ที่ปริมาณจุลินทรีย์เท่ากับ 1.5 กรัม จะได้จุลินทรีย์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีต่ำกว่าที่ 0.75 และ 1.00 กรัม

เหตุผลอาจเนื่องจากแคปปา-คาร์ราจีแนนห่อหุ้มเซลล์ไม่หมด มีเซลล์บางส่วนสูญเสียไป และการใช้เซลล์ที่ความเข้มข้นสูง เม็ดเจลที่ได้ไม่แข็งเท่าที่ควร รูปร่างลักษณะและขนาดของจุลินทรีย์ตรึงรูปจะควบคุมให้คงที่ได้ยาก นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลให้สารละลายเจลที่ใช้ตรึงเซลล์หนืดมากเกินไป การเกิดเม็ดเจลทำได้ยาก ผลผลิตของเม็ดเจลลดลง ส่วนหนึ่งของเจลและเซลล์จะสูญเสียไป เพราะไม่เกิดเม็ดเจล ดังนั้นในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูปจึงใช้ปริมาณจุลินทรีย์ที่ 0.75 กรัม ในการตรึงรูป

5.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม

จากผลการทดลองศึกษาการลดลงของลิโมนินในน้ำมะนาวที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูปแล้วหยุดปฏิกิริยาที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ในข้อ 4.3.3 พบว่า ร้อยละของปริมาณลิโมนินที่ลดลงในน้ำมะนาวที่หยุดปฏิกิริยาที่เวลาต่าง ๆ กัน มีค่าไม่แตกต่างกันจะเห็นได้ว่าโอกาสที่เซลล์จุลินทรีย์จะหลุดจากตัวพยุงมีน้อยมาก หรือประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ภายในตัวพยุงมีค่าสูง จากรายงานของ Nilsson และคณะ (1983) ได้กล่าวไว้ว่าการตรึงรูปเซลล์โดยห่อหุ้มภายในตัวพยุงนี้เป็นวิธีที่เก็บเซลล์ไว้ได้ดีมาก มีการหลุดหรือการรั่วไหลของเซลล์ออกภายนอกได้น้อย และจากรายงานของ Chibata (1980) พบว่ามีการใช้แคปปา-คาร์จีแนนในการตรึงรูปเซลล์ E. coli เพื่อผลิตกรดแอสพาร์ติกในอุตสาหกรรม ซึ่งจุลินทรีย์ตรึงรูปที่ได้นี้มีเสถียรภาพและประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสูงเช่นกัน

5.3.4 การศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์ตรึงรูป

จากการพิจารณาเปรียบเทียบโครงสร้างของจุลินทรีย์ตรึงรูปกับเม็ดแคปปา-คาร์ราจีแนนที่ใช้เป็นตัวพยุง โดย SEM ดังผลการทดลองในข้อ 4.3.4 จากรูปที่ 20 และ 21 จะเห็นได้ว่าพื้นผิวของเม็ดเจลที่ไม่มีเซลล์จุลินทรีย์มีลักษณะเป็นรูพรุน ส่วนรูปที่ 22 ซึ่งแสดงโครงสร้างของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่กำลังขยาย 3,600 เท่า พบว่าที่พื้นผิวมีเซลล์จุลินทรีย์ลักษณะเป็นท่อน ๆ เกาะรวมกันอยู่เป็นกลุ่ม ๆ เมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 10,000 เท่า จะเห็นเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกห่อหุ้มโดยแคปปา-คาร์ราจีแนนชัดเจนขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 23

5.3.5 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์ตรึงรูป

5.3.5.1 เปรียบเทียบ pH profile ของแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปกับเซลล์อิสระ

จากผลการเปรียบเทียบในข้อ 4.3.5.1 แสดงได้ดังรูปที่ 24 พบว่า pH profile ของแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระมีลักษณะหรือรูปแบบคล้ายคลึงกัน คือทำงานได้ดีที่ pH ที่เหมาะสมช่วงหนึ่ง ที่ pH ตามธรรมชาติของน้ำมะนาว (pH = 2.2) จุลินทรีย์ตรึงรูปยังมีประสิทธิภาพในการทำงาน คือสามารถลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวได้ ส่วนเซลล์อิสระไม่มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ pH นี้ และช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำงานของจุลินทรีย์ตรึงรูปมีค่าต่ำกว่าของเซลล์อิสระ สามารถทำงานได้ในช่วง pH ที่ใกล้เคียงกับ pH ตามธรรมชาติของน้ำมะนาว คือจุลินทรีย์ตรึงรูปสามารถทนสภาวะที่เป็นกรดได้มากกว่าเซลล์อิสระ ซึ่งอาจเนื่องจากตัวพยุงที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์มีส่วนช่วยปกป้องการรวมจับกลุ่มหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนส ภายในเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่เป็นกรด

การลดลงของ pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของจุลินทรีย์ตรึงรูปนี้เป็นข้อได้เปรียบของการใช้จุลินทรีย์ตรึงรูปในการลดความขมในน้ำผลไม้ตระกูลส้ม ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วงที่เป็นกรด จากผลงานของ Hasegawa และคณะ (1972, 1974, 1983) พบว่าเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจีเนสที่สกัดได้จาก A. globiformis และ C. fascians มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง pH ที่เป็นด่าง (pH = 8.0-9.5) หลังจากนั้น Hasegawa และคณะ (1982, 1985) ได้ทดลองตรึงเซลล์ของ A. globiformis และ C. fascians โดยใช้ acrylamide gel พบว่าจุลินทรีย์ตรึงรูปนี้สามารถทำปฏิกิริยาหรือลดความขมได้ที่ pH ตามธรรมชาติของน้ำผลไม้ ฉะนั้นการใช้จุลินทรีย์ตรึงรูปจึงมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้เซลล์อิสระหรือการใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเซลล์

5.3.5.2 เปรียบเทียบ temperature profile ของแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ

จากผลการดทลองข้อ 4.3.5.2 ดังรูปที่ 25 ที่อุณหภูมิต่ำ แอคติวิตีของเอนไซม์ภายในเซลล์มีค่าต่ำ และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องจากเพราะโมเลกุลของเอนไซม์มีพลังงานจลน์สูงขึ้น จะนำไปกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้นจนถึงช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมช่วงหนึ่ง จากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปอีก เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนจะเริ่มเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้แอคติวิตีมีค่าลดลง

temperature profile ของแอคติวิตีของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระมีลักษณะใกล้เคียงกัน แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ตรึงรูป (25-35 องศาเซลเซียส) มีช่วงกว้างกว่าของเซลล์อิสระ (25-28 องศาเซลเซียส) และสามารถทนอุณหภูมิสูงได้มากกว่าเซลล์อิสระ อาจเนื่องจากการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ภายในตัวพยุงซึ่งเป็นสารพวกโพลิเมอร์ อาจช่วยรักษาสภาวะธรรมชาติของเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนที่อุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากการคลายเกลียวของโปรตีนในเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยตัวพยุงอาจทำได้ยากกว่าของเซลล์อิสระ ฉะนั้นจุลินทรีย์ตรึงรูปจึงสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ยากกว่า นอกจากนี้การห่อหุ้มเซลล์ภายในแคปปา-คาร์ราจีแนนจะเป็นการทำให้เอนไซม์ต้องอยู่ในรูปแบบของโครงสร้างที่ค่อนข้างแน่นอน จึงมีความเสถียรต่อ pH และอุณหภูมิมากขึ้น (Klibanov, 1983)

5.3.5.3 <u>ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา</u>

การลดลงของปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวมีค่าแปรผันตามระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 26 ในข้อ 4.3.5.3 พบว่าระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ตรึงรูป (2.5 ชั่วโมง) มีค่าสูงกว่าของเซลล์อิสระ (2.0 ชั่วโมง) ซึ่งอาจเนื่องจากมีตัวพยุงห่อหุ้มเซลล์อยู่ ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาในการให้สับสเตรทหรือลิโมนินซึมผ่านตัวพยุงซึ่งมีความพรุนเข้าไปทำปฏิกริยากับเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์จุลินทรีย์

5.3.5.4 <u>ค่า K_m, V_{max} ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระ</u>

จากผลการทดลองข้อ 4.3.5.4 พบว่าค่า K_m ของจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระมีค่าเท่ากับ 3.6×10^2 และ 6.7×10^2 มิลลิโมล ส่วน V_{max} มีค่าเท่ากับ 4.00 และ 1.11 มิลลิโมลต่อนาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า K_m และ V_{max} ของเซลล์อิสระมีค่าสูงกว่าค่า K_m และ V_{max} ของจุลินทรีย์ตรึงรูป ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า การตรึงเซลล์อาจมีผลให้สับสเตรทหรือลิโมนินที่ถูกนำไปในเซลล์ที่ถูกบังคับให้อยู่รวมกันอยู่ใกล้บริเวณ active site

จึงเพิ่มประสิทธิภาพของการจับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทได้ดีขึ้น หรืออาจอธิบายได้อีกอย่างคือ การตรึงเซลล์มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจี่เนส เปลี่ยนไปอาจอยู่ในลักษณะที่สับสเตรทจะเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ดีขึ้น ซึ่งนับเป็นผลดีของการตรึงเซลล์ภายในตัวพยุง (Klein และ Wagner, 1980)

5.3.5.5 เสถียรภาพในระหว่างการเก็บ

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.5 และ 4.3.5.5 พบว่าจุลินทรีย์ตรึงรูปมีเสถียรภาพระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง สูงกว่าเซลล์อิสระที่เก็บในสภาวะเดียวกัน อาจเนื่องจากการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ภายในตัวพยุงทำให้เอนไซม์ต้องอยู่ในรูปแบบของโครงสร้างที่ค่อนข้างแน่นอน จึงมีความเสถียรในสภาวะที่เก็บมากกว่าเซลล์อิสระที่ไม่มีตัวพยุงคอยรักษาโครงรูป

สำหรับจุลินทรีย์ตรึงรูปและเซลล์อิสระที่เก็บที่อุณหภูมิห้องมีเสถียรภาพที่ต่ำกว่าที่เก็บที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงอาจมีผลให้เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนแปรสภาพธรรมชาติได้ง่ายขึ้น ในกรณีจุลินทรีย์ตรึงรูปอาจทำให้เม็ดเจลมีความแข็งลดลง อาจทำให้โครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปได้จึงมีความเสถียรลดลง

5.3.5.6 ค่าครึ่งชีวิต

จากการอ่านค่าครึ่งชีวิตของจุลินทรีย์ตรึงรูปจากรูปที่ 28 ในผลการทดลองข้อ 4.3.5.6 พบว่าค่าครึ่งชีวิตของจุลินทรีย์ตรึงรูปที่เก็บที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่า 80 วัน ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าครึ่งชีวิตของเซลล์อิสระที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5.4 การทดลองลดความขมของน้ำมะนาวฉนอมแบบพาสเจอร์ไรส์โดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

5.4.1 ผลของระดับ pH ต่อองค์ประกอบของน้ำมะนาวฉนอม

จากผลการทดลองข้อ 4.4.1 ดังรูปที่ 29 จะเห็นว่าเมื่อ pH สูงขึ้น ปริมาณวิตามินซีและกรดซิตริกในน้ำมะนาวจะมีค่าลดลงตามลำดับ ทั้งน้ำมะนาวที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการลดความขม อาจเนื่องจากสารทั้ง 2 ตัวนี้ไม่เสถียรในสภาพ pH ที่เป็นด่าง หรืออาจเกิดการ neutralized สาร 2 ตัวนี้ไปเป็นสารอื่นที่มีความเสถียรมากขึ้น

5.4.2 ผลของระดับอุณหภูมิต่อ องค์ประกอบของน้ำมะนาวถนอม

จากผลการทดลองข้อ 4.4.2 ดังรูปที่ 30 และ 31 พบว่าที่ pH 2.2 และ 4.0 เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณวิตามินซีจะมีค่าลดลง เนื่องจากวิตามินซีไม่เสถียรหรือเกิดการสลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูง จัดเป็นสารพวกสลายได้ง่ายด้วยความร้อน ส่วนปริมาณกรดซิตริกมีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย หรือมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิ คือมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง

น้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูปจะมีปริมาณวิตามินซีและกรดซิตริกต่ำกว่าน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านการลดความขม สาเหตุอาจเนื่องจากตัวพยุงที่ใช้ในการตรึงรูปเซลล์นี้เป็นสารพวกโพลิเมอร์ซึ่งอาจจะดูดซับสาร 2 ตัวนี้ไว้ ทำให้ปริมาณสารทั้ง 2 ตัวมีค่าลดลง ดังเช่น ผลงานของ Johnson และ Chandler (1982) พบว่าสารโพลิเมอร์สามารถดูดซับพวก titratable acid ได้ และในปี 1985 จึงใช้สารโพลิเมอร์ในการกำจัดปริมาณกรดในน้ำผลไม้ที่ไม่ต้องการรสเปรี้ยว

5.4.3 ผลของระยะเวลาในการพาสเจอร์ไรส์ต่อปริมาณลิโมนิน

ลิโมนินเปลี่ยนแปลงมาจากสารตั้งต้นที่ไม่มีรสขม คือลิโมโนเอท เอริง แลคโตน การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และเมื่อถูกความร้อนในระหว่างพาสเจอร์ไรส์ ดังนั้นจึงต้องนำน้ำมะนาวมาผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์เพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นที่ไม่มีรสขมไปเป็นลิโมนินก่อนนำมาผ่านกระบวนการลดความขม จากผลการทดลองข้อ 4.4.3 พบว่าปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวสดมีค่าประมาณ 5.2 ppm และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 12.2 ppm หลังจากผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลงานของ Tarig และคณะ (1974) ที่ได้ทดลองใน Valencia Orange ซึ่งพบว่าลิโมนินส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงมาจากสารตั้งต้นที่ไม่มีรสขมระหว่างการพาสเจอร์ไรส์ และจากผลงานวิจัยข้อ 4.4.3 พบว่าระยะเวลาในการพาสเจอร์ไรส์ 5 นาที สามารถทำให้สารตั้งต้นเปลี่ยนแปลงเป็นลิโมนินได้หมด

5.4.4 การลดความขมในน้ำมะนาวถนอมโดยจุลินทรีย์ตรึงรูป

ผลการทดลองข้อ 4.4.4 แสดงได้ดังตารางที่ 16 พบว่า น้ำมะนาวสดมีปริมาณลิโมนินประมาณ 5.29 ppm หลังจากผ่านการพาสเจอร์ไรส์ที่ 80 องศาเซลเซียส 5 นาที

ปริมาณลิโมนินจะเพิ่มขึ้นเป็น 12.21 ppm เนื่องจากลิโมนินเปลี่ยนแปลงมาจากสารตั้งต้นที่ไม่มีรสขม และอัตราการเปลี่ยนแปลงนี้จะรวดเร็วขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Tarig และคณะ, 1974) ปริมาณวิตามินซีจะมีค่าลดลงเหลือ 28.95 มก./100 มล. ส่วนปริมาณกรดซิตริก, pH และ ^{o}Brix เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังจากนำน้ำมะนาวปรับ pH = 4 แล้วสมบัติต่าง เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเช่นกัน หลังจากผ่านการทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูปแล้ว ปริมาณลิโมนินจะลดลงเหลือเพียง 7.07 ppm เนื่องจากเอนไซม์ลิโมโนเอท ดีไฮโดรจี้เนส ภายในเซลล์เปลี่ยนลิโมนินเป็นสารอื่นที่เสถียรและไม่มีรสขม (Hasegawa และ Bennett, 1983)

หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วพาสเจอร์ไรส์อีกครั้งที่สภาวะเดิม สมบัติต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ส่วนน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านการทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูปแล้วพาสเจอร์ไรส์ครั้งที่ 2 พบว่ามีปริมาณลิโมนิน วิตามินซี กรดซิตริก pH และ ^{o}Brix เป็น 12.29 ppm, 25.86 มก./100 มล., 7.95%, 4.01 และ 17.4 ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขมมีปริมาณลิโมนินต่ำกว่าน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขม และปริมาณวิตามินซีและกรดซิตริกมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย เหตุผลก็เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วในข้อ 5.4.2 ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการเติมกรดแอสคอบิคและกรดซิตริกลงไปภายหลังผ่านกระบวนการลดความขม แต่อาจมีประโยชน์สำหรับน้ำผลไม้บางชนิดที่ไม่ต้องการรสเปรี้ยว เช่น น้ำเกรปฟรุ๊ต และน้ำผลไม้ที่ต้องการลดปริมาณกรดลง เช่น ผลงานของ Johnson และ Chandler (1985) ใช้โพลิเมอร์ในการกำจัดปริมาณกรดในน้ำผลไม้

5.4.5 การศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำมะนาวถนอม

จากผลการทดสอบสมบัติทางประสาทสัมผัสของน้ำมะนาวทั้ง 2 ตัวอย่างที่มีอายุการเก็บครบ 2 เดือน ในข้อ 4.4.5 พบว่า สมบัติด้านกลิ่นมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนสมบัติด้านรสและการยอมรับรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 คือ น้ำมะนาวที่ผ่านการลดความขม มีค่าคะแนนเฉลี่ยของสมบัติทั้ง 2 อย่างสูงกว่าได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบอยู่ในระดับยอมรับเล็กน้อยถึงยอมรับปานกลาง มีรสขมหรือรสแปลกปลอมเพียงเล็กน้อย ส่วนน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านการลดความขมไม่ได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบ และคะแนนเฉลี่ยของสมบัติด้านรสอยู่ในระดับว่ามีรสขมมาก

และได้ทำการทดสอบอีกครั้งหลังจากอายุการเก็บครบ 3.5 เดือน พบว่าผลการทดสอบที่ได้ไม่แตกต่างจากเมื่ออายุการเก็บครบ 2 เดือน

ฉะนั้นงานวิจัยนี้จึงบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ คือ สามารถลดปริมาณลิโมนินหรือรสขมในน้ำมะนาวถนอมได้ และได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบหลังจากเก็บน้ำมะนาวเป็นระยะเวลา 3.5 เดือน ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตน้ำมะนาวถนอมด้วยวิธีการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม เพื่อนำไปสู่การผลิตแบบต่อเนื่องสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5.4.6 การศึกษาผลของระยะเวลาที่เก็บต่อสมบัติของน้ำมะนาวถนอม

จากผลการทดลองข้อ 4.4.6 แสดงในรูปที่ 34, 35 และตารางที่ 18 พบว่าปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวที่ผ่านกระบวนการลดความขมมีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ส่วนน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านกระบวนการลดความขมปริมาณลิโมนินจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บ และมีค่าเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 17 ppm หลังจากเก็บครบ 4 เดือน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของสุภารัตน์ เรืองมณีไพฑูรย์ (พ.ศ. 2521) ส่วนน้ำมะนาวที่ผ่านการลดความขมมีค่าเพียง 7.4 ppm แม้ว่าจะมีปริมาณลิโมนินเหลือ 7.4 ppm ก็ไม่แสดงรสขมมาก ระดับความขมอยู่ในระดับมีรสขมเล็กน้อย และยังได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบ ดังผลการทดลองข้อ 4.4.5 นอกจากนี้รายงานของ Maier และคณะ (1980) ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Limonin threshold และเปอร์เซ็นต์ที่ผู้ทดสอบรับรู้รสได้ และยังยอมรับอยู่ดังนี้คือ Limonin threshold ต่ำสุดที่ผู้ทดสอบยังรับรู้รสได้เท่ากับ 0.5 ppm และค่า Limonin threshold ที่ 6 และ 10 ppm จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ที่ผู้ทดสอบรับรสได้ และยังยอมรับอยู่เท่ากับ 75 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวให้หมดไปหรือมีค่าเป็น 0 เพราะการลดปริมาณลิโมนินให้เหลือในระดับดังกล่าวต้องใช้ปริมาณจุลินทรีย์มาก และน้ำมะนาวต้องผ่านการทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตรึงรูปหลายครั้ง ซึ่งจะมีผลให้ปริมาณวิตามินซีและกรดซิตริกมีค่าลดลงมาก และอาจมีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำมะนาวถนอม และในแง่เศรษฐกิจจะเห็นได้ว่าการจะลดปริมาณลิโมนินในน้ำมะนาวให้มีค่าเป็น 0 นั้นต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงไม่จำเป็น

ต้องลดปริมาณลิโมนินจนมีค่าเป็น 0 เพราะปริมาณลิโมนินที่ 7.4 ppm นี้ น้ำมะนาวนี้ก็ยังได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบ

ส่วนปริมาณวิตามินซีในน้ำมะนาวทั้ง 2 ชนิด มีค่าลดลงตามระยะเวลาที่เก็บ เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของสุภารัตน์ เรืองมณีไพฑูรย์ (พ.ศ.2522) และจากการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในน้ำมะนาว พบว่าน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านการลดความขมจะมีปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลสูงกว่าน้ำมะนาวที่ผ่านการลดความขม จากผลงานวิจัยของ Tressler และ Joslyh (1954) ได้รายงานว่า วิตามินซีเป็นแฟคเตอร์ที่สำคัญในการทำให้เกิดสารประกอบที่มีสีในน้ำผลไม้ จากผลการทดลองข้อ 4.4.2 พบว่าน้ำมะนาวที่ผ่านการลดความขมมีปริมาณวิตามินซีต่ำกว่าน้ำมะนาวที่ไม่ผ่านการลดความขม จากเหตุผลนี้จึงอาจเป็นสาเหตุให้น้ำมะนาวที่ผ่านการลดความขมมีการเกิดสารประกอบที่มีสีต่ำกว่า ส่วนปริมาณกรดซิตริก, pH และ ^{o}Brix มีค่าเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย หรือไม่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่เก็บ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Heikal และคณะ (1964, 1967) ที่ทดลองในน้ำเลมอน ซึ่งพบว่าปริมาณกรดซิตริก, pH มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บ

5.5 การศึกษาประสิทธิภาพการนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาใช้ใหม่

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาใช้ซ้ำในข้อ 4.5 พบว่าประสิทธิภาพการใช้ซ้ำมีค่าไม่สูงมาก อาจเนื่องจากระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาค่อนข้างนาน (2.5 ชั่วโมง) เอนไซม์ภายในเซลล์อาจไม่เสถียรที่สภาวะนั้น อาจแก้ไขโดยนำจุลินทรีย์ตรึงรูปมาบรรจุลงคอลัมน์แล้วให้น้ำมะนาวหรือสับสเตรทมีการหมุนเวียนผ่านคอลัมน์ จุลินทรีย์ตรึงรูปไม่ต้องแช่อยู่ในน้ำมะนาวตลอดเวลา อาจทำให้ประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ซ้ำมีค่าสูงขึ้น หรือเม็ดเจลอาจไม่เสถียรในสภาวะที่เป็นกรด เนื่องจากต้องแช่ในสภาวะที่เป็นกรดเป็นระยะเวลานาน ทำให้เม็ดเจลเสียรูปและอาจสูญเสียประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ทำให้มีการสูญเสียเซลล์บางส่วนระหว่างการล้างจุลินทรีย์ตรึงรูปด้วยสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจแก้ไขโดยการหาตัวพยุงที่เหมาะสมที่สามารถทนสภาวะกรดได้ในการตรึงรูปเซลล์จุลินทรีย์ หรืออาจใช้สารที่ช่วยเพิ่มความแข็งของเม็ดเจลในการเตรียมจุลินทรีย์ตรึงรูป ดังผลงานของ Nishida และคณะ (1979) และ Tosa และคณะ (1974) ดังได้กล่าวแล้วในข้อ 5.3.2.2