

ภาคผนวก ก
ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1 การเปลี่ยนแปลงสี (ค่าความสว่าง (L-value) และค่าสีเหลือง (b-value)) ของเห็ดนางรมฮังการีระยะดอกบาน 70-80% และ 90-100% ภายหลังลดอุณหภูมิด้วยวิธีต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

ระยะเก็บเกี่ยว	วิธีลดอุณหภูมิ	ค่าความสว่าง (L-value) ภายหลังการเก็บรักษา (วัน)				ค่าสีเหลือง (b-value) ภายหลังการเก็บรักษา (วัน)			
		0	2	4	6	0	2	4	6
ดอกบาน 70-80%	ไม่ลดอุณหภูมิ	80.36 bc ^{L/}	79.98	80.48	76.30	11.89 ab	15.29 a	13.25	15.45
	น้ำแข็ง	80.13 bc	78.52	81.35	75.21	12.36 a	15.22 a	13.38	14.71
	ห้องเย็น	78.22 c	80.72	81.39	76.31	11.70 abc	13.24 b	12.76	14.86
ดอกบาน 90-100%	ไม่ลดอุณหภูมิ	83.86 a	79.81	83.40	76.15	12.01 ab	14.23 ab	13.40	14.99
	น้ำแข็ง	78.65 c	81.08	82.37	76.59	11.30 bc	12.99 b	12.67	14.41
	ห้องเย็น	82.29 a	79.04	81.64	73.29	10.75 c	13.48 ab	13.08	13.67
% C.V.		1.68	3.21	1.87	4.13	4.42	6.75	7.15	8.26
ระยะเก็บเกี่ยว		**	ns	ns	ns	*	*	ns	ns
วิธีลดอุณหภูมิ		*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ระยะเก็บเกี่ยว×วิธีลดอุณหภูมิ		**	ns	ns	ns	*	*	ns	ns

หมายเหตุ ^{L/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ

*, ** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ตารางผนวกที่ 2 คะแนนการเปลี่ยนแปลงกลั่น สี และการเกิดเส้นใยของเห็ดนางรมฮังการีดอกบาน 70-80% และ 90-100% ภายหลังจากลดอุณหภูมิด้วยวิธีต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

ระยะเก็บเกี่ยว	วิธีลดอุณหภูมิ	กลั่น (คะแนน) ภายหลังจากการเก็บรักษา (วัน)				การเกิดเส้นใย (คะแนน) ภายหลังจากการเก็บรักษา (วัน)			
		0	2	4	6	0	2	4	6
ดอกบาน 70-80%	ไม่ลดอุณหภูมิ	1.00	1.33 ab ^{1/}	2.33	4.83 a	1.00	1.00	2.83	4.50 ab
	น้ำแข็ง	1.00	1.00 c	2.16	4.33 ab	1.00	1.00	2.83	3.66 c
	ห้องเย็น	1.00	1.00 c	2.00	4.16 b	1.00	1.00	2.66	4.16 bc
ดอกบาน 90-100%	ไม่ลดอุณหภูมิ	1.00	1.50 a	2.66	4.83 a	1.00	1.00	3.33	5.00 a
	น้ำแข็ง	1.00	1.16 bc	2.66	4.16 b	1.00	1.00	3.16	4.83 a
	ห้องเย็น	1.00	1.00 c	2.33	4.66 ab	1.00	1.00	3.33	4.83 a
% C.V.		-	14.28	11.16	6.41	-	-	9.53	6.92
ระยะเก็บเกี่ยว		-	ns	**	ns	-	-	**	**
วิธีลดอุณหภูมิ		-	**	ns	*	-	-	ns	*
ระยะเก็บเกี่ยว×วิธีลดอุณหภูมิ		-	*	ns	*	-	-	ns	**

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ

*, ** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ตารางผนวกที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรตที่ไม่อยู่ในรูปโครงสร้าง (TNC) น้ำตาลรวมของเห็ดนางรมฮังการีระยะดอกบาน 70-80% และ 90-100% ภายหลังลดอุณหภูมิด้วยวิธีต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

ปัจจัย	โปรตีน (% น้ำหนักแห้ง)				คาร์โบไฮเดรต (TNC) (มก. D-glucose/ก. น้ำหนักแห้ง)				น้ำตาลรวม (มก. D-glucose /ก. น้ำหนักแห้ง)			
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
ดอกบาน 70-80%	5.40 a	3.44	5.37	5.33	27.84	23.88	17.36	17.04	0.42	0.80	0.92	0.81
ดอกบาน 90-100%	1.44 b	3.87	3.66	4.38	28.20	23.14	17.01	20.07	0.50	0.75	0.93	0.83
ระยะเก็บเกี่ยว	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ไม่ลดอุณหภูมิ	4.57	3.75	4.96	4.97	29.46	23.71	16.05	17.24	0.50	0.71	0.88	0.83
น้ำแข็ง	3.15	4.29	5.40	5.56	27.47	25.40	17.96	18.54	0.37	0.80	0.92	0.81
ห้องเย็น	2.54	2.92	3.19	4.03	27.13	21.42	17.54	19.88	0.50	0.82	0.95	0.82
วิธีลดอุณหภูมิ	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ระยะเก็บเกี่ยว×วิธีลดอุณหภูมิ	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
% C.V.	40.19	59.45	39.53	28.28	21.83	14.19	22.69	19.45	57.21	25.06	25.36	32.27

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ *, ** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ตารางผนวกที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO) และกิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (Chitinase) ของเห็ดนางรมฮังการีดอกบาน 70-80% และ 90-100% ภายหลังลดอุณหภูมิด้วยวิธีต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

ระยะเก็บเกี่ยว	วิธีลดอุณหภูมิ	กิจกรรมเอนไซม์ PPO (หน่วย/มก. โปรตีน)				กิจกรรมเอนไซม์ chitinase (หน่วย/มก. โปรตีน)			
		ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
		0	2	4	6	0	2	4	6
ดอกบาน 70-80%	ไม่ลดอุณหภูมิ	0.115 c ^L	0.440	0.315	0.208	4.478 a	0.237 b	0.261	5.062
	น้ำแข็ง	0.191 c	0.458	0.151	0.186	3.172 ab	0.232 b	0.377	2.453
	ห้องเย็น	0.205 c	0.406	0.415	0.238	1.858 b	0.261 b	0.361	3.829
ดอกบาน 90-100%	ไม่ลดอุณหภูมิ	0.347 bc	0.258	0.191	0.198	3.800 a	2.444 a	0.633	3.859
	น้ำแข็ง	0.920 ab	0.197	0.307	0.221	2.814 ab	2.665 a	0.514	5.393
	ห้องเย็น	1.062 a	0.373	0.418	0.329	3.915 a	2.696 a	1.096	2.712
% C.V.		69.92	77.76	68.38	35.72	26.15	74.67	115.02	73.14
ระยะเก็บเกี่ยว		**	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns
วิธีลดอุณหภูมิ		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ระยะเก็บเกี่ยว×วิธีลดอุณหภูมิ		ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns

หมายเหตุ ^L ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ , * ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงสี (ค่าความสว่าง (L-value) และค่าสีเหลือง (b-value)) ของเห็ดนางรมฮังการี เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 10 15 และ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

อุณหภูมิ	ค่าความสว่าง (L-value) ภายหลังการเก็บรักษา (วัน)				ค่าสีเหลือง (b-value) ภายหลังการเก็บรักษา (วัน)			
	0	2	4	6	0	2	4	6
อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)	80.96 ab ^{L/}	83.03	74.67	60.69 b	14.53 ab	14.17 a	18.68 a	18.69 a
5 องศาเซลเซียส	83.25 a	82.17	79.76	72.69 a	13.32 b	13.24 b	13.75 b	15.76 b
10 องศาเซลเซียส	74.39 c	79.77	81.09	68.77 a	15.44 a	14.12 a	13.67 b	16.18 b
15 องศาเซลเซียส	77.33 bc	82.76	77.78	68.77 a	14.93 a	13.33 b	15.97 b	17.33 ab
% C.V.	2.53	2.05	3.98	5.53	4.93	2.24	9.26	6.35
F-test	**	ns	ns	*	*	**	**	*

หมายเหตุ ^{L/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple

Range Test (DMRT)

ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ

*, ** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ตารางผนวกที่ 6 คะแนนการเปลี่ยนแปลงกลิ่น สี และการเกิดเส้นใยของเห็ดนางรมฮังการี เก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิ 5 10 15 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

อุณหภูมิ	กลิ่น (คะแนน) ภายหลังการเก็บรักษา (วัน)				การเกิดเส้นใย (คะแนน) ภายหลังการเก็บรักษา (วัน)			
	0	2	4	6	0	2	4	6
อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)	1.00	1.83 a ^{1/}	5.00 a	5.00 a	1.00	1.83 a	5.00 a	5.00a
5 องศาเซลเซียส	1.00	1.00 c	1.00 d	1.50 c	1.00	1.00 b	1.00 b	1.16c
10 องศาเซลเซียส	1.00	1.00 c	2.33 c	3.33 b	1.00	1.00 b	1.00 b	2.83b
15 องศาเซลเซียส	1.00	1.50 b	3.33 b	5.00 a	1.00	1.00 b	1.00 b	3.16b
% C.V.	-	10.82	6.99	7.78	-	11.94	0	8.21
F-test	-	**	**	**	-	**	**	**

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางผนวกที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์ PPO และกิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ของเห็ดนางรมฮังการี เก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิ 5 10 15 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

อุณหภูมิ	กิจกรรมเอนไซม์ PPO (หน่วย/มก. โปรตีน)				กิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (หน่วย/มก. โปรตีน)			
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
	0	2	4	6	0	2	4	6
อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)	0.109	0.124	0.088	0.116	5.668 a	1.578	1.297	0.252
5 องศาเซลเซียส	0.177	0.132	0.142	0.177	0.757 b	2.415	0.747	0.222
10 องศาเซลเซียส	0.134	0.167	0.132	0.214	0.492 b	0.654	0.452	0.927
15 องศาเซลเซียส	0.174	0.141	0.178	0.245	1.055 b	2.262	0.996	1.226
% C.V.	23.44	27.07	47.78	57.42	65.82	95.59	67.91	88.12
F-test	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 8 การเปลี่ยนแปลงสี (ค่าความสว่าง (L-value) ค่าสีเหลือง (b-value)) ของเห็ดนางรม
 อังการี ซึ่งบรรจุถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติกฟิล์ม ก่อพลาสติกปิดฝา และ
 ถูพลาสติกรัดปากถาดด้วยยาง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 2 4
 และ 6 วัน

ภาชนะบรรจุ	ค่าความสว่าง (L-value)				ค่าสีเหลือง (b-value)			
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
	0	2	4	6	0	2	4	6
ถาดโฟม	74.48	83.94 a ^{1/}	71.02	80.07	12.24	12.55	13.67	14.61 a
ก่อกพลาสติก	78.16	76.74 c	75.55	83.49	12.13	14.01	14.39	13.86 ab
ถูพลาสติก	70.96	80.17 b	68.06	83.75	12.56	13.60	13.34	12.84 b
% C.V.	4.46	1.82	8.18	2.43	3.23	4.31	4.02	4.44
F-test	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	*

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความ
 เชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)
 ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ
 *, ** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

ตารางผนวกที่ 9 คะแนนการเปลี่ยนแปลงกลิ่น และการเกิดเส้นใยบริเวณ โคนก้านของเห็ดนางรมฮังการีที่บรรจุถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติกฟิล์ม ก่อพลาสติกปิดฝา และถุงพลาสติกรัดปากถุงด้วยยาง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

ภาชนะบรรจุ	กลิ่น (คะแนน)				การเกิดเส้นใย (คะแนน)			
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
	0	2	4	6	0	2	4	6
ถาดโฟม	1.00	1.00 b ^{1/}	1.33 c	3.16 b	1.00	1.00 b	1.16 b	4.50 a
ก่อกพลาสติก	1.00	2.50 a	2.50 b	2.83 b	1.00	2.16 a	3.16 a	5.00 a
ถุงพลาสติก	1.00	2.33 a	4.16 a	5.00 a	1.00	1.00 b	1.00 b	1.00 b
% C.V.	-	8.57	8.83	6.42	-	12.00	8.72	8.24
F-test	-	**	**	**	-	**	**	**

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)
 ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ
 ** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

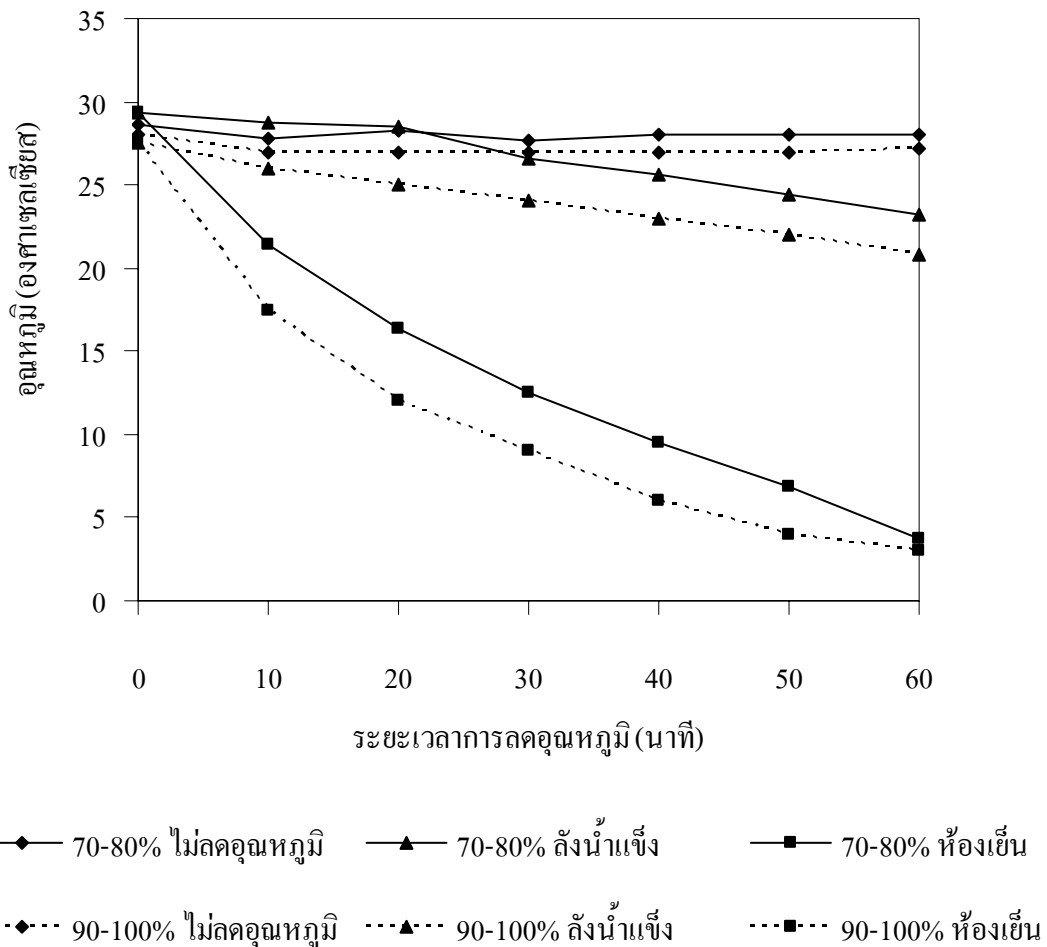
ตารางผนวกที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์ PPO และกิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ของเห็ดนางรมฮังการีที่บรรจุถาดโฟมหุ้มด้วยพลาสติกฟิล์ม ก่อพลาสติกปิดฝา และถุงพลาสติกรัดปากถุงด้วยยาง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 6 วัน

ภาชนะบรรจุ	กิจกรรมเอนไซม์ PPO (หน่วย/มก. โปรตีน)				กิจกรรมเอนไซม์ chitinase (หน่วย/มก. โปรตีน)			
	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)				ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)			
	0	2	4	6	0	2	4	6
ถาดโฟม	0.139	0.111	0.069 a	0.062	0.056	0.768	0.817 b	0.118
ก่อกพลาสติก	0.123	0.087	0.049 b	0.059	0.508	0.435	2.447 a	0.439
ถุงพลาสติก	0.104	0.081	0.055 b	0.057	0.313	0.151	0.147 c	0.165
% C.V.	23.11	16.30	12.28	9.36	105.62	183.11	18.53	99.31
F-test	ns	ns	*	ns	ns	ns	**	ns

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ns ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ

*, ** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ 99%



ภาพผนวกที่ 1 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของดอกเห็ดนางรมสังการีดอกบาน 70-80% และ 90-100% ระหว่างลดอุณหภูมิด้วยวิธีต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์ก่อนการเก็บเกี่ยว

1. การวิเคราะห์วัสดุเพาะ

1.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของวัสดุเพาะ (ทัศนีย์ และคณะ, 2537)

ชั่งวัสดุเพาะ 10 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มล. เติมน้ำกลั่น 50 มล. คนด้วยแท่งแก้วให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัด pH ด้วย pH meter (Sartorius รุ่น PB20)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม (ประภาศรี, 2544)

1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง ชั่งตัวอย่างวัสดุเพาะแห้งบดละเอียด 1 กรัม ใส่หลอดย่อยตัวอย่างขนาด 75 มล. เติมสารละลายผสมของกรดไนตริก (HNO_3) และกรดเปอร์คลอริก (HClO_4) (อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 20 มล. หมุนหลอดไปรอบ ๆ อย่างช้า ๆ เพื่อป้องกันตัวอย่างตกค้างอยู่ข้างหลอด pre-digest ด้วยการอุ่นหลอดใน block digester อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใน hood เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับอุณหภูมิของ block digester เป็น 150 องศาเซลเซียส อุ่นต่อเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง และปรับอุณหภูมิของ block digester เป็น 200 องศาเซลเซียส อุ่นต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยสลายตัวอย่างให้สมบูรณ์ จนกระทั่งสารละลายสี ที่ง้ำให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 50 มล. ตั่วน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากัน กรองสารละลายดังกล่าวด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 เก็บสารละลายในขวดพลาสติกขนาด 100 มล. ปิดฝาให้สนิท เพื่อใช้ในการวิเคราะห์แคลเซียมต่อไป

ส่วนการเตรียม blank ปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ไม่ใส่ตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น

1.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากข้อ 1.2.1 ปริมาตร 5 มล. ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก และเติม 1% KCl ปริมาตร 5 มล. เขย่าให้เข้ากัน วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมของสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ของสารละลายแคลเซียมความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm.

2. การวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมของดอกเห็ดนางรมฮังการี

เตรียมตัวอย่างเห็ดแห้งบด โดยอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง บดด้วยเครื่องบดตัวอย่างพืช ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม (ประภาศรี, 2544) ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 แต่ใช้ตัวอย่างเห็ดแทนวัสดุเพาะ

การวิเคราะห์หลังการเก็บเกี่ยว

1. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Total Nonstructural Carbohydrate: TNC) (Hodge and Hofreiter, 1962 อ้างใน วรรณ, 2546)

1.1 การสกัดตัวอย่าง : ชั่งตัวอย่างเห็ดแห้งบด 0.25 กรัม ใส่พลาสติกขนาด 50 มล. เติม 0.2N H_2SO_4 ปริมาตร 40 มล. ปิดพลาสติกด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ อบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มล. ลงในขวดพลาสติกขนาด 100 มล. ปรับ pH ของสารละลายดังกล่าวให้เป็นกลางด้วย 1N HCl, 0.01N NaOH, 0.1N NaOH และ 3N NaOH และปรับปริมาตรเป็น 50 มล. ด้วยน้ำกลั่น

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณ TNC : ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (จากข้อ 1.1) ปริมาตร 1 มล. ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม Alkaline copper reagent 1 มล. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แช่ให้เย็นในน้ำไหล เติม Arsenomolybdic acid reagent 1 มล. เขย่าให้ตะกอนละลาย ปรับปริมาตรเป็น 12.5 มล. ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

1.3 การเตรียม blank : ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง และปฏิบัติตามข้อ 1.2 นำ blank และสารละลายตัวอย่าง ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ตามวิธีการของ Nelson's reducing sugar ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น (Spectronic Genesys 5) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย D-glucose ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 250, 300, 350 และ 400 ppm. คำนวณค่าปริมาณ TNC จากสูตร

$$\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (TNC\%)} = \frac{Y \times 50 \times 100}{1,000 \times W \times 1,000}$$

Y = ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่คำนวณได้จากเครื่อง spectrophotometer

W = น้ำหนักตัวอย่างแห้งแห้งบด

2. การวิเคราะห์น้ำตาลรวม (Total Sugar) (Hodge and Hofreiter, 1962)

2.1 การสกัดตัวอย่าง : ชั่งตัวอย่างแห้งแห้งบด 0.05 กรัม ใส่พลาสติกขนาด 50 มล. เติม 50% เอทิลแอลกอฮอล์ 20 มล. ปิดปากพลาสติกด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เขย่าพลาสติกทุก ๆ 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 ปริมาณเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล : ผงละลาย (จากข้อ 2.1) 1 มล. ใส่หลอดทดลอง เติม 0.1N HCl 1 มล. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แช่หลอดทดลองในน้ำเย็น เติม 0.1N NaOH 1 มล. ผงละลายผสมข้างต้น 1 มล. ใส่หลอดทดลอง เติม Alkalic copper reagent 1 มล. ต้มใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แช่ให้เย็นในน้ำไหล เติม Arsenomolybdc acid reagent 1 มล. เขย่าให้ตะกอนละลาย ปริมาณเป็น 12.5 มล. ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รุ่น Spectronic Genesys 5) เปรียบเทียบและคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย D-glucose ความเข้มข้น 0.005-0.02%

หมายเหตุ

ก. การเตรียม Alkalic copper reagent

สารละลาย I : ละลาย anhydrous sodium carbonate (Na_2CO_3) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มล. เติม potassium sodium tartrate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 12 กรัม และ 10% copper sulfate 40 มล. (ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาณเป็น 40 มล.) และเติม sodium bicarbonate (NaHCO_3) 16 กรัม

สารละลาย II : ละลาย anhydrous sodium sulfate (Na_2SO_4) 180 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล.

ผสมสารละลาย I และสารละลาย II ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ กรองสารละลายดังกล่าว และเก็บในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส

ข. การเตรียม Arsenomolybdic acid reagent

สารละลาย III : ละลาย ammonium molybdate [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$] 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 42 มล.

สารละลาย IV : ละลาย disodium hydrogen arsenate ($\text{AsHNa}_2\text{O}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 6 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มล.

เทสารละลาย IV ลงในสารละลาย III ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย (Crude fiber) (A.O.A.C., 2000)

3.1 การสกัดไขมัน : ชั่งตัวอย่างแห้งแห้งบด 1.5 กรัม ใส่บนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 125 มม. ห่อตัวอย่างให้แน่น อบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักก่อนนำไปสกัดไขมัน ใส่ห่อตัวอย่างแห้งใน soxhlet tube ต่อกับ condenser และ extraction flask ซึ่งบรรจุปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) 2/3 ของปริมาตรฟลาสก์ กลั่นนาน 10 ชั่วโมง นำห่อตัวอย่างออกจาก soxhlet tube อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บไว้ในโถดูดความชื้น (ชั่งน้ำหนักหลังสกัดไขมัน) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใยต่อไป

3.2 การวิเคราะห์เยื่อใย : นำตัวอย่างแห้งที่ผ่านการสกัดไขมัน (จากข้อ 3.1) ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 600 มล. เติม 1.25% H_2SO_4 ปริมาตร 200 มล. ต้มให้เดือดบน hot plate นาน 30 นาที กรองผ่านกรวย (buchner funnel) ที่มีผ้าลินินขึงอยู่ ล้างตะกอนตัวอย่างแห้งด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งหมดสภาพกรด (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ถ่ายตะกอนตัวอย่างแห้งลงในบีกเกอร์เดิมที่มี 1.25% NaOH ปริมาตร 200 มล. ต้มให้เดือดบน hot plate นาน 30 นาที กรองผ่านกรวย (ที่มีผ้าลินินขึงอยู่) ล้างตะกอนตัวอย่างแห้งด้วยน้ำร้อนจนหมดสภาพด่าง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ถ่ายตะกอนตัวอย่างดังกล่าวลงในถ้วยเผา ล้างตะกอนด้วย 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 15 มล. อบถ้วยเผาพร้อมตะกอนตัวอย่างที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

หลังอบ จากนั้นนำถั่วฝักยาวไปเผาในเตาเผา อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปล่อยให้อุณหภูมิตกลงเหลือ 100 องศาเซลเซียส นำถั่วฝักยาวใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักหลังเผา กำหนดปริมาณเชื้อใยอาหาร จากสูตร

$$\text{ปริมาณเชื้อใย (\%)} = \frac{(X-Y) \times 100}{W}$$

X = น้ำหนักถั่วฝักยาว + เชื้อใยเห็ดหลังอบ ที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส

Y = น้ำหนักถั่วฝักยาว + เชื้อใยเห็ดหลังเผา ที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียส

W = น้ำหนักตัวอย่างเห็ดก่อนอบ (ก่อนสกัดไขมัน) (ข้อ 3.1)

4. การวิเคราะห์ปริมาณ Total phenolics (ดัดแปลงจากวิธีของ Singleton and Rossi, 1965)

4.1 การสกัดฟีนอลิก : ปั่นเนื้อเชื้อเห็ดสด 3 กรัม ร่วมกับ 80% เอทิลแอลกอฮอล์ 10 มล. ด้วยเครื่อง homogenizer 10 วินาที และปั่นเหวี่ยง (centrifuged) ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (รุ่น KR 22i) อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ในหลอดทดลอง แช่ในน้ำแข็ง สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด : ปิ่ปดสารละลายส่วนใส (จากข้อ 4.1) ปริมาตร 1 มล. ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย folin-ciocalteu phenol reagent เข้มข้น 1 มล. ผสมให้เข้ากัน เติม 20% Na₂CO₃ ปริมาตร 1 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 7 มล. ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่มืดนาน 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รุ่น Genesys 10 series) เปรียบเทียบและคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดกับสารละลายมาตรฐานกรด galic ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mM

5. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ PPO (ดัดแปลงจากวิธีของ Yang และคณะ, 2000)

5.1 การสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) : ปั่นตัวอย่างเห็ดสด 5 กรัม ร่วมกับ sodium phosphate buffer pH 7.3 ปริมาตร 10 มล. ด้วย homogenizer นาน 30 วินาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านผ้าขาวบางลงในหลอด centrifuged นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (รุ่น KR 22i) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 30 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ในหลอดทดลอง แช่ในน้ำแข็ง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนต่อไป

5.2 การเตรียม substrate (0.2M catechol) : ละลาย catechol 2.202 กรัม ใน sodium phosphate buffer pH 7.3 ปริมาตร 100 มล. ในที่มืด ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

5.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PPO : เตรียม blank โดยใช้ sodium phosphate buffer pH 7.3 และเตรียม internal control เพื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ PPO โดยปิเปต sodium phosphate buffer pH 7.3 ปริมาตร 4.9 มล. ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เติม crude enzyme (ข้อ 5.1) 0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน

เตรียมปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยปิเปต sodium phosphate buffer pH 7.3 ปริมาตร 3.9 มล. ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก เติม 0.2M catechol 1 มล. เติม crude enzyme 0.1 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยานาน 3 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รุ่น Genesys 10 series)

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme (Bradford, 1976)

5.4.1 การเตรียม Coomassie blue G250 (CBB) 0.0125% (W/V) : ละลาย CBB 100 มก. ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 50 มล. ผสมให้เข้ากันในที่มืด จากนั้นเติม 85% phosphoric acid ปริมาตร 100 มล. ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล. ด้วยน้ำกลั่น กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ใส่ขวดสีชา

5.4.2 การวิเคราะห์โปรตีน : ปิเปต crude enzyme (จากข้อ 5.1) 200 ไมโครลิตร

ลงในหลอดทดสอบ เติม sodium phosphate buffer pH 7.3 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เติมสารละลาย CBB ปริมาตร 4 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รุ่น Genesys 10 series) เปรียบเทียบและคำนวณปริมาณโปรตีนจากสารละลายมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ

ก. การเตรียม sodium phosphate buffer pH 7.3

เตรียม 0.2M Monobasic stock : ละลาย sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 13.9 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล.

เตรียม 0.2M Dibasic stock : ละลาย sodium phosphate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

เตรียม sodium phosphate buffer pH 7.3 โดยใช้ 0.2M Monobasic stock ปริมาตร 115 มล. ผสมกับ 0.2M Dibasic stock ปริมาตร 385 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.3 ด้วย 0.2M Monobasic stock และ/หรือ 0.2M Dibasic stock

ข. การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA

เตรียม BSA : ละลาย BSA 0.01 กรัม ใน sodium phosphate buffer pH 7.3 ปริมาตร 100 มล. (เขย่าเบา ๆ อย่าให้มีฟอง)

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ BSA ความเข้มข้น 0 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยผสม BSA กับ sodium phosphate buffer pH 7.3 ตามอัตราส่วนดังนี้

ความเข้มข้น (mg/ml)	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	1.00
BSA (μ l)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1,000
Buffer (μ l)	1,000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

6. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (ดัดแปลงจากวิธีของ วารุณี, 2546)

6.1 การสกัดเอนไซม์ (crude enzyme) : ปั่นตัวอย่างเห็ดสด 5 กรัม ร่วมกับ citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 10 มล. ด้วย homogenizer เป็นเวลา 10 วินาที กรองสารละลายที่ได้ผ่านผ้าขาวบางลงในหลอด centrifuged ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (รุ่น KR 22i) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 20 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ในหลอดทดลองแช่ในน้ำแข็ง เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสและปริมาณ โปรตีนต่อไป

6.2 การเตรียม substrate (5% colloidal chitin)

เตรียม colloidal chitin โดยชั่ง chitin (poly-(1-4)- β -D-N-acetylglucosamine, crab shell, Sigma) 2.5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 500 มล. เติม 85% phosphoric acid 250 มล. ช้ำ ๆ ค่อย ๆ คนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คนด้วยแท่งแม่เหล็กกวน (magnetic stirrer) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างกรดออกด้วยน้ำเย็น 4 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (รุ่น RS-20III) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 20 นาที ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นและปฏิบัติตามวิธีดังกล่าวข้างต้นอีก 3 ครั้ง ล้างตะกอนด้วย 1N NaOH นำไปปั่นเหวี่ยง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนมีค่า pH เป็นกลาง (ทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส) ทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียม 5% Colloidal chitin โดยปีเปิด Colloidal chitin 5 มล. ผสมกับ 0.05M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 95 มล. เก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

6.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase : ปีเปิด 5% Colloidal chitin (จากข้อ 6.2) 1 มล. ใส่หลอดทดสอบ เติม crude enzyme (จากข้อ 6.1) 1 มล. เขย่าให้เข้ากันแช่ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ และแช่น้ำเดือดนาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปีเปิดสารละลายตัวอย่างดังกล่าว 1 มล. ลงในหลอดทดสอบ เติม Alkaline

copper reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แช่ให้เย็นในน้ำเย็นจัด (น้ำผสมน้ำแข็ง) เติม Arsenomolybdic acid reagent 1 มล. ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 9.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รุ่น Genesys 10 series) เปรียบเทียบและคำนวณปริมาณ N-acetylglucosamine กับสารละลายมาตรฐานของน้ำตาล N-acetylglucosamine ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 150, 200 และ 300 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามวิธีของ Nelson Somogyi (Nelson, 1944)

กิจกรรมของเอนไซม์โคติเนส 1 หน่วย (Unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายโคตินได้ เป็น N-acetylglucosamine 1 μ mole ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

6.4 การวิเคราะห์โปรตีนใน crude enzyme (จากข้อ 6.1)

6.4.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์

สารละลาย A : ละลาย Na_2CO_3 10 กรัม อย่างช้า ๆ ในสารละลาย 0.1N NaOH จำนวน 500 มล. ผสมให้เข้ากัน สารละลายที่ได้จะใสไม่มีสี

สารละลาย B : ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.125 กรัม และ tri-sodium citrate dihydrate 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 25 มล. สารละลายที่ได้จะมีสีน้ำเงิน

สารละลาย C : ผสมสารละลาย A และ B อัตราส่วน 50:1 โดยปริมาตรก่อนใช้ทุกครั้ง

6.4.2 การวิเคราะห์โปรตีน: ปิเปต crude enzyme (จากข้อ 6.1) ปริมาตร 0.3 มล.

ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย C ปริมาตร 3 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย folin-ciocalteu phenol reagent เจือจาง (ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 0.3 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รุ่น Genesys 10 series) เปรียบเทียบและคำนวณปริมาณโปรตีนกับสารละลายมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หมายเหตุ

ก. การเตรียม citrate buffer pH 4.8

เตรียม 0.1M citric acid : ละลาย citric acid ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 21.01 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

เตรียม 0.1M sodium citrate : ละลาย sodium citrate ($C_4H_4O_7Na_4 \cdot 2H_2O$) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล.

เตรียม citrate buffer pH 4.8 โดยผสม 0.1M citric acid ปริมาตร 230 มล. กับ 0.1M sodium citrate ปริมาตร 270 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 4.8 (ด้วย 0.1M citric acid และ/หรือ 0.1M sodium citrate)

ข. การเตรียม Alkalic copper reagent และ Arsenomolybdic acid reagent ปฏิบัติเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ TNC