หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 อุปกรณ์

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Kubota 7500 ของบริษัท Kubota Corporation, Japan
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

   รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA

   รุ่น UV-invisible Spectrophotometer EDCH/1067 ของบริษัท Beckman, USA
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
4. ตู้อบ (Hot air oven) รุ่น ULM500 ของบริษัท Memmert, Germany
5. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) รุ่น MP220 ของบริษัท Mettler, Toledo, Switzerland
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath Shaker) รุ่น XY-80 ของบริษัท Labortechnik GMBH, Germany
7. เครื่องกวน (Stirrer) รุ่น RW 20 ZM.n. ของบริษัท Ika labortechnik, Germany
8. เครื่องและอุปกรณ์วัดโปรตีนด้วยวิธี Kjeldah method

   Distillation Unit Nitrogen analyzer รุ่น BUCHI 339

   Digestion Unit รุ่น BUCHI K 435

   Control Unit รุ่น BUCHI B 436

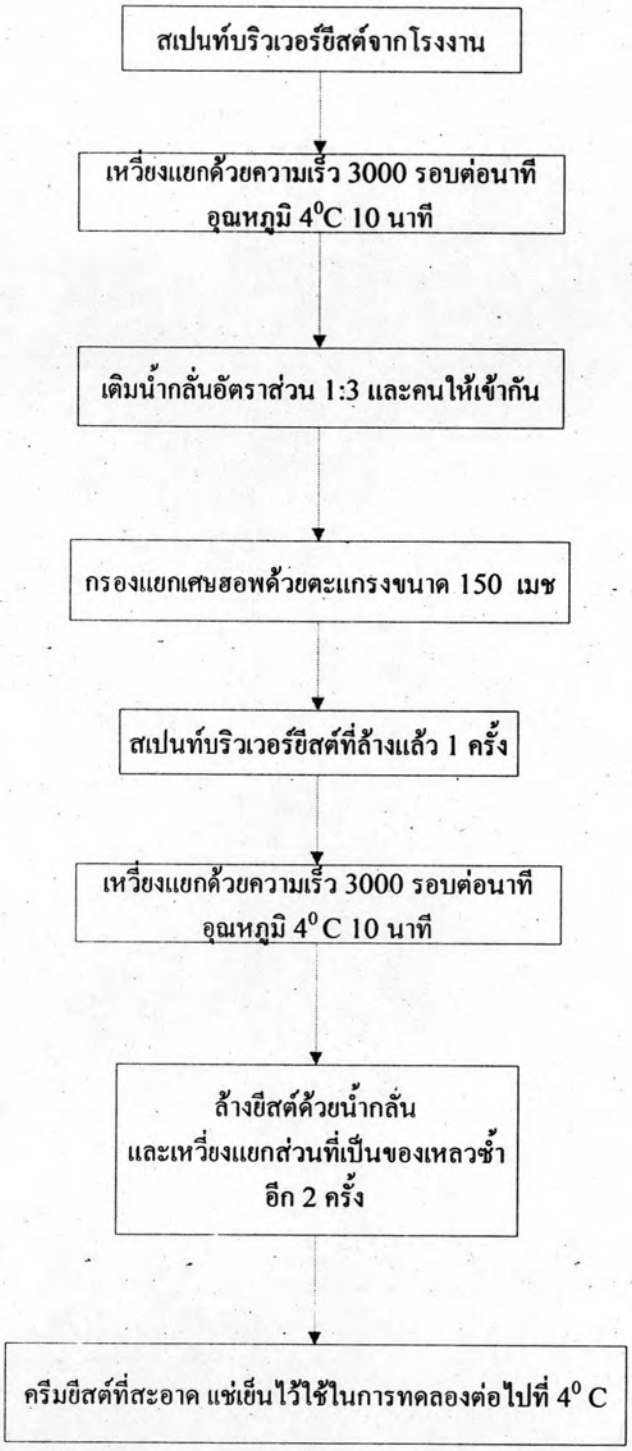
   Scrubber Unit รุ่น BUCHI B-414
9. อุปกรณ์ชุดการออโตไลซิส

4.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH laboratory, England
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
3. โซเดียมโปแตสเซียมตาร์เตรท ($KNaC_4H_4O_6 4H_2O$) ของบริษัท Ajax Chemical, Australia
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของบริษัท Ajax Chemical, Australia
5. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 5H_2O$) ของบริษัท Carlo erba, Italy
6. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA) ของบริษัท Fluka, Switzerland
7. กรดกลูตามิก (Glutamic acid) ของบริษัท Carlo erba, Italy
8. กลีเซอรัล (Glycerol) ของบริษัท Carlo erba, Italy
9. นินไฮดริน (Ninhydrin) ของบริษัท Ajax Chemical, Australia
10. กรดซิตริก (Citric acid) ของบริษัท Ajax Chemical, Australia
11. โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) ของบริษัท Ajax Chemical, Australia
12. แมงกานีสคลอไรด์ (Manganese Chloride) ของบริษัท Ajax Chemical, Australia
13. ไอโซออคเทน ($(CH_3)_3CCH_2CH(CH_3)_2$) ของบริษัท Carlo erba, Italy
14. กรดซัลฟิวริค (H_2SO_4) ของบริษัท Fisher Chemical
15. กรดบอริค (H_3BO_3) ของบริษัท MAY & Baker LTD., England
16. Serenium reagent mixture ของบริษัท Merck, Germany

4.3 เชื้อจุลินทรีย์

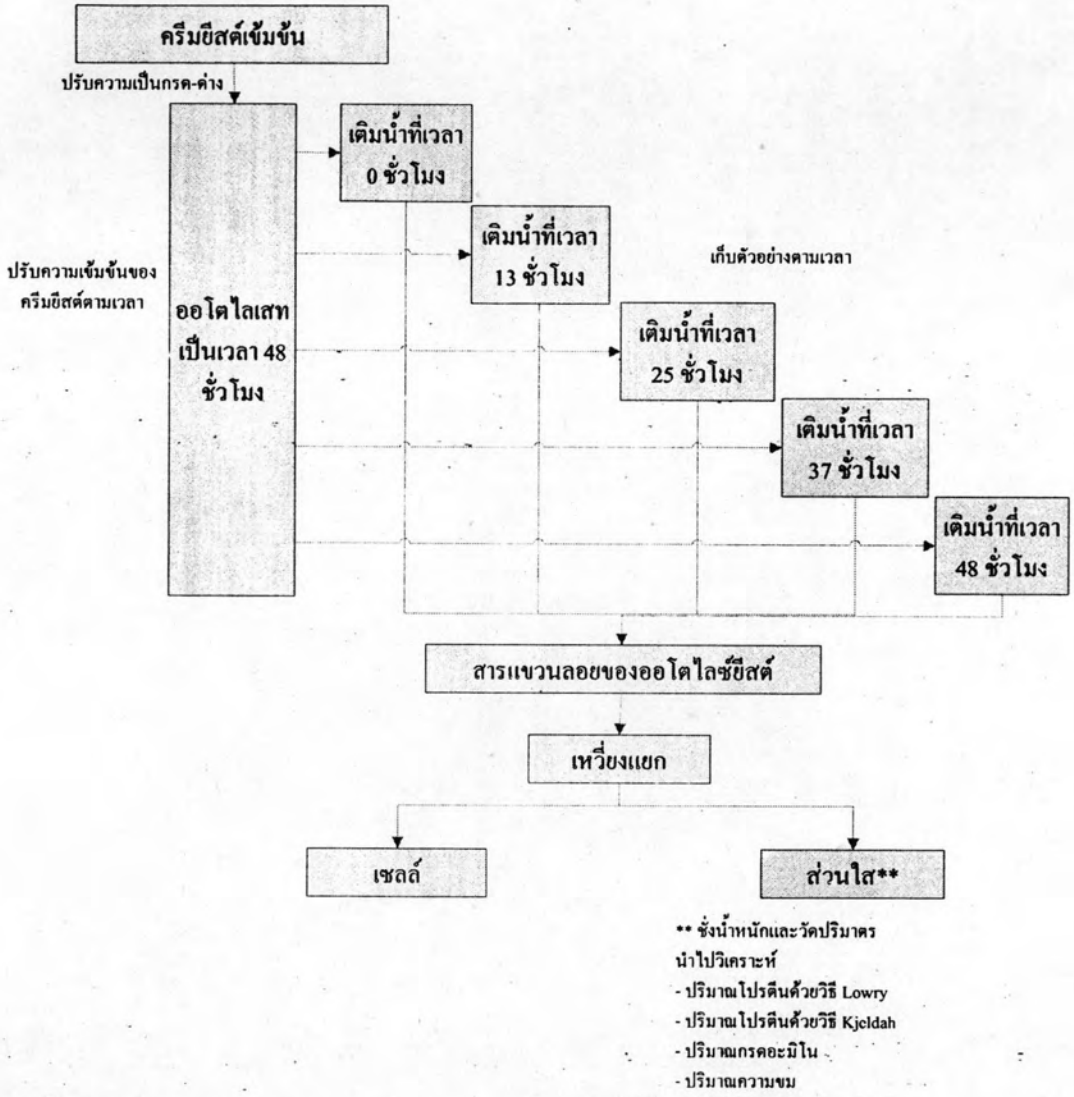
สเปนท์บริวเวอร์ยีสต์จากบริษัทบุญรอด บริวเวอร์รี่ จำกัด นำไปเหวี่ยงแยกน้ำเบียร์ออก ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที (1700xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปล้างตะกอนยีสต์ด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:3 เพื่อแยกเอาฮอพ (Hop) ที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ออกด้วยตะแกรง 150 เมช นำไปเหวี่ยงแยกเอาน้ำออกที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที ทำการล้างด้วยน้ำซ้ำอีกสองครั้ง เพื่อให้ได้ครีมยีสต์ที่สะอาดสำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ดังแสดงในแผนภาพ รูปที่ 3.1



รูปที่ 4.1 แผนภาพการเตรียมวัตถุดิบ

4.4 วิธีการทดลอง

4.4.1 สภาวะของการทดลอง



รูปที่ 4.2 แผนภาพการทดลอง

จากรูปที่ 4.2 เราจะทำการทดลองโดยเริ่มจากนำครีมยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักซึ่งได้จากกระบวนการเตรียมวัตถุดิบดังที่แสดงในรูปที่ 4.1 และเก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส มาทำการทดลองซึ่งจะแบ่งเป็น 2 ส่วน ในส่วนแรกเราจะทำการทดลองโดยตัวแปรสำหรับการทดลองดังนี้ คือแปรด้วยผลของความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5, 5.5 และ 6 และแปรด้วยผลของเวลาในการย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 22 โดยน้ำหนักก่อนที่จะเจือจางไปเป็นความเข้มข้นร้อยละ 11 โดยน้ำหนักซึ่งเท่ากับ 0, 13, 25, 37 และ 48 ชั่วโมง และเก็บผลการทดลองตามเวลาดังที่แสดงในตารางที่ 4.1 โดยในแต่ละการทดลองเราใช้สภาวะของอุณหภูมิสำหรับการย่อยสลายตัวเองที่ 50 องศาเซลเซียสและเก็บตัวอย่างหลังการเจือจางไปแล้วหนึ่งชั่วโมง

ในการทดลองในงานวิจัยนี้เราจะใช้ชุดของการทดลองที่ 1, 6 และ 11 เป็นชุด Control ของการทดลอง โดยในชุดการทดลองดังกล่าวจะทำการทดลองเหมือนงานวิจัยส่วนใหญ่ที่มีการเจือจางยีสต์ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นของกระบวนการย่อยสลายด้วยตัวเอง และในชุดการทดลองที่เหลือจะมีการใช้เวลาในการย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้นตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดของการทดลอง เช่น ในชุดการทดลองที่ 2 เป็นชุดการทดลองที่ทำการทดลองด้วยค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 และเวลาที่ย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้นเท่ากับ 13 ชั่วโมง เราจะเริ่มต้นการทดลองด้วยการนำยีสต์ที่เข้มข้นที่เตรียมไว้แล้วในขั้นตอนเตรียมวัตถุดิบมาเริ่มกระบวนการย่อยสลายด้วยตัวเองที่สภาวะที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้จนกระทั่งเวลาผ่านไป 13 ชั่วโมงเราจะทำการเก็บตัวอย่างครั้งที่ 2 ของชุดการทดลองนี้หลังจากนั้นเราจะเจือจางความเข้มข้นของยีสต์จากร้อยละ 22 โดยน้ำหนักให้เป็นร้อยละ 11 โดยน้ำหนักจากนั้นจะทิ้งไว้หนึ่งชั่วโมงเพื่อให้มีการไหลของสารที่อยู่ภายในเซลล์ออกมาจึงเป็นตัวอย่างครั้งที่ 3 และทิ้งให้ย่อยสลายด้วยตัวเองจนครบเวลา 48 ชั่วโมงจึงเก็บผลครั้งสุดท้ายของชุดการทดลองนี้ ทำเช่นนี้ในทุกชุดการทดลองและเก็บตัวอย่างตามเวลาของแต่ละชุดการทดลองตามที่ได้แสดงในตารางที่ 4.1

หลังจากที่เราเก็บตัวอย่างมาแล้วซึ่งในแต่ละตัวอย่างจะเป็นสารแขวนลอยของออโตไลซ์ของยีสต์ที่มีปริมาตร 30 มิลลิลิตรเราจะนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อบันทึกค่า แล้วเติมน้ำลงไปในตัวอย่างอีกตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตรเพื่อให้ปริมาณน้ำรอบนอกเซลล์สูงขึ้น เขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบเท่ากับ 3000 รอบต่อนาที (1700xg) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ตามรูปที่ 4.2 เมื่อเสร็จกระบวนการเหวี่ยงแยกเราจะสามารถแยกตัวอย่างออกได้เป็น 2 ส่วนคือส่วนของเศษเซลล์ และ ส่วนใสซึ่งเป็นยีสต์ออโตไลเสทเราจะต้องบันทึกปริมาตรและน้ำหนักของส่วนที่เราแยกออกมาได้ และส่วนใสนี้จะเป็นส่วนที่เราจะนำไปวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

ตารางที่ 4.1 สภาวะการทดลอง

สภาวะการทดลอง			เวลาในการเก็บตัวอย่าง นับจากเริ่มต้นการย่อยสลายตัวเอง (ชั่วโมง)	ความเร็วรอบใบพัดกวนยีสต์ขณะย่อยสลายตัวเอง (รอบต่อนาที)	ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงแยกเศษเซลล์ (รอบต่อนาที)	ปริมาตรสารตัวอย่างที่เก็บ (มิลลิลิตร)	การทดลองที่	ตัวอย่างที่
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	เวลาที่ย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้น (ชั่วโมง)						
50	5	0	0	200	3000	30	1	1
			13			30		2
			25			30		3
			37			30		4
			48			30		5
		13	0			30	2	6
			13 ก่อนเติมน้ำ			30		7
			13 หลังเติมน้ำ (14)			30		8
			25			-		-
			37			-		-
			48			30		9
		25	0			30	3	10
			13			30		11
			25 ก่อนเติมน้ำ			30		12
			25 หลังเติมน้ำ (26)			30		13
			37			-		-
			48			30		14

ตารางที่ 4.1 สภาวะการทดลอง (ต่อ)

สภาวะการทดลอง			เวลาในการเก็บตัวอย่าง นับจากเริ่มต้นการย่อยสลายตัวเอง (ชั่วโมง)	ความเร็วรอบใบพัดกวนยีสต์ขณะย่อยสลายตัวเอง (รอบต่อนาที)	ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงแยกเศษเซลล์ (รอบต่อนาที)	ปริมาตรสารตัวอย่างที่เก็บ (มิลลิลิตร)	การทดลองที่	ตัวอย่างที่
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	เวลาที่ย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้น (ชั่วโมง)						
50	5	37	0	200	3000	30	4	15
			13			30		16
			25			30		17
			37 ก่อนเติมน้ำ			30		18
			37 หลังเติมน้ำ (38)			30		19
			48			30		20
		48	0			30	5	21
			13			30		22
			25			30		23
			37			30		24
			48 ก่อนเติมน้ำ			30		25
			48 หลังเติมน้ำ (49)			30		26

ตารางที่ 4.1 สภาวะการทดลอง (ต่อ)

สภาวะการทดลอง			เวลาในการเก็บตัวอย่าง นับจากเริ่มต้นการย่อยสลายตัวเอง (ชั่วโมง)	ความเร็วรอบใบพัดกวนยีสต์ขณะย่อยสลายตัวเอง (รอบต่อนาที)	ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงแยกเศษเซลล์ (รอบต่อนาที)	ปริมาตรสารตัวอย่างที่เก็บ (มิลลิลิตร)	การทดลองที่	ตัวอย่างที่
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	เวลาที่ย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้น (ชั่วโมง)						
50	5.5	0	0	200	3000	30	6	27
			13			30		28
			25			30		29
			37			30		30
			48			30		31
		13	0			30	7	32
			13 ก่อนเติมน้ำ			30		33
			13 หลังเติมน้ำ (14)			30		34
			25			-		-
			37			-		-
			48			30		35
		25	0			30	8	36
			13			30		37
			25 ก่อนเติมน้ำ			30		38
			25 หลังเติมน้ำ (26)			30		39
			37			-		-
			48			30		40

ตารางที่ 4.1 สภาวะการทดลอง (ต่อ)

สภาวะการทดลอง			เวลาในการเก็บตัวอย่าง นับจากเริ่มต้นการย่อยสลายตัวเอง (ชั่วโมง)	ความเร็วรอบใบพัดกวนยีสต์ขณะย่อยสลายตัวเอง (รอบต่อนาที)	ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงแยกเศษเซลล์ (รอบต่อนาที)	ปริมาตรสารตัวอย่างที่เก็บ (มิลลิลิตร)	การทดลองที่	ตัวอย่างที่
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	เวลาที่ย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้น (ชั่วโมง)						
50	5.5	37	0	200	3000	30	9	41
			13			30		42
			25			30		43
			37 ก่อนเติมน้ำ			30		44
			37 หลังเติมน้ำ (38)			30		45
			48			30		46
		48	0			30	10	47
			13			30		48
			25			30		49
			37			30		50
			48 ก่อนเติมน้ำ			30		51
			48 หลังเติมน้ำ (49)			30		52

ตารางที่ 4.1 สภาวะการทดลอง (ต่อ)

สภาวะการทดลอง			เวลาในการเก็บตัวอย่าง นับจากเริ่มต้นการย่อยสลายตัวเอง (ชั่วโมง)	ความเร็วรอบใบพัดกวนยีสต์ขณะย่อยสลายตัวเอง (รอบต่อนาที)	ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงแยกเศษเซลล์ (รอบต่อนาที)	ปริมาตรสารตัวอย่างที่เก็บ (มิลลิลิตร)	การทดลองที่	ตัวอย่างที่
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	เวลาที่ย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้น (ชั่วโมง)						
50	6	0	0	200	3000	30	11	53
			13			30		54
			25			30		55
			37			30		56
			48			30		57
		13	0			30	12	58
			13 ก่อนเติมน้ำ			30		59
			13 หลังเติมน้ำ (14)			30		60
			25			-		-
			37			-		-
			48			30		61
		25	0			30	13	62
			13			30		63
			25 ก่อนเติมน้ำ			30		64
			25 หลังเติมน้ำ (26)			30		65
			37			-		-
			48			30		66

ตารางที่ 4.1 สภาวะการทดลอง (ต่อ)

สภาวะการทดลอง			เวลาในการเก็บตัวอย่าง นับจากเริ่มต้นการย่อยสลายตัวเอง (ชั่วโมง)	คาามเร็วรอบใบพัดกวนยีสต์ขณะย่อยสลายตัวเอง (รอบต่อนาที)	ความเร็วในการปั่นเหวี่ยงแยกเศษเซลล์ (รอบต่อนาที)	ปริมาตรสารตัวอย่างที่เก็บ (มิลลิลิตร)	การทดลองที่	ตัวอย่างที่
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	เวลาที่ย่อยสลายตัวเองด้วยยีสต์เข้มข้น (ชั่วโมง)						
50	6	37	0	200	3000	30	14	67
			13			30		68
			25			30		69
			37 ก่อนเติมน้ำ			30		70
			37 หลังเติมน้ำ (38)			30		71
			48			30		72
		48	0			30	15	73
			13			30		74
			25			30		75
			37			30		76
			48 ก่อนเติมน้ำ			30		77
			48 หลังเติมน้ำ (49)			30		78

4.4.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง และ ผลของเวลาในการย่อยสลายตัวเองด้วยสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์เข้มข้นต่อการผลิตโปรตีน และกรดอะมิโน ในรูปผลได้ของโปรตีน ผลได้ของกรดอะมิโน และปริมาณของความขมที่หลุดออกมาปะปนในผลิตภัณฑ์ ตามเวลาในการย่อยสลายตัวเองของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์

4.2.2.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อปริมาณของความขมตามเวลาในการย่อยสลายตัวเองของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์

4.2.2.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อผลได้ของโปรตีน, ผลได้ของกรดอะมิโน และผลได้ของของแข็งตามเวลาในการย่อยสลายตัวเองของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์

4.2.2.3 ผลของเวลาในการย่อยสลายตัวเองด้วยสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์เข้มข้นที่มีต่อปริมาณของความขมที่จะหลุดมาปะปนในผลิตภัณฑ์ตามเวลาในการย่อยสลายตัวเองของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์

4.2.2.4 ผลของเวลาในการย่อยสลายตัวเองด้วยสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์เข้มข้นที่มีต่อผลได้ของโปรตีน, ผลได้ของกรดอะมิโน และผลได้ของของแข็งตามเวลาในการย่อยสลายตัวเองของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์

4.2.2.5 เลือกสภาวะที่ให้ค่าผลได้ของโปรตีน และผลได้ของกรดอะมิโนมาก และปริมาณของความขมที่ออกมาปะปนในผลิตภัณฑ์ได้น้อย

4.4.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของยีสต์หลังการเจือจางในกระบวนการย่อยสลายด้วยตัวเองต่อการผลิตโปรตีน และ กรดอะมิโน ในรูปผลได้ของโปรตีนและและผลได้ของกรดอะมิโนตามเวลาในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

เลือกใช้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเองของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์เข้มข้นที่มีปริมาณของความขมปะปนอยู่ในปริมาณน้อย ผลได้ของกรดอะมิโน และผลได้ของโปรตีนที่มีค่ามาก ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4.4.1 มาทำการทดลองต่อโดยจะศึกษาผลของความเข้มข้นของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์หลังการเจือจาง โดยค่าความเข้มข้นของสเปนท์บริวเวอร์ยีสต์หลังการเจือจางเป็นร้อยละ 15 และ 9 โดยน้ำหนัก

4.5 การวิเคราะห์

4.5.1 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของแข็ง (%solid)

ทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของแข็งของตัวอย่างเริ่มต้น โดยอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและนำมาใส่ในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนักจนกระทั่งได้น้ำหนักแห้งคงที่

4.5.2 การวิเคราะห์โปรตีน (Lowry, 1951)

ใส่สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัม) 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอี 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอฟ 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แล้วหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน

<u>หมายเหตุ</u> วิธีเตรียมสารละลายอี และ เอฟ

การเตรียมสารละลายอี โดยทำการเตรียมสารละลายเอ บี ซี และ ดี ดังนี้

สารละลายเอ : 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) คอปเปอร์ซัลเฟต

สารละลายบี : 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต

สารละลายซี : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์

สารละลายอี : 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมคาร์บอเนต

สารเหล่านี้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้

จากนั้นผสมสารละลายซี 49 มิลลิลิตร กับสารละลายดี 49 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเอและสารละลายบีลงไปอย่างละ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยสารละลายอีต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง

การเตรียมสารละลายเอฟ ทำได้โดยเจือจาง Folin-Ciocalteau ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ใช้โบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้นระหว่าง 0.05-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.3 การวิเคราะห์กรดอะมิโน

ใส่สารละลายนินไฮดรินจำนวน 1 มิลลิลิตร สารละลายกลีเซอรอลจำนวน 2.4 มิลลิลิตร เติม 0.5 โมลาร์ของสาละลายบัฟเฟอร์ซิเตรท และสารละลายแมงกานีสคลอไรด์ อย่างละ 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.2มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองเพื่อกันละเหย นำไปต้มในน้ำเดือด 12 นาที จากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำ แล้วนำไปวัดค่าการดูดแสง ที่ 570 นาโนเมตร ต้องทำการวัดการดูดกลืนแสงภายใน 1 ชั่วโมง

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายนินไฮดรินร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก
2. สารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 55 โดยปริมาตร
3. สารละลายบัฟเฟอร์ซิเตรท 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5
4. สารละลายแมงกานีสคลอไรด์ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ใช้กรดกลูตามิกความเข้มข้นระหว่าง 0.1-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.5.4 การวิเคราะห์ความขม (Analytica-EBC)

ใส่สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณความขม 10 มิลลิลิตร ลงขวดปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มัล 1 มิลลิลิตร ใส่เม็ดลูกแก้ว 2 เม็ด แล้วเติมไอโซออคเทน 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเฟสที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าความขมตามสมการ โดยแสดงค่าความขมในรูปของจำนวนเต็มในหน่วย EBU. (European Brewery Convention) ปริมาณ1 EBU. มีค่าเท่ากับ 1 มิลลิกรัมของไอโซแอลฟาแอซิดในสารละลาย 1 ลิตร

ความขม (EBU.) = O.D.275 นาโนเมตร x 50

4.5.5 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldah

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. กรดซัลฟิวริคเข้มข้น
2. สารละลายกรดบอริคร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
4. สารละลายกรดซัลฟิวริค 0.098 นอร์มัล
5. Serenium reagent mixture

ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อยโปรตีน แล้วใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา (Serenium reagent mixture) ลงไปประมาณ 1 ช้อนจากนั้นเทกรดซัลฟิวริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตรลงไปในหลอดย่อยโปรตีนแล้วนำหลอดย่อยโปรตีนที่ใส่สารทั้งหมดครบประกอบให้ครบชุดการย่อยโปรตีนแล้วนำไปใส่ในช่องสำหรับให้ความร้อนของเครื่องย่อยโปรตีนซึ่งให้ความร้อน 200 – 360 องศาเซลเซียส โดยในชุดเครื่องย่อยโปรตีนจะประกอบไปด้วยเครื่องให้ความร้อนเพื่อย่อยโปรตีน, อุปกรณ์สกลับกรด, เครื่องให้ความเย็น เราจะทิ้งให้เกิดการย่อยโปรตีนจนสมบูรณ์จะสังเกตได้จากสีของสารละลายในหลอดย่อยโปรตีนจะเป็นสารละลายไม่มีสีหรือสารละลายใส (เวลาในการย่อยประมาณ 60 นาที) หลังจากย่อยโปรตีนเสร็จให้ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปในเครื่องกลั่น ซึ่งในเครื่องกลั่นนี้จะทำการไตเตรทและหาปริมาณกรดที่จะใช้ในการไตเตรท ปริมาณกรดนี้เราจะใช้ในการคำนวณหาร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งในขั้นตอนการกลั่นจะทำการใส่น้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงไปเพื่อเจือจางสภาพความเป็นกรด เครื่องจะทำการกลั่นสารละลายทั้งหมดที่ป้อนเข้าไปจนได้ส่วนที่ถูกกลั่นซึ่งส่วนที่ถูกกลั่นออกมาจะถูกใส่สารละลายกรดบอริค 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 มิลลิลิตรในส่วนนี้สารละลายจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้มพร้อมกับมีการให้ความร้อนแก่สารละลายทั้งหมด และจะมีการไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริคความเข้มข้น 0.098 นอร์มัล โดยจุดยุติของการเตรทจะอยู่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.65 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างของกรดบอริค

การคำนวณ

$$\% \text{ Total nitrogen} = \frac{1.4007 \times N_{H_2SO_4} \times V_{H_2SO_4}}{V_{Sample}}$$

$$\text{Crude protein (\%)} = \text{Total nitrogen (\%)} \times 6.25$$

$N_{H_2SO_4}$ = ความเข้มข้นนอร์มัลลิตี้ของกรดซัลฟิวริคที่ใช้ไตเตรท

$V_{H_2SO_4}$ = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริคที่ใช้ไตเตรท

V_{Sample} = ปริมาตรของสารตัวอย่าง

I23506003