บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

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

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

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

เครื่องจ่ายไฟฟ้า (power supply) รุ่น SC-10H ของบริษัท Thaipattana machtronics Co.,Ltd. ประเทศไทย

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

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

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

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

เครื่องวัดไฟฟ้า (multimeter) รุ่น 971A ของบริษัท Hewlett Packard ประเทศสหรัฐอเมริกา

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

ปั๊มไหลวนชนิดเพอริสตอลติก รุ่น SMP-23 ยี่ห้อ EYELA ประเทศญี่ปุ่น

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

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

ตู้อบแห้ง (oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300-5L ใบพัดแบบกังหัน 6 ใบ (6-blade turbine) เครื่องควบคุมภาวะ (bioprocess controller) รุ่น MDIAC-SS ของบริษัท Marubishi ประเทศญี่ปุ่น เครื่อง

อัดอากาศ (air compressor) ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (circulation type hardy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas Kagaka ประเทศญี่ปุ่น

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

โมดูล (module) ประกอบด้วย เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนบวก (cation exchange membrane) เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนลบ (anion exchange membrane)ที่มีพื้นที่ใช้งาน 35 ตารางเซนติเมตร ของบริษัท Asahi ประเทศญี่ปุ่น ต่ออนุกรมกันอยู่ระหว่างขั้วลบที่เป็นโลหะสแตนเลส และขั้วบวกที่เป็นกราไฟต์ซึ่งระหว่างเยื่อแผ่นกับขั้วไฟฟ้าและเยื่อแผ่นกับเยื่อแผ่นถูกกั้นด้วย spacer ที่เป็นแผ่นตะแกรงพลาสติก และปะเก็นซิลิโคนซึ่งมีช่องสำหรับป้อนสารละลาย

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

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น G-86 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ	เกรด
กรดซัลฟูริก	Merck	เยอรมัน	Lab
กรดทาร์ทาริก	SIGMA	สหรัฐอเมริกา	Analytical
กรดฟอสฟอริก	Carlo Erba	อิตาลี	Analytical
กรดมะนาว	วิทยาศรม	ไทย	Commercial
กรดมะนาวชนิดปราศจากน้ำ	SIGMA	สหรัฐอเมริกา	Analytical
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	เยอรมัน	lab
เดรกซ์โทรส(กลูโคส)	สงวนชัยเคมี	ไทย	Commercial
ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	เยอรมัน	Lab
แบเรี่ยมคลอไรด์	MERCK	เยอรมัน	Lab
เปปโตน	DIFCO	สหรัฐอเมริกา	Lab
โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	เยอรมัน	Lab
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	FLUKA	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	เยอรมัน	Lab

วุ้นผง	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย	Commercial
สารสกัดจากมอลต์	Food Ingredient Specialities	สวิสเซอร์แลนด์	Lab
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ไทย	Lab
เอทานอล 95%	กรมสรรพสามิต	ไทย	Commercial
แอมโมเนียมคลอไรด์	บริษัทรวมเคมี	ญี่ปุ่น	Lab

หมายเหตุ IBGE = สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาว

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

2.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เขี่ยเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แล้วลาก (streak) บนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก.1.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เก็บเชื้อในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

2.2.1.2 การเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงเชื้อยีสต์บนอาหารแข็งลาดเอียง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.1.1) โดยเติมน้ำที่กำจัดไอออนและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2.5 มิลลิลิตรต่อหลอดอาหารแข็งลาดเอียง ปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ประมาณ 0.05 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (rotary shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

2.2.1.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 2.2..1.2 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร ปริมาณร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวเตรียมได้ตามภาคผนวก ก.2 ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 5 โดยหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

2.2.2 การกำจัดเซลล์และสารแขวนลอยต่างๆ

แยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแยกส่วนน้ำใสไปกรองด้วยกระบวนการไมโครฟิลเตรชันแบบ dead-end เพื่อกำจัดอนุภาคขนาดเล็ก หรือสารแขวนลอยต่างๆ

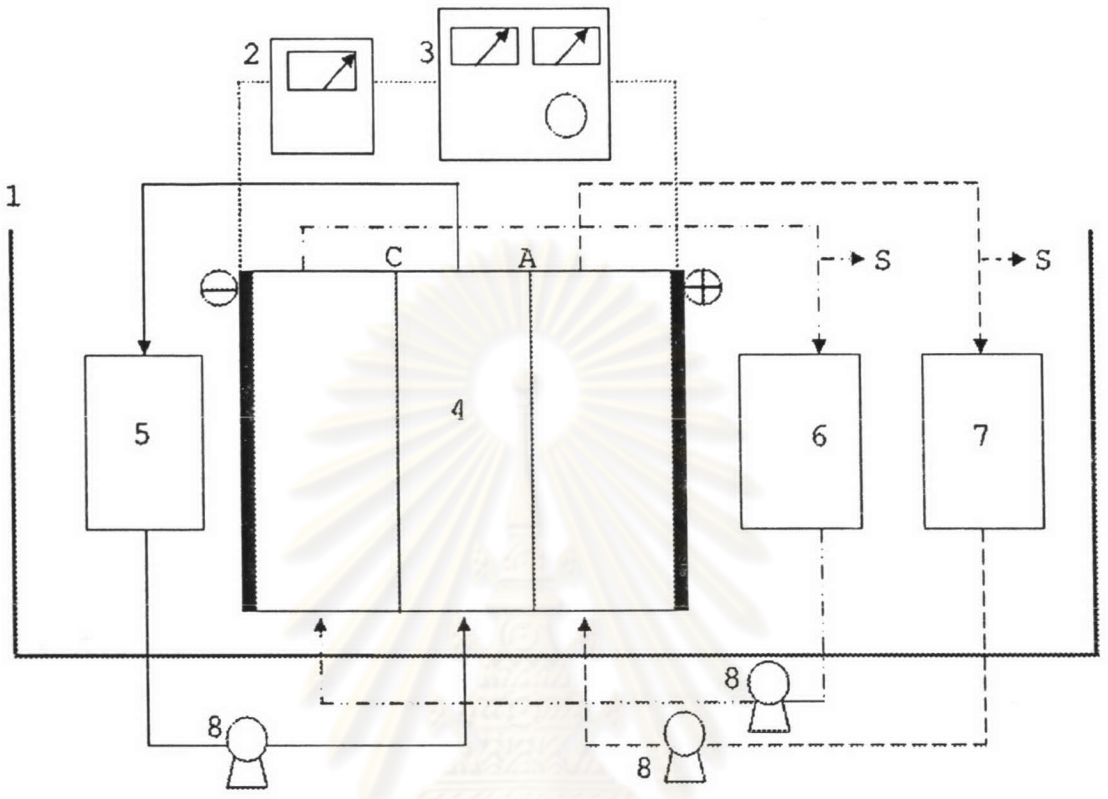
2.2.3 การทดลองแยกกรดมะนาวออกจากน้ำหมักด้วยอิเล็กโทรไดแอลิซิสโดยเวียนแบบกะ

ระบบของกระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิส ประกอบด้วย โมดูลซึ่งมีเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนบวก และเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนลบ ต่ออนุกรมกันอยู่ระหว่างขั้วลบและขั้วบวก โดยมีแหล่งกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงสร้างความต่างศักย์ไฟฟ้าให้กับขั้วไฟฟ้า เพื่อเป็นแรงขับดันในการแยกไอออนออกจากสารละลายซึ่งไอออนลบหรือซิเตรทไอออนจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนลบเข้าหาขั้วบวก ในทางตรงข้ามไอออนบวกหรือโซเดียมไอออนจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนบวกเข้าหาขั้วลบ ทำให้ช่องของสารละลายกรดซิตริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ส่วนสารละลายในช่องของน้ำหมักจะมีความเข้มข้นของโซเดียมซิเตรทต่ำลง การไหลวนของสารละลายเหล่านี้จะใช้ปั๊มไหลวนชนิดเพอริสตอลติกเป็นตัวป้อนสารจากภาชนะกักเก็บเข้าสู่โมดูลแล้วกลับไปสู่ภาชนะกักเก็บอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสารละลายจะป้อนเข้าทางด้านล่างของโมดูลแล้วออกสู่ด้านบนเพื่อไล่อากาศออกจากตัวโมดูล และมีอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งระบบของกระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิสแสดงดังรูปที่ 2.1 โดยแต่ละการทดลองจะทำการบันทึกค่ากระแสไฟฟ้าโดยอ่านจากเครื่องวัดไฟฟ้า และเก็บตัวอย่างของสารละลายกรดซิตริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีและการไทเทรต ตามลำดับ ซึ่งการบันทึกค่าและการเก็บตัวอย่างจะทำทุก 15 นาที เป็นเวลา 120 นาที ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

2.2.3.1 ศึกษาปัจจัยทางเคมีที่เหมาะสมต่อการแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยอิเล็กโทรไดแอลิซิส โดยแปรผันความเข้มข้นของสารป้อนและค่าความเป็นกรดด่าง

2.2.3.2 ศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยอิเล็กโทรไดแอลิซิส โดยแปรผันความต่างศักย์ไฟฟ้าของสนามไฟฟ้าที่ใช้ อัตราการไหลของสารละลาย และอุณหภูมิของระบบ

การศึกษาปัจจัยทางเคมีและปัจจัยทางกายภาพ สรุปเป็นแผนการทดลองดังตารางที่ 2.1 และ 2.2 ตามลำดับ



1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องวัดไฟฟ้า
3. เครื่องจ่ายไฟฟ้า
4. โมดูล
5. ภาชนะกักเก็บน้ำหมักโซเดียมซิเตรท
6. ภาชนะกักเก็บสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
7. ภาชนะกักเก็บสารละลายกรดซิตริก
8. ปั๊มไหลวนชนิดเพอริสตอลติก

C เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนบวก
A เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนลบ

S เก็บตัวอย่าง

รูปที่ 2.1 กระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 สรุปแผนการทดลองการศึกษาปัจจัยทางเคมีต่อการแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยอิเล็กโทรไดแอลิซิส

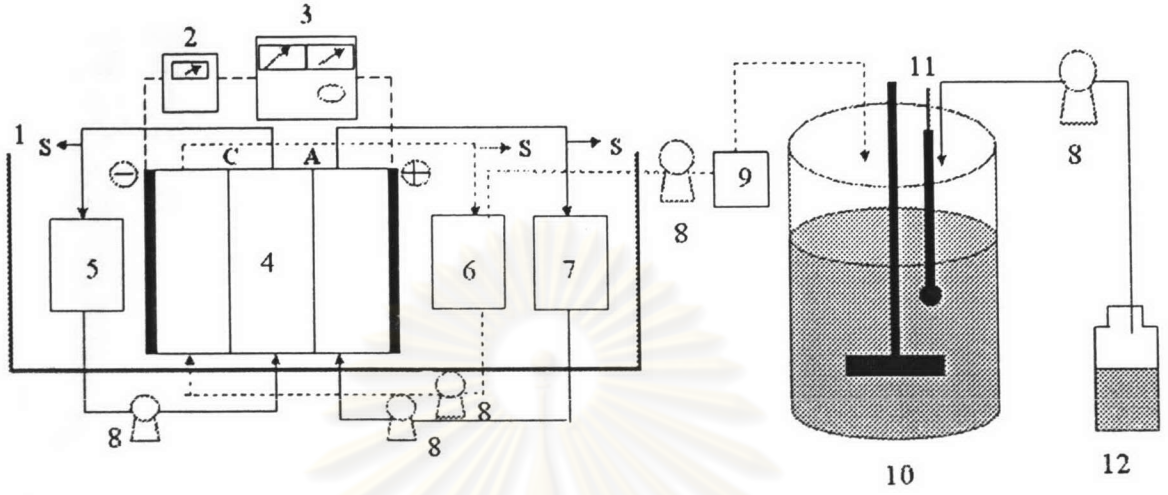
การทดลองที่ (ตารางในภาคผนวก จ.)	ภาวะการทดลอง			ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลาย				หมายเหตุ
	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/ชั่วโมง)	อุณหภูมิของระบบ (องศาเซลเซียส)	ศักย์ไฟฟ้า (โวลต์)	สารละลายกรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักโซเดียมซิเตรท (กรัม/ลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก	สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์แมล)	
3.1 (จ.1)	480	30	5	0	80	5	0.02	
3.1 (จ.2)	480	30	5	40	80	5	0.02	ศึกษาผลของความแตกต่าง
3.1 (จ.3)	480	30	5	80	80	5	0.02	ระหว่างความเข้มข้นกรด
3.1 (จ.4)	480	30	5	120	80	5	0.02	มะนาวและโซเดียมซิเตรท
3.1 (จ.5)	480	30	5	160	80	5	0.02	
3.2 (จ.6)	480	30	5	5	10	5	0.02	
3.2 (จ.7)	480	30	5	15	30	5	0.02	ศึกษาผลของความเข้มข้น
3.2 (จ.8)	480	30	5	25	50	5	0.02	ของสารป้อนด้านกรด
3.2 (จ.9)	480	30	5	40	80	5	0.02	มะนาวและน้ำหมักโซเดียม-
3.2 (จ.10)	480	30	5	50	100	5	0.02	ซิเตรทในอัตราส่วน 1 ต่อ 2
3.3 (จ.11)	480	30	5	40	80	2.5	0.02	
3.3 (จ.12)	480	30	5	40	80	3	0.02	ศึกษาผลของความเป็นกรด
3.3 (จ.13)	480	30	5	40	80	5	0.02	ด่างของน้ำหมักโซเดียม-
3.3 (จ.14)	480	30	5	40	80	7	0.02	ซิเตรท

ตารางที่ 2.2 สรุปแผนการทดลองการศึกษาปัจจัยทางกายภาพต่อการแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยอิเล็กโทรไดแอลิซิส

การทดลองที่ (ตารางในภาคผนวก จ.)	ภาวะการทดลอง			ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลาย				หมายเหตุ
	อัตราการไหล (มิลลิลิตร/ชั่วโมง)	อุณหภูมิของระบบ (องศาเซลเซียส)	ศักย์ไฟฟ้า (โวลต์)	สารละลายกรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักโซเดียมซิเตรท (กรัม/ลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก	สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์แมล)	
3.4 (จ.15)	160	30	5	40	80	5	0.02	
3.4 (จ.16)	240	30	5	40	80	5	0.02	ศึกษาผลของอัตราไหล
3.4 (จ.17)	360	30	5	40	80	5	0.02	ของสารละลาย
3.4 (จ.18)	680	30	5	40	80	5	0.02	
3.4 (จ.19)	980	30	5	40	80	5	0.02	
3.5 (จ.20)	240	30	4	40	80	5	0.02	
3.5 (จ.21)	240	30	5	40	80	5	0.02	ศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้า
3.5 (จ.22)	240	30	6	40	80	5	0.02	
3.5 (จ.23)	240	30	7	40	80	5	0.02	
3.6 (จ.24)	240	25	5	40	80	5	0.02	
3.6 (จ.25)	240	30	5	40	80	5	0.02	ศึกษาผลของอุณหภูมิ
3.6 (จ.26)	240	40	5	40	80	5	0.02	ของระบบ

2.2.4 การทดลองแยกกรดมะนาวออกจากน้ำหมักด้วยอิเล็กโทรไดแอลิซิสควบคู่กับการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

การต่อระบบของกระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิสควบคู่กับถังหมักขนาด 5 ลิตร แสดงดังรูปที่ 2.2 ซึ่งก่อนการใช้โมดูลต้องมีการสเตอไรซ์ก่อน โดยป้อนเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้ไหลวนในตัวโมดูล ประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างตามด้วยน้ำปราศจากไอออนที่สเตอไรซ์แล้ว ในส่วนของการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวนั้นเริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่าแล้วจึงเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีในข้อ 2.2.1.2 และ 2.2.1.3 ตามลำดับ ซึ่งการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงก่อนการทำงานของระบบอิเล็กโทร - ไดแอลิซิส ทำโดยป้อนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เข้าไปในถังหมัก เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณกรดมะนาวทุก 6 ชั่งโมง โดยควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสที่ประมาณ 100 กรัมต่อลิตร และเมื่อปริมาณกรดมะนาวในถังหมักมีความเข้มข้นถึง 70 กรัมต่อลิตร จึงนำน้ำหมักออกบางส่วนเพื่อแยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง แล้วนำเซลล์ที่ตกตะกอนกลับเข้าไปในถังหมัก โดยส่วนน้ำใสหรือน้ำหมักที่ได้นั้นนำไปกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเพื่อกำจัดอนุภาคขนาดเล็กหรือสารแขวนลอยต่างๆ แล้วนำไปเข้ากระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิส เมื่อเริ่มกระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิสจึงควบคุมความเป็นกรดด่างของถังหมักด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่แยกได้จากอิเล็กโทรไดแอลิซิส ในการทดลองจะทำการบันทึกค่ากระแสไฟฟ้าโดยอ่านจากเครื่องวัดไฟฟ้า และเก็บตัวอย่างของสารละลายกรดมะนาว น้ำหมัก โซเดียมซิเตรท และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด - โครมาโทกราฟี และการไทเทรต ตามลำดับ ซึ่งการบันทึกค่าและการเก็บตัวอย่างจะทำทุก 6 ชั่งโมง โดยเมื่อความเข้มข้นของกรดซิตริกที่แยกได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น จึงดึงผลิตภัณฑ์ออกแล้วเติมน้ำขจัดไอออนที่สเตอไรซ์แล้วลงไปเพื่อให้ความเข้มข้นของกรดมะนาวคงที่ประมาณ 40 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำหมักโซเดียมซิเตรทในอิเล็กโทรไดแอลิซิสจะต่ำลงจึงมีการดึงสารละลายในช่องนี้ออกบางส่วนแล้วเติมกลับเข้าไปในถังหมัก และเติมน้ำหมักจากถังหมักที่ได้ผ่านขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงและไมโครฟิลเตรชันแล้วลงในภาชนะกักเก็บสารละลายโซเดียมซิเตรท โดยภาวะของกระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิส ที่ใช้นั้นได้จากผลการทดลองในการศึกษาปัจจัยทางเคมีและ กายภาพที่เหมาะสมต่อการแยกกรดมะนาวจากน้ำหมักด้วยอิเล็กโทรไดแอลิซิส



1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องวัดไฟฟ้า
3. เครื่องจ่ายไฟฟ้า
4. โมดูล
5. ภาชนะกักเก็บน้ำหมักโซเดียมซิเตรท
6. ภาชนะกักเก็บสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
7. ภาชนะกักเก็บสารละลายกรดซิตริก
8. ปั๊มไหลวนชนิดเพอริสตอลติก
9. เครื่องควบคุมระบบ
10. ถังหมักขนาด 5 ลิตร
11. มาตรวัดความเป็นกรดด่าง
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

C เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนบวก
A เยื่อแผ่นแลกเปลี่ยนไอออนลบ
S เก็บตัวอย่าง

รูปที่ 2.2 การต่อระบบของกระบวนการอิเล็กโทรไดแอลิซิสควบคู่กับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอแมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC) (สมศักดิ์ นาคซื่อตรง, 2537)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างกรดมะนาวปริมาตร 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 ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก
สารมาตรฐานเปรียบเทียบ	:	กรดทาร์ทาริกความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ในน้ำปราศจากไอออน
อุณหภูมิที่ใช้	:	40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	:	1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	:	สเปกโทรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร

โดยใช้ภาวะดังกล่าว เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของกรดมะนาวประมาณ 6.3 นาที คำนวณหาปริมาณกรดมะนาวจากกราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-5.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งกราฟมาตรฐานที่ใช้นั้นเป็นกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดมะนาวกับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดต่อสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (ภาคผนวก ค.1)

2.2.6 วิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์โดยการไทเทรต

เติมสารละลายแบเรี่ยมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ต้องการหาความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปไทเทรตกับสารละลายกรดซัลฟูริกโดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

2.2.7 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bernfeld, 1955)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดโนโตรซาลิไซลิก 1.0 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.2) ผสมให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลอง นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.0 – 2.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค2) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย