บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

2.1.1.1 กล้องจุลทรรศน์ (microscopy) รุ่น Alphaphot-2 YS2 บริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.2 เครื่องกำเนิดคลื่นอัลทราโซนิก (sonicator) รุ่น Ultrasonic Cleaner D 200 ยี่ห้อ Delta ของบริษัท D.S.C. group ประเทศไต้หวัน

2.1.1.3 เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries , Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.1.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (rotary incubator shaker) รุ่น G-25 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. , Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.1.5 เครื่องชั่งแบบละเอียด (electronic balance) รุ่น FX- 180 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.6 เครื่องชั่งแบบหยาบ (electronic balance) รุ่น FX- 3000 ของบริษัท A&D ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.8 เครื่องเพอริสตอลติกปั๊ม รุ่น 7554-20 ยี่ห้อ Masterflex ของบริษัท Cole Parmer Instrument Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา และรุ่น CH2A#459 ของบริษัท Amicon Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.1.10 เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) รุ่น LC-8A ชุดควบคุมระบบ SLC-8A และเครื่องวิเคราะห์ผล C-R4A Chromatopac ของบริษัท Shimadzu Corporation ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.11 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น MIR 152 ของบริษัท Sanyo Electronic Co. , Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.12 ตู้ปลอดเชื้อ(larminar flow hood) รุ่น NK System Clean Bench ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.13 ตู้อบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (hot air oven) รุ่น 94788 ของบริษัท Contherm Scientific Ltd. ประเทศนิวซีแลนด์

2.1.1.14 ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น MR-6650 ของบริษัท Hitachi , Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.15 ตู้อบแห้ง (oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

2.1.1.16 ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบกังหัน 6 ใบ (6-blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องอัดอากาศ (air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.17 มาตรวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น F-13 ของประเทศญี่ปุ่น และมาตรวัดความเป็นกรดเบส (pH combination electrode) สำหรับถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น D-26 ของบริษัท TOA Electronics , Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.1.1.18 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น KT-30 SD ของบริษัท ALP Co. , Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

รายชื่อสารเคมีและบริษัทผู้ผลิตหรือจำหน่ายที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวซึ่งจะใช้ในเกรดการค้า แต่การวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาวและน้ำตาลที่เหลือนั้นใช้สารเคมีในเกรดการวิเคราะห์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิตหรือจำหน่าย	
2.1.2.1 กรดซัลฟูริก	Merck	ประเทศเยอรมัน
2.1.2.2 กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	Sigma	ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.1.2.3 กรดไฮโดรคลอริก	Merck	ประเทศเยอรมัน
2.1.2.4 กรดฟอสฟอริก	Carlo Erba	ประเทศอิตาลี
2.1.2.5 แคลเซียมคาร์บอเนต	ศิลาทิพย์	ประเทศไทย
2.1.2.6 ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
2.1.2.7 เดรกซ์โทรส(กลูโคส)	Commercial grade	ประเทศไทย
2.1.2.8 โปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
2.1.2.9 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
2.1.2.10 แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมัน
2.1.2.11 แอมโมเนียมคลอไรด์	บริษัทรวมเคมี	ประเทศญี่ปุ่น
2.1.2.12 สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
2.1.2.13 สารสกัดจากมอลต์	Food Ingredient Specialities	ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิตหรือจำหน่าย	
2.1.2.14 เปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.1.2.15 เมทานอล	J.T.BAKER	ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.1.2.16 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Carlo Erba	ประเทศอิตาลี
2.1.2.17 โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck	ประเทศเยอรมัน
2.1.2.18 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	Merck	ประเทศเยอรมัน
2.1.2.19 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Fluka	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
2.1.2.20 วุ้นผง	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ประเทศไทย
2.1.2.21 เอทานอล 95%	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
2.1.2.22 กรดมะนาวชนิดปราศจากน้ำ	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.1.2.23 กรดไอโซซิตริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
2.1.2.24 กรดทาร์ทาริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา

หมายเหตุ IBGE = สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 ซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกแล้วจากการวิจัยของ เรวดี เลิศไตรรักษ์ (2535) และได้ทำการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537)

2.3 การเก็บรักษาเชื้อและการเลี้ยงเชื้อ

2.3.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) บนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

2.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

2.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก1.1) นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น โดยเติมน้ำที่กำจัดไอออน และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

2.3.2.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.2.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.5 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเตรียมได้ตามภาคผนวก ก2.1 นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที นอกจากระบุเป็นอย่างอื่น

2.4 วิธีวิเคราะห์

2.4.1 ค่าความเป็นกรดเบส

วัดโดยใช้มาตรวัดความเป็นกรดเบส (pH meter)

2.4.2 การละลายเกลือแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมัก (ดัดแปลงจากวิธีของ Nakanishi และคณะ, 1972)

ก่อนการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว และติดตามการเจริญของเชื้อจะต้องละลายเกลือแคลเซียมซิเทรตที่เกิดขึ้น โดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้อยู่ในช่วง 1.6-1.8 จากนั้นจึงปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว

2.4.3 วัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมักที่ได้จากข้อ 2.4.2 ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman GF/C ที่ทราบน้ำหนักแห้งแน่นอน โดยใช้เครื่องกรองอย่างละเอียด (Millipore filter) และเครื่องสูบสุญญากาศ ล้างเซลล์ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 30 มิลลิลิตร นำกระดาษกรองที่มีเซลล์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด หักน้ำหนักกระดาษกรองออก จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ออกแล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาว กรดไอโซซิตริก และน้ำตาลที่เหลือต่อไป

2.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกในน้ำหมัก โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) (สมศักดิ์ นาคซื่อตรง, 2537)

ปิเปตน้ำหมักที่ผ่านการกรองจากข้อ 2.4.3 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายตัวพาปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร แล้วเติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท ฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC โดยมีภาวะดังนี้

คอลัมน์	:	Selectosil 5 C18 ขนาด (I.D.) 4.6 มิลลิลิตร ยาว 25 เซนติเมตร
สารละลายตัวพา	:	ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$(NH_4)_2HPO_4$] 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วอย่างดี ปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก
สารมาตรฐานเปรียบเทียบ	:	กรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจากไอออน
อุณหภูมิที่ใช้	:	40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	:	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	:	คลื่นอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

โดยใช้ภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดมะนาวประมาณ 6.3 นาที และกรดไอโซซิตริกประมาณ 4.4 นาที คำนวณหาปริมาณกรดมะนาว และกรดไอโซซิตริก จากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-5.0 กรัมต่อลิตรและกราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดมะนาวหรือกรดไอโซซิตริก กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค1 และภาคผนวก ค2)

2.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bernfeld, 1955)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดโนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข1.1) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 2.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค3) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

2.5 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของแคลเซียมซิเทรต, ยีสต์และ supernatant ของน้ำหมัก

2.5.1 การศึกษาความหนาแน่นของแคลเซียมซิเทรต, ยีสต์และ supernatant ของน้ำหมัก (Shugar และ คณะ)

2.5.1.1 การศึกษาความหนาแน่นของแคลเซียมซิเทรตและยีสต์

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ขวด Pyknometer บันทึกน้ำหนัก ค่อยๆเติมน้ำที่กำจัดไอออนจนเต็มขวดแล้วปิดฝาไล่อากาศ เช็ดขวด Pyknometer ให้แห้ง นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนัก นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความหนาแน่น (ภาคผนวก ง1)

2.5.1.2 การศึกษาความหนาแน่นของ supernatant ของน้ำหมัก

นำ supernatant ของน้ำหมักใส่ขวด Pyknometer จนเต็มขวดแล้วปิดฝาไล่อากาศ เช็ดขวด Pyknometer ให้แห้ง นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งบันทึกน้ำหนัก นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความหนาแน่น (ภาคผนวก ง2)

2.5.2 การศึกษาขนาดของแคลเซียมซิเทรตและยีสต์

เปลี่ยนเลนส์ตาชนิดที่มี Ocular micrometer ลงไปแทนที่เลนส์ตาเดิมของกล้องจุลทรรศน์ วาง stage micrometer บนแท่นกล้องเลื่อนให้ขีดแบ่งบน stage micrometer อยู่ตรงกลาง ปรับหัวเลนส์กำลังขยายที่ต้องการ เลื่อน stage micrometerให้ซ้อนกับ Ocular micrometer พอดี นับช่องของ Ocular micrometer เปรียบเทียบกับ stage micrometer นำไปคำนวณหาว่า 1 ช่องของ Ocular micrometer มีค่าเท่ากับกี่ไมโครเมตร บันทึกผลการคำนวณ แล้วนำ stage micrometer ออก เอาตัวอย่างที่เตรียมไว้แล้วบน สไลด์มาวางบนแท่นของกล้องจุลทรรศน์แทน ปรับภาพและอ่านค่าด้วย Ocular micrometer บันทึกค่าที่อ่านได้ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาขนาดของตัวอย่าง

2.5.3 การศึกษาความหนืดของน้ำหมัก

นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตกรดมะนาว หาความหนืดด้วยเครื่อง Portable viscotester รุ่น VT-04 ใช้ rotor เบอร์ 1 ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกค่าที่อ่านได้ หน่วยเป็นกิโลกรัมต่อเมตรต่อวินาที

2.6 การแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรต โดยใช้ คอลัมน์

2.6.1 การแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรต โดยใช้คอลัมน์แบบสั้น (ภาคผนวก จ1)

เติมน้ำที่กำจัดไอออน 600 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำหมัก 400 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วป้อนเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 56 มิลลิลิตรต่อนาที และไหลออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 28 มิลลิลิตรต่อนาทีโดยภายในกรวยมีน้ำที่กำจัดไอออน 1,000 มิลลิลิตร เมื่อป้อนน้ำหมักหมดแล้วจึงป้อนน้ำที่กำจัดไอออน 1,000 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างจากทางออกด้านบน, ด้านล่างและภายในกรวยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที, 15 นาที แล้วแยกส่วนของแข็งที่ตกตะกอนกับส่วน suspension นำไปวิเคราะห์หาเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองที่ 2.4.3 และปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองที่ 2.4.4 ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนจากการใช้น้ำที่กำจัดไอออนเป็นสารละลายน้ำตาลซูโครส 30 บริกส์และสารละลายน้ำตาลซูโครส 35 บริกส์

2.6.2 การแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรต โดยใช้ คอลัมน์แบบยาว (ภาคผนวก จ2)

เติมสารละลายน้ำตาลซูโครส 25 บริกส์ 1,000 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำหมัก 500 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วป้อนเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 56 มิลลิลิตรต่อนาที และไหลออกจากคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 28 มิลลิลิตรต่อนาทีโดยภายในกรวยมีสารละลายน้ำตาลซูโครส 25 บริกส์ 2,500 มิลลิลิตร เมื่อป้อนน้ำหมักหมดแล้วจึงป้อนสารละลายน้ำตาลซูโครส 25 บริกส์ 1,500 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างจากทางออกด้านบน, ด้านล่างและภายในกรวยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกส่วนของแข็งที่ตกตะกอนกับส่วน suspension นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองที่ 2.4.3 และปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองที่ 2.4.4 ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนจากการใช้สารละลายน้ำตาลซูโครส 25 บริกส์ เป็นสารละลายน้ำตาลซูโครส 30 บริกส์และ สารละลายน้ำตาลซูโครส 35 บริกส์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรตโดยการปั่นเหวี่ยง

2.7.1 การศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์จากตะกอนแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 โดยการปั่นเหวี่ยง ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.7.1.1 การศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรตโดยการปั่นเหวี่ยง ซึ่งปรับความหนาแน่นของน้ำหมักด้วยสารละลายน้ำตาลซูโครส 25, 30 และ 35 บริกส์

เติมสารละลายน้ำตาลซูโครส 25 บริกส์ 2,000 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำหมัก 1,000 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 2,000 3,000 4,000 และ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของแข็งที่ตกตะกอนกับส่วน suspension นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองที่ 2.4.3 และปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองที่ 2.4.4 ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนจากการใช้สารละลายน้ำตาลซูโครส 25 บริกส์ เป็นสารละลายน้ำตาลซูโครส 30 บริกส์และ สารละลายน้ำตาลซูโครส 35 บริกส์ตามลำดับ

2.7.1.2 การศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนแคลเซียมซิเทรตโดยการปั่นเหวี่ยง ซึ่งปรับความหนาแน่นของน้ำหมักด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคส 25, 30 และ 35 บริกส์

เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคส 25 บริกส์ 2,000 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำหมัก 1,000 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 3,000 และ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของแข็งที่ ตกตะกอนกับส่วน suspension นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองที่ 2.4.3 และปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองที่ 2.4.4 ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนจากการใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคส 25 บริกส์ เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส 30 บริกส์และ สารละลายน้ำตาลกลูโคส 35 บริกส์ตามลำดับ

2.7.2 การศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์จากตะกอนแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมัก โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.7.2.1 การศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์จากตะกอนแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมักชั่วโมงที่ 72 โดยปรับความหนาแน่นด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคส 25, 30 และ 35 บริกส์

เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคส 25 บริกส์ 2,000 มิลลิลิตรลงในถังหมักที่มีน้ำหมัก 2.8 ลิตร กวนผสมด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที จนเข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 1,500 2,000 และ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของแข็งที่ตกตะกอนกับส่วน suspension นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองที่ 2.4.3 และปริมาณกรด

มะนาวตามวิธีการทดลองที่ 2.4.4 ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนจากการใช้สารละลาย น้ำตาลกลูโคส 25 บริกส์ เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส 30 บริกส์และ สารละลายน้ำตาลกลูโคส 35 บริกส์ตามลำดับ

2.7.2.2 การศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์จากตะกอนแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมักชั่วโมงที่ 96 และปรับความหนาแน่นด้วยสารละลายน้ำตาลกลูโคส 25, 30 และ 35 บริกส์

เติมสารละลายน้ำตาลกลูโคส 25 บริกส์ 2,000 มิลลิลิตรลงในถังหมักที่มีน้ำหมัก 2.8 ลิตร กวนผสมด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที จนเข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 1,500 2,000 และ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนของแข็งที่ตกตะกอนกับส่วน suspension นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีการทดลองที่ 2.4.3 และปริมาณกรดมะนาวตามวิธีการทดลองที่ 2.4.4 ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนจากการใช้สารละลาย น้ำตาลกลูโคส 25 บริกส์ เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส 30 บริกส์และ สารละลายน้ำตาลกลูโคส 35 บริกส์ตามลำดับ

2.7.3 การศึกษาการแยกเซลล์ยีสต์จากตะกอนแคลเซียมซิเทรตในน้ำหมักโดยเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสปรับความหนาแน่นของส่วนน้ำใสของน้ำหมัก (supernatant) เท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตร

นำน้ำหมักชั่วโมงที่ 48 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 5 นาที นำsupernatant ที่ปั่นได้ ไปหาค่าการหักเหแสงด้วย refractometer แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ จากกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ค4 และ ค5 จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสลงไปในถังหมักให้มีปริมาณน้ำตาล 1,030 กรัมต่อสารผสมรวม 4,600 มิลลิลิตร ซึ่งจะทำให้ supernatant มีความหนาแน่น 1.08 กรัมต่อมิลลิลิตร กวนผสมด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที 5 นาที จนเข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วน suspension และส่วนของแข็งที่ตกตะกอนออกจากกัน นำส่วน suspension กลับมาเวียนลงในถังหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยเติมสารละลายสารสกัดจากยีสต์, สารละลายแร่ธาตุ และสารละลายน้ำตาลกลูโคสปรับให้มีความเข้มข้นน้ำตาลประมาณ 220 กรัมต่อลิตร