บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์การทดลอง

ตารางที่ 19: ชื่อเครื่องมือ รุ่น และ บริษัทผู้ผลิตที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
(1) การทดลองแบบแบทช์และคอลัมน์		
1.เครื่องเก็บปริมาตรย่อย (Fraction Collector)	LKB 2212 HeliRac	LKB BROMMA
2.ปั๊ม(Peristaltic Pump)	P-3	Pharmacia Fine Chemical AB
3.เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	PHM 82	Radiometer Copenhagen, Denmark.
4.เครื่องเขย่า (Vortex)	Vortex-Genie No.2	Scientific Industries Inc., U.S.A.
(2) การศึกษาปัจจัยของสิ่งปนเปื้อนโดยการหมักแอล-ไลซีน		
5.ถังหมักขนาด 5 ลิตรพร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบน์และชุดควบคุมสภาวะ	MD-300	Marubishi, Tokyo, Japan.
6.เครื่องปั่นเหวี่ยง (Laboratory centrifuge)	Z230	Berthold Hermle AG
7.เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-30SD	Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo,Japan.
8.Laminar Flow	VW-1300	Nippon Medical and Chemical

ตารางที่ 19 (ต่อ)

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
9.เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker)	G25&R25	New Brunswick Scientific Co.,Ltd.
10.ตู้อบแห้ง	ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย	
11.อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(Waterbath)		
- Waterbath	Techne	Techne (Cambridge) Limited
- Waterbath Shaker	G86&R86	New Brunswick Scientific Co.,Ltd.
(3) การทดลองการตกผลึกแอล-ไลซีน		
12.เครื่องวัดค่าการเบี่ยงเบนแสง (Polarimeter)	DIP-370	Japan Spectroscopic Co.,Ltd.
13.ตู้อบแห้งแบบสูญญากาศ (Vacuum Drying Oven)	ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย	
14.เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary Evaporator)	RE 52	Yamato, Japan.
(4) การวิเคราะห์แอล-ไลซีน		
15.เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง		
- Spectronic 21	Spectronic 21	Bousch & Lomb Incorporated
- UV-VIS-NIR Recording Spectrophotometer	UV-3100	Shimadzu, Japan.
16.Ion Chromatography	690	Metrohm Ltd. Switzerland.
17.Mass spectrometer	Trio-2000	Fisons Instruments

2.1.2 สารเคมี

ตารางที่ 20: รายชื่อสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1.Lewatit S 100 resin	Bayer Co., Ltd.
2.Ninhydrin Crystal (2,2-Dihydroxy-1,3-indanedione)	Sigma Chemical Co.,Ltd.
3.L-lysine.HCl Feed Grade	Ajinomoto Co.,Ltd
4.L-lysine Free Base	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
5.Acetic Acid Glacial 100%	Merck
6.Ammonia Solution 35%	BDH Limited
7.Hydrochloric Acid 37%	Merck
8.Phosphoric Acid 85%	Carlo Erba
9.Nitric Acid 65%	Merck

2.2 การทดลองในระบบแบทช์

2.2.1 การหาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของเรซินในการดูดซับและการชะแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์

2.2.1.1 ขั้นตอนการดูดซับ เตรียมสารละลายแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นมากเกินพอคือ 2.5 เปอร์เซนต์ ปรับ pH เริ่มต้น 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 35 เปอร์เซนต์ ใช้แคตไอออนเรซินชนิด strong:NH_4^+-type [ชื่อทางการค้า Lewatit S 100] (ภาคผนวกข้อที่ 1) 2 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มล. พร้อมกับสารละลายแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ 50 มล. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ^{o}ซ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ที่เวลาต่างๆ จนถึงจุดที่เรซินอิ่มตัวในการดูดซับ

2.2.1.2 ขั้นตอนการชะ จากตัวอย่างเรซินแลกเปลี่ยนแคตไอออนที่ดูดซับแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์จากข้อ 2.2.1.1 นำมาชะด้วย 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 25 มล.ที่เวลาต่างๆ เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์จนกว่าจะถึงจุดที่เรซินอิ่มตัวในการชะ

2.2.2 การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อขั้นตอนการดูดซับและการชะ

2.2.2.1 พิจารณาประสิทธิภาพเรซินเดิมเมื่อใช้ใหม่หลายรอบ เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.2.1.1 ยกเว้นความเข้มข้นของสารละลายแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์คือ 0.7 เปอร์เซนต์ทำการทดลอง 12 รอบโดยใช้เรซินเดิม

2.2.2.2 ปัจจัยของน้ำกลั่นล้างเรซินหลังขั้นตอนการชะและปริมาณที่ใช้ เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.2.2.1 เพิ่มขั้นตอนการล้างเรซินด้วยน้ำกลั่น 50 มล.ต่อรอบ และแปรปริมาณน้ำกลั่น 50 100 150 และ 200 มล. ตามลำดับ

2.2.2.3 ปัจจัยของปริมาณตัวชะ เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.2.1 แปรปริมาณของตัวชะคือ 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 25 50 และ 75 มล. ตามลำดับ ล้างเรซินหลังขั้นตอนการดูดซับและการชะของแต่ละรอบด้วยน้ำกลั่น

2.2.2.4 การหาค่าคงที่ Selectivity coefficient เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.2.2.2 ปริมาณน้ำกลั่นที่ใช้ล้างเรซินในแต่ละรอบ 200 มล. วัดความเข้มข้นของแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ที่ถูกดูดซับและชะออกจากเรซินในแต่ละรอบ นำมาคำนวณค่า Selectivity coefficient ทำการทดลอง 5 รอบ

การคำนวณ

$$K_{NH_4^+}^{lys} = \frac{R_{lys} \times C_{NH_4^+}}{R_{NH_4^+} \times C_{lys}}$$

R_{lys} = ปริมาณแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ที่ดูดซับบนเรซิน หน่วย โมลาร์ หรือ กรัมต่อลิตร

$R_{NH_4^+}$ = ปริมาณแอมโมเนียมไอออนที่ดูดซับบนเรซิน หน่วย โมลาร์

$C_{NH_4^+}, C_{lys}$ = ความเข้มข้นแอมโมเนียมไอออนและแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ในสารละลาย ตามลำดับ หน่วย โมลาร์

2.2.2.5 ศึกษาปัจจัย pH เริ่มต้นต่อการดูดซับของแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ที่เรซิน เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.2.2.1 เพิ่มตัวอย่างน้ำหมักแอล-ไลซีนที่ได้จากข้อ 3.6.4 (ข)

แปรค่า pH เริ่มต้น 0.5 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 และ 10.0 ตามลำดับ ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 30 นาที

2.3 การทดลองในระบบคอลัมน์

2.3.1 วัด Breakthrough curve

เตรียมสารละลายแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ที่เข้มข้นมากเกินพอคือ 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 45 มล. ปรับ pH เริ่มต้น 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 35 เปอร์เซนต์ ใช้แคตไอออนเรซินชนิด strong: NH^{+}_{4}-type 10 กรัมบรรจุลงในคอลัมน์ชนิดที่ควบคุมอุณหภูมิได้อุณหภูมิ 25 °ซ ต่อปั๊มกับสายยางที่ออกจากคอลัมน์ ใช้อัตราการไหล 60 มล.ต่อชม. เก็บเป็นลำดับส่วน 3 มล.ต่อหลอดทดลอง ในขั้นตอนการดูดซับหลังจากการผ่านสารละลายแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์หมดแล้ว ใช้น้ำกลั่นผ่านล้างเรซินจนแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ส่วนที่ไม่ถูกดูดซับถูกล้างออกจนหมด จากนั้นใช้ 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวชะเอาแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ที่ถูกดูดซับที่เรซิน เก็บลำดับส่วนในขั้นตอนการชะนี้จนกระทั่งวิเคราะห์แล้วไม่พบว่ามีแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์

2.3.2 ศึกษาปัจจัยของตัวชะ

2.3.2.1 เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1 ในขั้นตอนการชะลดปริมาณการใช้ 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ 2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกมาชะแทนในส่วนท้าย แปรปริมาตรของ 2 โมลาร์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์คือ 30 20 และ 10 มล. ตามลำดับ

2.3.2.2 เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1 ในขั้นตอนการชะลดปริมาณการใช้ 2 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก และดึง pH ของสารละลายส่วนที่ชะออกมาโดยการแทนที่ด้วยน้ำกลั่น แปรสัดส่วนของ 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ต่อ 2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก คือ 30:20 20:22 และ 10:32 มล.ตามลำดับ หลังจากการชะด้วย 2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก แล้วใช้น้ำกลั่นล้างต่อจนกระทั่งลำดับส่วนที่เก็บวิเคราะห์ไม่พบแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์

2.3.3 ศึกษาจุดอิ่มตัวของเรซินในขั้นตอนการดูดซับและการชะ

2.3.3.1 ขั้นตอนการดูดซับ เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.1 ในขั้นตอนการดูดซับจะ

ปิดปั๊ม เพื่อให้เรซินแช่อยู่ในสารละลายแอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์ เมื่อเก็บลำดับส่วนได้ 5 หลอดทดลอง แปรเวลาของการแช่ 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ

2.3.3.2 ขั้นตอนการชะ เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.2.2 ในขั้นตอนการชะจะปิดปั๊ม เพื่อให้เรซินแช่อยู่ใน 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เมื่อทำการเก็บลำดับส่วนได้ 2 หลอดทดลอง แปรเวลาของการแช่ 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ

2.3.3.3 ประสิทธิภาพของเรซินเดิมเมื่อใช้งานหลายรอบ เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.3.2 ใช้เวลาในการแช่เรซินใน 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 30 นาที ทำการทดลองในลักษณะเดิม 5 รอบ

2.3.4 ศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ

2.3.4.1 เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.3.2 ใช้เวลาในการแช่เรซินใน 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 30 นาที ทำการทดลองในลักษณะเช่นเดียวกันที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30 40 50 และ 60 ^{o}ซ

2.3.4.2 พิจารณาเวลาที่ถึงจุดอิ่มตัวของขั้นตอนการดูดซับและการชะที่อุณหภูมิต่างๆ เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.4.1 แล้วแบ่งการทดลองดังนี้

การแช่เรซินใน 2 โมลาร์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

- ไม่แช่ อุณหภูมิ 25 30 40 50 ^{o}ซ
- แช่นาน 15 นาที "
- แช่นาน 30 นาที "
- แช่นาน 45 นาที "
- แช่นาน 60 นาที "

2.3.5 ศึกษาปัจจัยของอัตราการไหล

เตรียมการทดลองเหมือนข้อ 2.3.4.1 ใช้อุณหภูมิของระบบ 30 ^{o}ซ แช่เรซินใน 2 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 30 นาที ยกเว้นในขั้นตอนการดูดซับ ทำการแปรอัตราการไหลโดยใช้หน่วย space velocity (ชม.$^{-1}$)

การคำนวณ

$$\text{space velocity(ชม.}^{-1}\text{)} = \frac{\text{อัตราการไหล (มล./ชม.)}}{\text{ความจุเรซินในคอลัมน์ (มล.)}}$$

แปรอัตราการไหลในขั้นตอนการดูดซับ คือ 2.0 3.0 4.0 และ 5.22 ชม.$^{-1}$ ตามลำดับ และในขั้นตอนการชะ คือ 5.22 7.0 8.0 9.0 และ 10.0 ชม.$^{-1}$ ตามลำดับ

2.3.6 ศึกษาปัจจัยของสิ่งปนเปื้อนโดยการใช้น้ำหมักแอล-ไลซีน

2.3.6.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21798

2.3.6.2 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

- เขี่ยเชื้อ *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21798 จากหลอดที่ไลโอฟิลไลซ์ไว้ลงอาหารเหลวสูตร PY (ภาคผนวกที่ 2.1) บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นทำการตรวจลักษณะเชื้อ

- ใช้ลูปแตะเชื้อที่เจริญในน้ำหมักลากบนอาหารแข็งเอียง(slant agar) สูตร PY ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ

2.3.6.3 การวัดกราฟการเจริญเติบโต (growth curve)

ใช้ลูปแตะเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งเอียง 1 ลูปเต็ม ใส่ลงอาหารเหลวปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ เก็บตัวอย่างมาวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ทุก 2 ชม.

2.3.6.4 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

ก. การเตรียมหัวเชื้อ(142)

ใช้ลูปแตะเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งเอียง 1 ลูปเต็มลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 2.2) ปริมาตร 20 มล. บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชม.

ข. การผลิตแอล-ไลซีนในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีในข้อ 2.3.6.4 (ก.) ให้ได้ปริมาตรรวม 350 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตแอล-ไลซีน(ภาคผนวกที่ 2.3) ปริมาตร 3150 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 ^{o}ซ อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ใช้ 10 โมลาร์ของโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์และ 5

รมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริกควบคุมค่า pH ที่ 7.0 และใช้ adecanol เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ครั้งละ 25 มล. ตั้งแต่เริ่มการหมักและทุก 4 ชม.จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 84 ชม.

2.4 การทดลองการตกผลึก

ใช้ผลึกแอล-ไลซีนรมรินไฮโดรคลอไรด์ละลายในน้ำกลั่นที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 1.0 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 9.0 และ 9.55 ปรับค่า pH โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 37 เปอร์เซนต์และสารละลายแอมโมเนีย 35 เปอร์เซนต์ ตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 32 ^{o}ซ เติมผลึกแอล-ไลซีนรมรินไฮโดรคลอไรด์พร้อมกับปรับค่า pH จนกระทั่งความเข้มข้นถึงจุดอิ่มตัว เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของแอล-ไลซีนรมรินไฮโดรคลอไรด์ สารละลายส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อตกผลึกแอล-ไลซีนรมรินไฮโดรคลอไรด์ จากนั้นนำมากรองแยกผลึกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 พร้อมกับใช้น้ำกลั่นฉีดล้าง นำผลึกที่ล้างสะอาดเข้าอบในตู้อบแห้งแบบสูญญากาศ(vacuum drying oven) ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}ซ ความดัน 40 มม.ปรอท จนกระทั่งผลึกแห้งสนิทดี นำผลึกที่ได้ไปวัดค่าสเปซิฟิกออพทิคัลโรเทชั่นด้วยเครื่องวัดค่าการเบี่ยงเบนแสง(Polarimeter)

2.5 วิธีการวิเคราะห์

2.5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณแอล-ไลซีนรมรินไฮโดรคลอไรด์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีวิเคราะห์นี้ทำตามวิธีของ Pomthong(1989)(104) ยกเว้นค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร นำตัวอย่างจากการทดลองมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในช่วงความเข้มข้น 0.25-0.30 กรัมต่อลิตร นำตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.5 มล.ทำให้มีสภาพเป็นกรดด้วยการเติมกรดอะซิติก 0.5 มล. จากนั้นเติมนินไฮดรินรีเอเจนท์(ninhydrin reagent)(ภาคผนวกที่ 3.1) 0.5 มล. ปิดฝาหลอดให้สนิท แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 ^{o}ซ เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นแล้วนำไปเติมกรดอะซิติก 2 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440

นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐาน 2 กราฟ โดยใช้แอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1-0.3 กรัมต่อลิตร ที่ค่า pH กรดกับด่าง ใช้สารละลาย pH 2.0 เป็นตัวแทนในสภาวะกรดใช้กับตัวอย่างในขั้นตอนการดูดซับและตัวอย่างจากการหมัก และสารละลาย pH 10.0 เป็นตัวแทนในสภาวะด่าง ใช้กับตัวอย่างในขั้นตอนการชะ ทั้ง 2 กราฟมาตรฐานใช้น้ำกลั่นที่ pH เดียวกันเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์กับค่าการดูดกลืนแสง

2.5.2 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์โดยวิธีไอออนโครมาโตกราฟี</u>

ตัวอย่างจากการทดลองนำมาเจือจางด้วยสารละลายกรดไนตริก 5 มิลลิโมลาร์ ในช่วงความเข้มข้น 50-100 พีพีเอ็ม นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วมากรองด้วยแผ่นเซลลูโลสอะซิเตทที่มีขนาดรู 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ด้วยเครื่องไอออนโครมาโตกราฟีสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 21 คำนวณปริมาณแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ในหน่วย พีพีเอ็ม

<u>ตารางที่</u> 20: สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์

สภาวะ	
คอลัมน์	แคตไอออน SUPER-SEP
สารละลายตัวพา (mobile phase)	กรดทาทาริก 5 มิลิโมลาร์
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	1.0 มล.ต่อนาที
ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity)	500 ไมโครซีเมนต่อซม.
Full scale	5 ไมโครซีเมนต่อซม.
ปริมาณที่ใช้วิเคราะห์	10 ไมโครลิตร
เวลาที่เหมาะสมของสารที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time)	4.7 นาที
ชนิดของขั้วไฟฟ้า	ขั้วลบ

2.5.3 การวิเคราะห์แอล-ไลซีนด้วยวิธีแมสสเปกโทรมิเตอร์โดยใส่ตัวอย่างผ่านเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟโดยเทคนิคแอดโมสเฟอริก เพรสเชอร์ เคมิคัลไอออไนเซชัน (LC/MS: Atmospheric Pressure Chemical Ionization Technique)

นำตัวอย่างผลึกแอล-ไลซีนจากการเตรียมที่ pH ต่างๆ และตัวอย่างพีค unknown จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีไอออนโครมาโตกราฟี มาวิเคราะห์ด้วยวิธีแมสสเปกโทรมิเตอร์โดยใส่ตัวอย่างผ่านเครื่องลิควิดโครมาโตกราฟที่มี LC/MS interface เป็นแบบแอดโมสเฟอริก เพรสเชอร์ เคมิคัล ไอออไนเซชัน สารละลายตัวพาคืออะซิโตไนไตร์ล 50 เปอร์เซนต์ในน้ำ อัตราการไหล 0.5 มล.ต่อนาทีและปริมาณที่ใช้วิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร

2.5.4 การวัดค่าสเปซิฟิกออพทิคัลโรเทชั่น

นำผลึกแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ที่ได้จากการเตรียมแต่ละ pH มาละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ในอัตราผลึกตัวอย่าง 2.5 กรัมต่อ 100 มล. จากนั้นเติมลงในเซลวัดที่มีความยาวเซลสำหรับวัดค่าสเปซิฟิกออพทิคัลโรเทชั่น 100 มม.ควบคุมอุณหภูมิเครื่องวัดค่าการเบี่ยงเบนแสงที่ 25 ^{o}ซ ขนาดของช่องที่แสงจากแหล่งแสงผ่าน(ϕ)= 8 เติมสารละลายผลึกตัวอย่างให้เต็มเซลที่ใช้วัดจะต้องไม่มีฟองอากาศ แต่ละตัวอย่างทำการวัดค่าสเปซิฟิกออพทิคัลโรเทชั่น 3 ครั้ง แล้วนำมาคิดค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการวัดผลึกแอล-ไลซีนโมโนไฮโดรคลอไรด์มาตรฐาน

2.5.5 การวัดปริมาณเซลจากค่าการดูดกลืนแสง

นำน้ำหมักที่เก็บมาแต่ละช่วงเวลามาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 580 นาโนเมตร(143) โดยใช้อาหารเหลวชนิดเดียวกับที่ศึกษาเป็นตัวเทียบ

2.5.6 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar)

วิธีวิเคราะห์นี้ทำตามวิธีของ Bernfeld(1955)(144)เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก(ภาคผนวกที่ 3.2) 1 มล. ลงในตัวอย่าง 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มก.ต่อมล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง