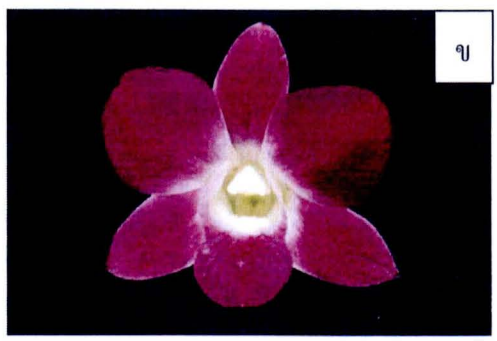
บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 ผลของน้ำตาลทรีฮาโลสและน้ำตาลซูโครสต่อคุณภาพและอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

3.1.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

ทำการเก็บเกี่ยวช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายในช่วงฤดูหนาวในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2553 จากสวนเกษตรกร ในเขตอำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Dendrobium* 'Red Sonia'(ดอกตูม 4 ดอกและดอกบาน 5 ดอก), *Dendrobium* 'Big White Jumbo'(ดอกตูม 6 ดอกและดอกบาน 6 ดอก), *Dendrobium* 'Miss Teen'(ดอกตูม 4 ดอกและดอกบาน 4 ดอก), *Dendrobium* 'Queen Pink' (ดอกตูม 4 ดอกและดอกบาน 4 ดอก) และ *Dendrobium* 'Yunan' (ดอกตูม 6 ดอกและดอกบาน 7 ดอก) และขนส่งโดยรถตู้ปรับอากาศมายังห้องปฏิบัติการสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน นำมาคัดเลือกดอกที่ไม่มีบาดแผล ไม่มีรอยช้ำ และไม่มีการเข้าทำลายของโรค จากนั้นนำช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้มาตัดปลายก้านช่อดอกใต้น้ำให้มีความยาว 15 เซนติเมตร เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 3.1 ดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 5 สายพันธุ์ คือ 'Red Sonia'(ก) 'Queen Pink'(ข) 'Miss Teen'(ค) 'Big White Jumbo'(ง) และ 'Yunan'(จ)

3.1.2 วิธีการทดลอง

นำช่อดอกกล้วยไม้ที่เตรียมได้จากขั้นตอนในข้อ 3.1.1 ปักลงในน้ำยาปักแจกันต่างๆ วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพแสงธรรมชาติ โดยแบ่งการทดลองออกเป็นทรีทเมนต์ ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 ปักในน้ำกลั่น (Control)
ทรีทเมนต์ที่ 2 ปักในสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 3 ปักในสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 4 ปักในสารละลายน้ำตาลทรีฮาโลส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 5 ปักในสารละลายน้ำตาลทรีฮาโลส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 10 ซ้ำ โดย 1 ช่อ เท่ากับ 1 ซ้ำ ทำการบันทึกผลการทดลองทุก 2 วัน ดังนี้

3.1.3 การบันทึกผลการทดลอง

3.1.3.1 อายุการปักแจกัน

เกณฑ์ในการกำหนดอายุการปักแจกันคือ เมื่อจำนวนดอกตูมและดอกบานในแต่ละช่อดอก เกิดอาการเสื่อมสภาพ เช่น ดอกคว่ำ ดอกเหี่ยว หรือดอกร่วง มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนดอกทั้งหมดในช่อดอก ถือว่าหมดอายุการปักแจกัน

3.1.3.2 น้ำหนักสดของช่อดอก

ชั่งน้ำหนักช่อดอกกล้วยไม้ในแต่ละวัน นำค่าที่อ่านได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักสด

$$\text{น้ำหนักสดของช่อดอก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักดอกวันหลัง} \times 100}{\text{น้ำหนักดอกวันแรก}}$$

3.1.3.3 การบานของดอกตูม

นับจำนวนดอกตูมที่บานเพิ่มขึ้นในแต่ละวัน แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การบานของดอกตูม

$$\text{การบานของดอกตูม (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนดอกตูมที่บาน} \times 100}{\text{จำนวนดอกตูมทั้งหมด}}$$

3.1.3.4 การเหี่ยวของดอก

นับจำนวนดอกเหี่ยว (ลักษณะดอกเริ่มหุบลง เส้นท่อลำเลียงน้ำและอาหารปรากฏชัดเจน ก้านดอกโค้งงอเล็กน้อย) เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเหี่ยวของดอก

$$\text{การเหี่ยวของดอก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนดอกเหี่ยวทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนดอกทั้งหมด}}$$

3.1.3.5 การหลุดร่วงของดอก

นับจำนวนดอกร่วงเพิ่มขึ้นในแต่ละวัน แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การร่วงของดอก

$$\text{การร่วงของดอก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนดอกร่วงทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนดอกทั้งหมด}}$$

3.1.3.6 การเสื่อมสภาพของช่อดอก

นับจำนวนดอกเหี่ยวและร่วงเพิ่มขึ้นในแต่ละวัน แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเสื่อมสภาพของช่อดอก

$$\text{การเสื่อมสภาพของช่อดอก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนดอกเหี่ยวและร่วงทั้งหมด} \times 100}{\text{จำนวนดอกทั้งหมดต่อช่อ}}$$

3.2 การทดลองที่ 2.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลทรีฮาโลสและน้ำตาลซูโครสกับน้ำยาปักแจกันสูตรทางการค้าต่อคุณภาพและอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ 'Yunan'

การทดลองนี้ได้เลือกสายพันธุ์ของดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ตอบสนองต่อน้ำยาปักแจกันชนิดต่างๆ ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ Yunan เนื่องจากดอกกล้วยไม้สายพันธุ์ Yunan มีอายุการปักแจกันได้นานที่สุด และเลือกใช้สารละลายน้ำตาลทรีฮาโลสและน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสามารถยืดอายุการใช้งานช่อดอกกล้วยไม้ดีที่สุด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับการใช้น้ำยาปักแจกันสูตรทางการค้า

3.2.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

ทำการเก็บเกี่ยวช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ 'Yunan' ที่มีดอกตูม 4 ดอกและดอกบาน 5 ดอก ช่วงฤดูร้อนในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 จากสวนเกษตรกรในอำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี และขนส่งโดยรถตู้ปรับอากาศมายังห้องปฏิบัติการสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน และคัดเลือกดอกที่ไม่มีบาดแผล ไม่มีรอยช้ำและไม่มีการเข้าทำลายของโรค จากนั้นนำช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้มาตัดปลายก้านช่อดอกใต้น้ำให้มีความยาว 15 เซนติเมตร แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 วิธีการทดลอง

นำช่อดอกกล้วยไม้ที่เตรียมได้จากขั้นตอนในข้อ 3.2.1 ปักลงในน้ำยาปักแจกันต่างๆ วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพแสงธรรมชาติ โดยแบ่งการทดลองออกเป็นทรีทเมนต์ ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 ปักในน้ำกลั่น (Control)
ทรีทเมนต์ที่ 2 ปักในสารละลาย 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 3 ปักในสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 4 ปักในสารละลายน้ำตาลทรีฮาโลส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 5 ปักในน้ำยาปักแจกันสูตรทางการค้าชนิด A®(น้ำตาลกลูโคส ร่วมกับ Citric Acid)
ทรีทเมนต์ที่ 6 ปักในน้ำยาปักแจกันสูตรทางการค้าชนิด B®(น้ำตาล ร่วมกับ Citric Acid)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 10 ซ้ำ โดย 1 ช่อ เท่ากับ 1 ซ้ำ

3.2.3 การบันทึกผลการทดลอง

ติดตามการเปลี่ยนแปลงทุก 2 วัน โดยบันทึกผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อที่ 3.1.3.1 ถึง ข้อ 3.1.3.6

3.2.3.1 อัตราการดูดน้ำ

วัดโดยการดึงก้านดอกให้เหนือระดับน้ำกลั่นหรือสารละลายในหลอด แล้วอ่านค่าปริมาตรของระดับน้ำกลั่นหรือสารละลายที่ดอกกล้วยไม้ดูดไปใช้ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร

อัตราการดูดน้ำ = ปริมาณน้ำยาปักแจกันวันก่อน - ปริมาณน้ำยาปักแจกันวันหลัง

3.2.3.2 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำยาปักแจกัน (ดัดแปลงมาจาก สุกัญญา เอี่ยมละออ, 2548)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำยาปักแจกันโดยนำช่อดอกกล้วยไม้จำนวน 5 ช่อ ปักในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่น้ำยาปักแจกัน 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างโดยดูดน้ำยาปักแจกันปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยดูดน้ำยาปักแจกันปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรเทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ Nutrient Agar (NA) หลังจากนั้นทำการเกลี่ยน้ำยาปักแจกันให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง และนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เก็บที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีประมาณ 30 – 300 โคโลนี (ถ้ามีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เกินจำนวนให้ทำการ Dilution น้ำยาปักแจกัน โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตรผสมกับน้ำยาปักแจกันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ) ทำการวิเคราะห์ทุกๆ 7 วัน

สูตรการคำนวณ

จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ = ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ × Dilution

นำจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มาคำนวณ และรายงานผลในหน่วย Log CFU/ml

3.2.3.3 อัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีน

เตรียมช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวาย 'Yunan' จำนวน 3 ช่อ ทำการชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นบรรจุลงในกล่องพลาสติกขนาด 15×20×40 เซนติเมตร ทำการปิดฝากล่องให้สนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ CO_2 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างก๊าซปริมาณ 1

มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu รุ่น GC-8A) ชนิด Thermal Conductivity Detector (TCD) ที่มี Column ชนิดท่อเหล็กไร้สนิม เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 4 มิลลิเมตร ยาว 1.5 เมตร ภายในบรรจุด้วย Porapak Q 80-100 Mesh ซึ่งมี Helium เป็น carrier ค่าที่วิเคราะห์ได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์คาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปคำนวณอัตราการหายใจ แสดงผลในหน่วย mg CO_2/kg.hr

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$CO_2 \text{ Production (mg } CO_2\text{/kg.hr)} = \frac{\text{void} \times (CO_2 - 0.03)}{100 \times g \times t} \times \frac{4{,}400}{22.4\,(1 + T/273)}$$

กำหนดให้

void	=	ปริมาตรที่วางในกล่อง (มิลลิลิตร)
CO_2	=	ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ (ร้อยละ)
g	=	น้ำหนักพริกชี้ฟ้า (กิโลกรัม)
t	=	เวลาที่ปิดกล่อง (ชั่วโมง)
T	=	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอทิลีนทำการสุ่มตัวอย่างก๊าซปริมาตร 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatograph (Shimadzu รุ่น GC-8A) ติดตั้งด้วย flame ionization detector (FID) และใช้คอลัมน์ชนิด Porapak Q Mesh 60-80 โดยมี N_2 เป็น Carrier gas ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น ppm แล้วนำค่าที่อ่านได้จากเครื่องไปคำนวณค่าอัตราการผลิตเอทิลีน ซึ่งมีหน่วยเป็น μlC_2H_4/kg.hr

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$C_2H_4 \text{ Production } (\mu lC_2H_4\text{/kg.hr}) = \frac{X \times Y}{\text{Product wt. (kg)} \times T \text{ (h)}}$$

กำหนดให้

X	=	ปริมาณก๊าซเอทิลีน (ppm)
Y	=	$\frac{V\text{-}W}{1000}$ = ปริมาตรช่องว่าง (L)
V	=	ปริมาตรภาชนะบรรจุ (ml)
W	=	น้ำหนักตัวอย่าง (kg)
T	=	เวลาในการกักตัวอย่าง (h)

3.3 การทดลองที่ 2.2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทสในดอกตูมและดอกบานของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ 'Yunan'

3.3.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

ทำการเก็บเกี่ยวช่อดอกกล้วยไม้สายพันธุ์ 'Yunan' ที่มีดอกตูม 4 ดอกและดอกบาน 4 ดอกในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2554 จากสวนเกษตรกรในอำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี และขนส่งโดยรถตู้ปรับอากาศมายังห้องปฏิบัติการสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี วิทยาเขตบางขุนเทียน และคัดเลือกดอกที่ไม่มีบาดแผล ไม่มีรอยช้ำ และไม่มีการเข้าทำลายของโรค จากนั้นนำช่อดอกกล้วยไม้ที่ได้มาตัดปลายก้านช่อดอกใต้น้ำให้มีความยาว 15 เซนติเมตร แล้วนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 วิธีการทดลอง

นำช่อดอกกล้วยไม้ที่เตรียมได้จากขั้นตอนในข้อ 3.3.1 ปักลงในน้ำยาปักแจกันต่างๆ วางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพแสงธรรมชาติ โดยแบ่งการทดลองออกเป็นทรีทเมนต์ ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 ปักในน้ำกลั่น (Control)
ทรีทเมนต์ที่ 2 ปักในสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 3 ปักในสารละลายน้ำตาลทรีฮาโลส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ 8-HQS ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
ทรีทเมนต์ที่ 4 ปักในน้ำยาปักแจกันสูตรทางการค้าชนิด A®(น้ำตาลกลูโคส ร่วมกับ Citric Acid)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design โดยแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ โดย 1 ช่อ เท่ากับ 1 ซ้ำ ทำการสุ่มตัวอย่างดอกกล้วยไม้ดอกตูมตำแหน่งที่ 1 และ 2 ถัดจากดอกบานและดอกบานตำแหน่งที่ 3 และ 4 จากปลายช่อดอก ในวันที่ 0 1 3 5 และ 9 เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์อินเวอร์เทสดังนี้

3.3.3 สกัดและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส (ดัดแปลงจากวิธีของ Pramanik และคณะ , 2004)

ก. การเตรียมถุงไดอะไลซ์

นำถุงไดอะไลซ์แช่ในน้ำกลั่นทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดโดยเติม EDTA ปริมาตร 0.293 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 5 ครั้ง (ถ้ายังไม่ใช้ทันทีให้แช่ในน้ำกลั่น)

ข. การสกัดตัวอย่าง

นำตัวอย่างดอกกล้วยไม้หนัก 2 กรัม ซึ่งแยกตามตำแหน่งดอกตูมและดอกบาน จากนั้นเติม polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และเติมบัฟเฟอร์ citrate-phosphate (C-P buffer) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (pH 5.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นกรองด้วยผ้ากรอง 3 ชั้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดโดยเติม NaCl C-P buffer ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าเป็นระยะๆ จากนั้นนำส่วนใสมาใส่ในถุงไดอะไลซ์ ทำการแช่ใน C-P buffer ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (pH 5.0) (ที่เจือจางแล้ว 40 เท่า) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้ส่วน cell wall invertase (ขั้นตอนทั้งหมดทำที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส)

ค. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินเวอร์เทส

นำเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติม C-P buffer ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (pH 5.0) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร และน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมา incubate ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำตัวอย่างมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย NaOH 1.0 N หรือ HCl 1.0 N หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการของ Nelson (Hodge and Hofreiter, 1962) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

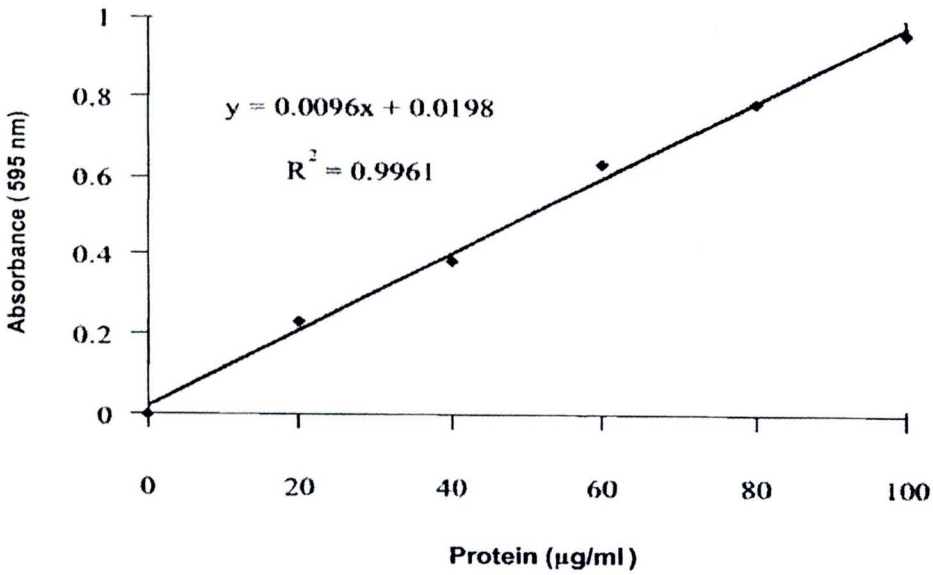
วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการของ Nelson (Hodge and Hofreiter, 1962)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงซ์ (reducing sugar) ประกอบด้วย C-P buffer ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (pH 5.0) และสารละลายดี-กลูโคส (D-glucose) ความเข้มข้น 0.00-0.04 เปอร์เซ็นต์ (เพื่อทำกราฟมาตรฐาน) ส่วนการวิเคราะห์ตัวอย่างให้ดูดสารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร (จากข้อ 3.3.3 ค.) จากนั้นเติม Nelson's alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วปิดด้วย แผ่น

อะลูมิเนียมฟอยด์ นำไปแช่ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำไปทำให้เย็น แล้วเติมสารละลาย arsenomolybdic acid reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนของ Cu_2O ละลายหมด ทำการปรับปริมาตรเป็น 12.5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic Unicam Genesys 10 UV) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Bradford (1976)

ดูดสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากถุงไดอะไลซ์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Coomassie Brillant Blue G-250 ความเข้มข้น 0.0125 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5- 60 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 nm ด้วยเครื่อง UV-240 Spectrophotometer โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 3.2 กราฟโปรตีนมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร