บทที่ 3

วิธีการทดลอง

วัตถุดิบ

-น้ำผึ้ง ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มี 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ(Snake Root,Eupatorium odoratum Linn.) น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ (Lychee,Litchi chinensis Sonn.) น้ำผึ้งจากดอกลำไย (Longan,Dimocarpus longan Lour.) และน้ำผึ้งจากดอกนุ่น (Kapok,Bombax ceiba Linn.) น้ำผึ้งทุกตัวอย่างเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

-น้ำองุ่น น้ำองุ่นที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นน้ำองุ่นสด

สารเคมี

-สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำผึ้งและน้ำองุ่น

boric acid	A.R. grade
copper sulphate	A.R. grade
folin-ciocalteu phenol	A.R. grade
sodium carbonate	A.R. grade
methylene blue	A.R. grade
phenolphthalein	A.R. grade
potassium sulphate	A.R. grade
hydrochloric acid	A.R. grade
methyl red	A.R. grade
sulfuric acid	A.R. grade

sodium potassium tartrate	A.R. grade
sodium hydroxide	A.R. grade

-สารเคมี ที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน

tris-(hydroxymethyl- aminomethane)	A.R. grade
hydrochloric acid	A.R. grade
glycine	A.R. grade
TEMED(N,N,N´N´-tetramethylenediamine)	A.R. grade
acrylamide	A.R. grade
N,N´-methylenebisacrylamide	A.R. grade
ammonium persulphate	A.R. grade
acetic acid	A.R. grade
methanol	A.R. grade
2-mercaptoethanol	A.R. grade
sodium dodecyl sulphate	A.R. grade
silver nitrate	A.R. grade
40% methylamine	A.R. grade
citric acid	A.R. grade
40% formaldehyde	A.R. grade
sodium chloride	A.R. grade
cupric sulphate	A.R. grade
30% ammonium hydroxide	A.R. grade
sodium thiosulphate pentahydrate	A.R. grade

-สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

sodium hydroxide	A.R. grade
copper sulphate	A.R. grade
sodium potassium tartrate	A.R. grade
sodium carbonate	A.R. grade

folin ciocalteu phenol	A.R. grade

-สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธี gel filtration

monobasic potassium phosphate	A.R. grade
dibasic potassium phosphate	A.R. grade
potassium dichromate	A.R. grade
blue dextran	A.R. grade

-สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณแทนนิน

tannic acid	A.R. grade
folin ciocalteu phenol	A.R. grade
sodium carbonate	A.R. grade

-สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล

absolute ethanol	A.R. grade

-สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี

oxalic acid	A.R. grade
L-ascorbic acid	A.R. grade
2-6-dichlorophenol indophenol	A.R. grade

โปรตีนมาตรฐาน

-โปรตีนมาตรฐานสำหรับวิธี electrophoresis

α-lactalbumin,bovine milk น้ำหนักโมเลกุล 14200

trypsin น้ำหนักโมเลกุล 24000

carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุล 29000

pepsin น้ำหนักโมเลกุล 34700

albumin chicken egg (ovalbumin) น้ำหนักโมเลกุล 45000

bovine serum albumin (B.S.A.) น้ำหนักโมเลกุล 66000 (monomer), 132000 (dimer)

-โปรตีนมาตรฐานสำหรับวิธี gel filtration

β-lactoglobulin มวลโมเลกุล 18400 ดาลตัน

trypsin มวลโมเลกุล 24000 ดาลตัน

pepsin มวลโมเลกุล 34700 ดาลตัน

albumin chicken egg มวลโมเลกุล 45000 ดาลตัน

bovine serum albumin มวลโมเลกุล 68000 ดาลตัน

ครุภัณฑ์

-ชุด electrophoresis unit ของ Mupid-2 ประกอบด้วย

- gel maker set
- cover for PAGE
- gel maker plate
- power supply 100 V.

-หม้อแปลงไฟฟ้าจากขนาด 220 V. เป็น 100 V.

-เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Photic-100 ของ Erma Tokyo Japan

-เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น 601ของ Milton Roy

-เครื่องวัดสี (colorimeter) ชนิดโลวิบอนด์ (Lovibond Flexible Optic Tintometer) รุ่น AF751

-เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ชนิด Sartorius รุ่น B410

-เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ชนิด Sartorius รุ่น 1518

-เครื่องปั่นกวน (magnetic stirrer) ของ Agimatic-N

-คอลัมน์แก้วขนาด 1.6 x 60 ซม.

-ชุดหาปริมาณโปรตีน (Micro-Kjeldahl)ของ Gerhardt ประกอบด้วย

-ชุดกลั่นของ Gerhardt

-ชุดย่อยของ Kjeldatherm

-เตาเผา (muffle furnace) ของ Carbolite รุ่น MEL 11-2

-อ่างอาบน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของ Memsmert ,Germany

-ตู้อบสำหรับหาความชื้น (hot air oven) ของ WTB Binder

-เครื่องวัด pH รุ่น 8417 ของ Hanna 8417

-hand refractometer ในช่วง 0-32 ^{O}Brix ,58-90^{O}Brix

-ถ้วยกระเบื้องเผาชนิดทนร้อน (crucible)

-เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer) ของ Lab Line System U.S.A.

-เครื่องแก้วสำหรับงานวิเคราะห์ทางเคมี เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต หลอดทดลอง และขวดรูปชมพู่ เป็นต้น

วัสดุอุปกรณ์

-กระดาษกรองของ whatman เบอร์ 1

-ใยแก้ว (glass wool)

-ตัวกลาง sephadex G-150 ของบริษัท Pharmacia

-dialysis bag ชนิด regenerated cellulose เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 20 มม.(0.80 นิ้ว) ความกว้างเฉลี่ย 32 มม.(1.3 นิ้ว) มีช่วง molecular weight cut off 12000 ของ Sigma

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

-<u>น้ำผึ้งที่ใช้ในการทดลองนี้มี 4 ชนิด</u> คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่นโดยทำ 2 ซ้ำ ต่อตัวอย่าง สมบัติที่วิเคราะห์ ได้แก่

-ความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

-โปรตีน ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

-น้ำตาลรีดิวซิ่ง(reducing sugar) ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

-เถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.)

-pH โดยใช้ pH Meter ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.)

-ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้ hand refractometer(ภาคผนวก ก.)

-ความเป็นกรด ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

-น้ำองุ่นที่ใช้ในการทดลอง สมบัติที่วิเคราะห์ ได้แก่

-pH โดยใช้ pH Meter ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

-ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้โดยใช้ hand refractometer ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

-ปริมาณกรด(ในรูปกรดทาร์ทาริก) ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

-ปริมาณวิตามินซี ตามวิธีของ Pearson(1976) (ภาคผนวก จ.)

-ปริมาณแทนนินในรูปกรดแทนนิค โดยดัดแปลงจากวิธีของ Rosenblatt and Peluso,1941;Singleton and Rossi,1965;Ranganna,1977 ; Lee, 1984 (ภาคผนวก ค.)

ศึกษาวิธีการวัดปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งที่ต่างกันและเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีน ดังต่อไปนี้คือ

-ศึกษาวิธีการวัดปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งที่ต่างกันที่ผ่านการทำ dialysis (ดัดแปลงจากงานของ White and Kushnir,1967;White and Rudyi,1978;Bollag and Edelstein, 1991)

การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ใช้ในการวิเคราะห์มา 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 70 มล. ใช้แท่งแก้วคนน้ำผึ้งให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน

การเตรียมหลอด dialysis

นำหลอด dialysis มาทำการกำจัดสารบนเนื้อที่บนอยู่ โดยการต้มในสารละลาย 10 mm.sodium bicarbonate อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นทำการล้างหลอด dialysis ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

วิธีการทำ

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่เตรียมเรียบร้อยแล้วมาเทลงในหลอด dialysis ที่เตรียมไว้ ปลายข้างหนึ่งของหลอดผูกมัดปมด้วยเส้นด้ายให้แน่น และ อีกข้างหนึ่งนำกรวยแก้วสอดเข้าไปในหลอดค่อย ๆ เทตัวอย่างน้ำผึ้งจากบีกเกอร์ลงในหลอด dialysis ล้างบีกเกอร์ด้วยน้ำกลั่น ให้สะอาดหลาย ๆ รอบ และนำน้ำล้างที่ได้เทลงไปในหลอด dialysis จากนั้นมัดปากหลอดให้แน่นด้วยเส้นด้าย ในขั้นตอนนี้กระทำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันอากาศเพร่ผ่านเข้าไปในหลอด ค่อย ๆ ผสมสารละลายในหลอด dialysis ให้เป็นเนื้อเดียวกันและนำหลอด dialysis ที่เตรียมได้บรรจุอยู่ใน erlenmeyer flask ขนาด 1ลิตร ภายในบรรจุน้ำกลั่นเป็นตัวกลางและตั้งอยู่บน magnetic stirrer ที่มีแท่งแม่เหล็กปั่นกวน ทำในห้องเย็น ที่ควบคุมอุณหภูมิในช่วง 3-4 ^{o}ซ.นาน 24ชั่วโมง จากนั้น ใช้วัตถุปลายแหลมเจาะหลอด dialysis ลงใน erlenmeyer flask แห้งขนาด 50 มล. และนำปริมาตรสารละลายที่ได้มาทำการชั่งน้ำหนัก (tenate)ที่ได้

นำปริมาตรสารละลายที่ผ่านการทำ dialysis (tenate) ที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีดังต่อไปนี้ (โดยดัดแปลงจากงานของ White and Kushnir,1967;White and Rudyi,1978)

-วิธี Lowry โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lowry และคณะ(1951) (ภาคผนวก ข.)

-วิธี uv-absorption ตามวิธีของ Bollag และ Edelstein(1981)

-วิธี Kjeldahl โดยดัดแปลงจากวิธีของ AOAC(1990)(ภาคผนวก ก.)

เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้ทั้ง 3 วิธี คือ Lowry,uv-absorption และ วิธี Kjeldahl และหาปริมาณโปรตีนที่สูญเสียไปในระหว่างการทำ dialysis และนำผลที่ได้ไปใช้ในการศึกษาหามวลโมเลกุลโดยวิธี gel filtration ต่อไป

วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลแบบ randomized complete block design (RCBD) ขนาด 4x3 ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan new

multiple range test (Cochran and Cox,1957)

-ศึกษาวิธีการวัดปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งที่ผ่านการทำ dialysis

นำตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และ น้ำผึ้งปุน โดยการนำน้ำผึ้งแต่ละชนิดมาเจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 คนให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.) (ดัดแปลงจากวิธีของ White and Kushnir,1967; Marshall and Williams,1987)

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD)ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan new multiple range test(Cochran and Cox, 1957)

เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในน้ำผึ้งที่สูญเสียไปในระหว่างการทำ dialysis

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design ขนาด 2x4 ทดลอง 2 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan new multiple range test (Cochran and Cox,1957)

และนำผลที่ได้ไปใช้ในการศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี electrophoresis ต่อไป

ศึกษารูปแบบของโปรตีนของน้ำผึ้ง โดยวิธีการดังต่อไปนี้

-polyacrylamide gel electrophoresis (ดัดแปลงจากวิธีของ Davis,1964 ;Bryan,1977;Hames and Rickwood,1990) วิธีการทดลองดังรายละเอียด คือ

การเตรียมสารเคมี (ดัดแปลงจาก Plumer,1971;Hames and Rickwood,1990)

-acrylamide:bismethyleneacrylamide (30:0.8) ชั่ง acrylamide 15 กรัม และ bismethyleneacrylamide 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 50 มล.ด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายที่เตรียมได้นี้ผ่านกระดาษ

กรอง whatman no.1 และเก็บสารละลายนี้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิไม่เกิน 4°ซ.(เก็บสารละลายนี้ได้นานไม่เกิน 2 สัปดาห์)

หมายเหตุ acrylamide เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อผิวหนังและระบบประสาทได้

-resolving gel buffer pH 8.8 ชั่ง tris (hydroxymethyl)-aminomethane 18.15 กรัม และเติม 1N HCl 24 มล. ลงไปคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 50 มล.ด้วยน้ำกลั่น (เช็คpH สุดท้ายของ buffer) (เก็บสารละลายที่อุณหภูมิไม่เกิน 4°ซ.)

-1.5% ammonium persulphate ชั่ง ammonium persulphate 0.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มล. คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน (สารละลายนี้ไม่ค่อยเสถียร ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน)

-tracking dye ชั่ง bromophenol blue 0.1กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล.

-tris-glycine electrode buffer pH 8.3 (reservoir buffer) ชั่ง tris- (hydroxymethyl)-aminomethane 3.03 กรัม และ glycine 14.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร(เช็ค pH สุดท้ายของ Buffer ด้วย)

-50% sucrose ชั่งsucrose 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 100 มล.หรืออาจใช้กลีเซอรอล แทนได้

staining solution งานวิจัยนี้เลือกใช้วิธี silver staining แบบ non-ammonical silver staining ในการย้อมเจลดังรายละเอียดต่อไปนี้คือ (ดัดแปลงจากวิธี Marshall,1984;Marshall and Williams,1987)

-0.1% v/v formaldehyde solution ปิเปต 40% formaldehyde มา 0.5 มล. เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ ๆก่อนการใช้งาน)

-diamine solution เตรียมโดยปิเปต 30% methylamine solution มา 2 มล. ผสมกับ 0.36% sodium hydroxide 10 มล. จากนั้นเตรียม 20% w/v silver nitrate มา 4 มล.ค่อย ๆ หยดลงในสารละลายที่เตรียมได้จะเกิดตะกอนสีน้ำตาลคนให้เข้ากันจนได้สารละลายใสและทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มล.(สารละลายอาจจะขุ่นในระหว่างการบ่ม และเตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน)

I64582bb

หมายเหตุ diamine solution เป็นสารที่ระเบิดได้ (explosive) จึงต้อง neutralize ทันทีด้วย HCl ก่อนทิ้ง

-developer solution เตรียมโดยปิเปต 1% w/v citric acid มา 1 มล.ผสมกับ 40% v/v formaldehyde 0.2 มล. จากนั้น เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 200 มล.(เตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้ง ก่อนการใช้งาน)

destaining solution (ดัดแปลงจากวิธี Marshall,1984 ; Marshall and Williams,1987)

-A: ชั่งsodium chloride 11.1 กรัม และ cupric sulphate 11.1กรัม ละลายในน้ำกลั่น 285 มล.และค่อย ๆเติม 25% ammonium hydroxide ทีละหยดลงไปจนกระทั่งตะกอนใส และให้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม

-B: ชั่ง sodium thiosulphate pentahydrate 44 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 85 มล. ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน

นำสารละลายที่เตรียมได้จาก A และ B ผสมกันในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 และ ปรับปริมาตรสารละลายให้เท่ากัน(เตรียมสารละลายนี้ใหม่ ก่อนการใช้งาน)

การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง (ดัดแปลงจาก Marshall and Williams,1987) โดยการนำน้ำผึ้งมาเจือจางกับน้ำในอัตราส่วน 1ต่อ1 ผสมกับ tracking dye และ 50% sucrose (หรือ glycerol)ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ต่อ 0.5 ผสมให้เข้ากัน และใช้ micropipette หยดลงในเจลที่เตรียมไว้

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (ดัดแปลงจาก Davis,1964;Bryan,1977)โดยการนำโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล 4 ชนิด คือ α-lactalbumin น้ำหนักโมเลกุล 14200, carbonic anhydrase น้ำหนักโมเลกุล 29000, albumin chicken egg น้ำหนักโมเลกุล 45000 และ bovine serum albumin (monomer) น้ำหนักโมเลกุล 66000 และ (dimer) 132000 นำมาเตรียมในรูปสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นประมาณ 1 มก./มล. จากนั้นนำมาผสมกับ tracking dye และ 50 %sucrose ในอัตราส่วน 1 ต่อ 0.5 ต่อ 0.5 ผสมให้เข้ากัน ทำนองเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง และใช้ micropipette หยดลงในเจลที่เตรียมไว้วิธีการเดียวกับกับการเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

การเตรียมเจล (ดัดแปลงจาก Hames and Rickwood,1990)โดยการเตรียมความ

เข้มข้นของเจลร้อยละ 10 ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 วิธีการเตรียมเจล **polyacrylamide gel electrophoresis** ที่ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 10

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (มล.)
acrylamide:bisacrylamide(30:0.8)	10.00
resolving gel buffer	3.75
1.5% ammonium persulphate	1.50
water	14.75
TEMED	0.02
ปริมาตรรวม	30.02

<u>วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส</u> (ดัดแปลงจาก Hames and Rickwood,1990)

เตรียมชุดอุปกรณ์เตรียมเจลโดยการวางแผ่นพลาสติก (plate) ขนาด 108x59x4 มม. ลงบน plate ที่เตรียมไว้ และวางแผ่นพลาสติกอีกอันประกบคู่กัน นำหัวมากดลงบนแผ่นพลาสติกที่เตรียมไว้เตรียมสารละลายโดยการผสมสารละลายที่มีองค์ประกอบตามตารางที่ 3 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ยกเว้น ammonium persulphate และ TEMED ซึ่งจะใส่ตามทีหลัง โดยใช้หลอดหยด (dropper) ค่อย ๆ หยดลงบนขอบพลาสติกอีกด้านหนึ่งให้เต็มผิวหน้าโดยไม่ให้มีฟองอากาศอยู่เหนือผิวหน้าเจล ทิ้งไว้รอให้เจลแข็งตัวใช้เวลาประมาณ 45 นาที และนำหวีที่เสียบอยู่ออกจะได้เจลที่มีหลุมเล็ก ๆ (slot) ขนาดพอเหมาะสำหรับหยดตัวอย่าง นำเจลที่เตรียมได้ออกจากแม่พิมพ์ และนำตัวอย่างน้ำนึ้งที่เตรียมได้หยดลงในแม่พิมพ์โดยใช้ micropipette หยดลงในแต่ละหลุม ๆ ละ 5 μl. นำเจลที่ผ่านการหยดตัวอย่างแล้ว นำไปวางในเครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีสที่เตรียมในสารละลาย tris-glycine electrode buffer pH 8.3 ที่เป็นตัวกลางต่อเครื่องเข้ากับหม้อแปลงไฟฟ้าแปลงจาก 220V. เป็น 100V.ผ่านกระแสไฟฟ้า 0.6A. ใช้เวลาประมาณ 1.5 ชม. จนกระทั่งแถบของสีย้อมเคลื่อนที่ไปยังขอบสุดท้ายของเจลประมาณ 1 ซม. จึง

โคลสวิทซ์ หยุดการทำงาน วัดระยะที่สีย้อมเคลื่อนที่ไปถึงปลายสุดของเจล

วิธีการย้อมเจล (staining) (ดัดแปลงจากวิธีของ Marshall,1984; Marshall and Williams,1987)

นำเจลที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้ว แช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 50% methanol และ 10% acetic acid (เพื่อตรึงโปรตีน) เป็นเวลา 48 ชม.ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ. 2 ครั้ง นาน 10 และ 20 นาที และนำเจลที่ได้มาแช่ในสารละลาย 0.1% v/v formaldehyde ที่อุณหภูมิ 60^{o}ซ. นาน 30 นาที นำเจลที่ได้มาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 10 นาที และแช่ในสารละลาย diamine ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เทสารละลาย diamine ออกจากเจลอย่างรวดเร็ว ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ.หลาย ๆ ครั้ง ๆ ละมาก ๆ ทำการ developเจลด้วย developer 2 ครั้ง ๆ ละนานประมาณ 5 นาที จนกระทั่ง background เป็นสีดำ และแถบของโปรตีนจะปรากฏให้เห็นได้ภายใน 5 นาทีแรก และค่อย ๆ เข้มขึ้น ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60^{o}ซ. 2 ครั้ง นาน 10 และ 20 นาที ครั้ง ๆละ มาก ๆ และ ทำการเก็บเจลโดยแช่เจลไว้ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการล้างสีย้อม (destaining) (ดัดแปลงจากวิธีของ Marshall ,1984)

นำเจลที่ผ่านการย้อมสีนำมาแช่ใน destaining solution นานประมาณ 1-4 นาที จนกระทั่ง background เป็นสีเหลืองออกน้ำตาลอ่อน ๆ ล้างเจลที่ผ่านการย้อมสีอย่างรวดเร็วด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง ๆ ละมาก ๆ วัดระยะทาง (migration distance) จากขอบเจลที่ได้ถึงส่วนกลางของโปรตีนและหารด้วย migration distance ของโปรตีนแต่ละชนิดด้วยระยะทางของ tracking dye(ซึ่งวัดจากขอบของเจลถึงส่วนกลางของ tracking dye) และนำมาคำนวณหาค่า relative mobility (R_f) จากสูตร

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่แถบโปรตีนแต่ละชนิดเคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะที่แถบสีย้อมเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$

และถ่ายรูปลักษณะของแถบที่ได้จากการทดลอง

-sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (ดัดแปลงจากวิธี Weber and Osborn,1969;Davies and Stark,1970;Laemmli,1970; Hames and Rickwood,1990) วิธีการทดลองดังรายละเอียด คือ

การเตรียมสารเคมี (ดัดแปลงจาก Hames and Rickwood,1990) สารเคมีที่ใช้ในวิธีนี้โดยส่วนใหญ่จะเหมือนกับวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ยกเว้นสารเคมีบางชนิดที่แตกต่างกันไป ดังต่อไปนี้

-10% sodium dodecyl sulphate ชั่ง sodium dodecyl sulphate 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. สารละลายที่เตรียมได้นี้ต้องใสไม่ขุ่น

-reservoir buffer pH 8.3 (0.025 m.tris-HCl,0.2 m.glycine) ชั่ง tris (hydroxymethyl)- aminomethane 3.03 กรัม glycine 14.4 กรัม และ sodium dodecyl sulphate 1กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายของสารละลายเป็น 1000 มล.(เช็ค pH สุดท้ายของ buffer ด้วย)

-resolving gel buffer pH 8.8 (0.375 m.tris-HCl) ชั่ง tris (hydroxymethyl)- aminomethane 2.27 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับpH ของสารละลายที่ได้ด้วยกรด HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 8.8 เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 50 มล.

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (ดัดแปลงจาก Weber and Osborn,1969; Davies and Stark,1970;Laemmli,1970) โดยการนำโปรตีนมาตรฐาน 3 ชนิดที่ทราบมวลโมเลกุล คือ trypsin น้ำหนักโมเลกุล 24000,pepsin น้ำหนักโมเลกุล 34700 และ bovine serum albumin น้ำหนักโมเลกุล 66000 มาเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้นเท่ากันประมาณ 1มก./มล. นำมาผสมกับ sample buffer solution 0.0625 m. *tris (hydroxy-methyl)-aminomethane pH 6.8 ที่ประกอบด้วย tris 0.38 กรัม sodium dodecyl sulphate 0.5 กรัม 2-mercaptoethanol 0.5 มล. 1% bromophenol blue 1 มล.urea 18 กรัม และ 20% glycerol เจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 50 มล.จากนั้นนำไปผสมในตัวอย่างที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1ต่อ1 และนำสารละลายที่ได้ไปต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ^{o}ซ. นาน 5 นาที ทิ้งให้เย็น และใช้ micropipette หยดลงในเจลที่เตรียมไว้

การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง (ดัดแปลงจาก Marshall and Williams,1987) โดยการนำน้ำผึ้งนำมาผสมกับ sample buffer solution 0.0625 m.tris-HCl, pH 6.8 ที่ประกอบด้วย 2% (w/v) sodium dodecyl sulphate, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol และ 20% (w/v) glycerol ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้น นำไปต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100^{o}ซ. นาน 5 นาที ทำให้เย็นและใช้ micropipette หยดลงในเจลที่เตรียมไว้

การเตรียมเจล (ดัดแปลงจาก Hames and Rickwood,1990) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 วิธีการเตรียมเจล sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของเจลร้อยละ 10

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (มล.)
acrylamide:bisacrylamide(30:0.8)	10.00
resolving gel buffer	3.75
10% sodium dodecyl sulphate	0.30
1.5% ammonium persulphate	1.50
water	14.45
TEMED	0.02
ปริมาตรรวม	30.02

วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส (ดัดแปลงจาก Hames and Rickwood,1990) เช่นเดียวกับวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ทุกประการ

วิธีการย้อมเจล (staining) (ดัดแปลงจากวิธีของ Marshall,1984; Marshall and Williams,1987) เช่นเดียวกับวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ทุกประการ

วิธีการล้างสีย้อม (destaining)(ดัดแปลงจากวิธีของ Marshall,1984) เช่นเดียวกับวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ทุกประการ

จากนั้นนำเจลที่ได้มาวัดค่า relative mobility (R_f) ของตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐาน จากนั้น คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่แยกได้โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานโดยการพล็อตกราฟมาตรฐาน(semi-logarithm) ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับค่า relative mobility

โดยเปรียบเทียบรูปแบบการแยกที่ได้ทั้ง 2 วิธี

การหามวลโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี gel filtration (ดัดแปลงจากวิธีของ Leach and O´Shea,1965;White and Kushnir,1967 ;Lee et al.,1985,1990) วิธีการทดลองดังรายละเอียด คือ

การเตรียม sephadex G-150

แช่ sephadex G-150 ประมาณ 1.0 กรัม ในสารละลาย 0.01m. potassium phosphate buffer pH 6.5 ที่มีปริมาตรมากเกินพอให้พองเจล นำ sephadex G-150 ที่เตรียมได้นำไปต้มในอ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 80^{o} ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อไล่อากาศออกและให้เม็ดเจลพองตัวอย่างเต็มที่ หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หรือแช่เจลในบัฟเฟอร์ทิ้งค้างคืนอย่างน้อย 1 คืนก็ได้ เพื่อให้เม็ดเจลพองตัว

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (ดัดแปลงจากวิธีของ Leach and O´Shea ,1965; Plumer,1971)

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลได้แก่ bovine serum albumin มวลโมเลกุล 66000 ดาลตัน albumin chicken egg มวลโมเลกุล 45000 ดาลตัน pepsin มวลโมเลกุล 34700 ดาลตัน trypsin มวลโมเลกุล 24000 ดาลตัน และ β-lactoglobulin มวลโมเลกุล 18400 ดาลตัน มาเตรียมโดยละลายใน 0.01m. potassium phosphate buffer pH 6.5 โดยให้มีความเข้มข้นโปรตีนมาตรฐานอยู่ในช่วง 2-6 มก./มล.

การเตรียมตัวอย่างโปรตีนของน้ำผึ้ง (ดัดแปลงจากวิธีของ White and Kushnir, 1967) นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่เตรียมได้โดยผ่านการทำ dialysis ทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และ น้ำผึ้งนุ่นมาประมาณ 2-4 มล. คำนวณให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 4-6 มก.(ถ้ามีตะกอนให้กรองออกก่อนที่จะนำไปใช้งาน)

วิธีการหามวลโมเลกุลโปรตีน (ดัดแปลงจากวิธีของ Plumer,1971)

นำ sephadex G-150 ที่เตรียมได้นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดแก้วขนาด 1.6x60 ซม. ลงให้ได้ความสูงของเจลประมาณ 27 ซม. และตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 คืน เพื่อให้เม็ดเจลในคอลัมน์เรียงตัวอย่างสมดุล และทดสอบประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้โดยผ่านสารละลายผสมระหว่างบลูเดกซ์แตรนความเข้มข้น 3 มก./มล. และสารละลายโปตัสเซียมไดโครเมต 2

มก./มล. นำโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลที่ผ่านการเตรียม นำมาเติมลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ โดยใช้หลอดหยดตัวอย่างลงไปอย่างช้า ๆ ระวัง! อย่าให้ตัวอย่างกระทบกระเทือนผิวหน้าเจลเป็นอันขาด ชะ(elute)โปรตีนออกด้วยสารละลาย 0.01m:potassium phosphate buffer pH 6.5 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 1.5 มล. นำหลอดที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นม. และวัดปริมาตรที่สารละลายโปรตีนมาตรฐานผ่านออกมาจากคอลัมน์ (V_e) นำไปคำนวณค่า K_{av} จากสูตร

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

เมื่อ V_e คือ elution volume หรือปริมาตรของโปรตีนที่ผ่านออกจากคอลัมน์ (มล.)

V_0 คือ void volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายบลูเดกซ์แตรนผ่านออกมา (มล.)

V_t คือ ปริมาตรทั้งหมดของคอลัมน์ส่วนที่เจลบรรจุอยู่ (total bed volume) วัดได้จากปริมาตรที่สารละลายโปตัสเซียมไดโครเมตผ่านออกจากคอลัมน์ (มล.)

หลังจากนั้นคำนวณหามวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด โดยการวัดอยู่ในรูปของ V_e (elution Volume) และคำนวณหาค่า K_{av} ตามสูตรข้างบน

<u>วิธีการหามวลโมเลกุลของน้ำผึ้ง</u> (ดัดแปลงจากวิธีของ Leach and O´Shea, 1965; Plumer, 1971; White and Kushnir, 1967)

นำตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผ่านการเตรียมได้ทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่น มาใส่ในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ ด้วยวิธีเดียวกับวิธีการหามวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานทุกประการ แตกต่างกันตรงที่ว่า เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ลงในหลอดทดลองหลอดละ 2 มล.และนำหลอดทดลองแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นม. เพื่อทราบค่าโปรตีนโดยประมาณ เช่นเดียวกับการหามวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานทุกประการ และนำมาคำนวณหาค่า K_{av}ของตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 4ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งนุ่นจากสูตรข้างบน และเทียบหามวลโมเลกุลของน้ำผึ้งที่ได้จากกราฟมาตรฐานโดยสร้างกราฟ semi-logarithm ระหว่างค่า K_{av} และมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ completely randomized

design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองโดยใช้ Duncan new multiple range test (Cochran and Cox,1957)

ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส โดยวิธีการต่อไปนี้ (ดัดแปลงจากงานของ Kime,1982,1983;Lee,1984;Lee and Kime, 1984;Mc Lellan,Kime and Kime,1985;Wakayama and Lee, 1987)

-<u>การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง</u> นำตัวอย่างน้ำผึ้งทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และ น้ำผึ้งปุน มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และ นำมาใส่ในน้ำองุ่นที่เตรียมได้

-<u>การเตรียมน้ำองุ่น</u> นำองุ่นมาล้างน้ำทำความสะอาด เด็ดก้านออก ตีปนแบบหยาบ ๆ ด้วยเครื่องบด (blender) อย่าให้เมล็ดองุ่นแตก คั้นน้ำองุ่นที่ได้ผ่านผ้าขาวบาง กรอง และนำน้ำองุ่นที่เตรียมได้นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

สำหรับในขั้นตอนนี้ จะทำการศึกษาถึงตัวแปรที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส 2 ตัวแปร ได้แก่ ชนิดของน้ำผึ้ง 4 ชนิด คือ น้ำผึ้งสาบเสือ น้ำผึ้งลิ้นจี่ น้ำผึ้งลำไย และน้ำผึ้งปุน และความเข้มข้นของน้ำผึ้งต่างกัน 4 ระดับ คือ ร้อยละ 0,3,6 และ 9

<u>การวิเคราะห์และประเมินผล</u> ดังต่อไปนี้

-เวลา (นาที)ที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงของการทำน้ำองุ่นให้ใส โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lee และ Kime (1984);Lee และคณะ (1985,1990)ซึ่งช่วงเวลาที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกได้เป็น 4 ช่วงดังต่อไปนี้ คือ

<u>ช่วงที่ I</u> เริ่มตกตะกอน (initial coagulation)

<u>ช่วงที่ II</u> เริ่มตกตะกอนอย่างหนัก (heavy coagulation)

<u>ช่วงที่ III</u> มีการแยกเป็นส่วนใส (sparkling area)

<u>ช่วงที่ IV</u> ตกตะกอนทั้งหมด (total settling)

-ปริมาณแทนนินในรูปกรดแทนนิค โดยดัดแปลงจากวิธีของRosenblatt and Peluso, 1941; Singleton and Rossi,1965; Ranganna,1977;Lee,1984) (ภาคผนวก ค.)

-ประเมินประสิทธิภาพของการทำน้ำองุ่นให้ใส โดยการวัด %transmittance

โดยดัดแปลงจากวิธีของ อรอนงค์ สินธุจาบาศักดิ์ (2519)(ภาคผนวก ช.)

วางแผนการทดลอง และ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial randomized complete block design ขนาด 4x4 ทดลอง2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองโดยใช้ Duncan new multiple range test (Cochran and Cox,1957)

ศึกษาผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

ในขั้นตอนนี้จะศึกษาความแตกต่างของของสารประกอบบางชนิด คือ trichloroacetic acid เป็นสารประกอบประเภทกรด และ 2-mercaptoethanol เป็นสารประกอบประเภท thiol (R-SH) ที่มีผลทำให้โปรตีนในน้ำผึ้งเสียสภาพ (denature) และทำให้เวลาในการทำให้น้ำองุ่นใสเร็วขึ้น และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ โดยวิธีการต่อไปนี้ คือ (ดัดแปลงจากวิธีของ Lee ,1984)

นำน้ำผึ้งที่เตรียมได้ (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกันกับหัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส มาทำปฏิกิริยากับ 4% trichloroacetic acid และ นำน้ำผึ้งที่เตรียมได้ (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกันกับหัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค)ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส มาทำปฏิกิริยากับ 0.4% 2-mercaptoethanol และนำน้ำผึ้งที่ผ่านการเตรียมโดยวิธีการข้างต้นแล้ว มาต้มให้ความร้อน เพื่อทำให้โปรตีนในน้ำผึ้งเสียสภาพ และทิ้งให้เย็น และนำน้ำผึ้งที่เตรียมได้ (วิธีการเตรียมเช่นเดียวกันกับหัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการน้ำองุ่นให้ใส มาต้มให้ความร้อน (heat)อย่างเดียว จากนั้นนำน้ำผึ้งที่ผ่านวิธีการต่าง ๆ ทั้ง 3 วิธีมาเติมในน้ำองุ่นที่เตรียมได้ดังข้างต้น

<u>การวิเคราะห์ และการประเมินผล</u>

ด้วยวิธีเดียวกันกับ หัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน(ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ในขั้นตอนนี้กับหัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค)ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial randomized complete block design ขนาด 3x4x4 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง

สิ่งทดลองโดยใช้ Duncan new multiple range test (Cochran and Cox,1957)

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

โดยการเลือกสภาวะที่ดีที่สุดจากหัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโบรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน (ในรูปเกรดแทนนิค)ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และ หัวข้อศึกษาผลของสารประกอบบางชนิดที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส มา 1 สภาวะ มาศึกษาโดยวิธีการต่อไปนี้ คือ แปร pH ของน้ำองุ่น 3 ระดับ คือ 2.0,3.5 และ 5.0 และแปรอุณหภูมิในการให้ความร้อน 3 ระดับ คือ 40°ซ.,60°ซ. และ 80°ซ.(โดยดัดแปลงจากงานของ Lee and Kime,1984)

<u>การวิเคราะห์คุณภาพและการประเมินผล</u> ดังต่อไปนี้

-แทนนินในน้ำองุ่นในรูปเกรดแทนนิค (โดยดัดแปลงจากวิธีของ Rosenblatt and Peluso,1941;Singleton and Rossi,1965; Ranganna,1977;Lee, 1984)(ภาคผนวก ค.)

- ประเมินประสิทธิภาพของการทำน้ำองุ่นให้ใส โดยการวัด % transmittance โดยดัดแปลงจากวิธีของ อรอนงค์ สินธุ์จำบาศักดิ์ (2519) (ภาคผนวก ช.)

-วัดสีโดยใช้เครื่อง Lovibond ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ฉ.)

-วัดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (browning reaction) ตามวิธีของ Ranganna (1977) ;Wakayama และ Lee (1987) (ภาคผนวก ง.)

-total soluble solids โดยใช้ hand refractometer ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.)

-ปริมาณวิตามินซี ตามวิธีของ Pearson (1976) (ภาคผนวก จ.)

-pH โดยใช้ pH Meter ตามวิธีของ AOAC (1990)(ภาคผนวก ก.)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial designขนาด 3x3 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองโดยใช้ Duncan new multiple range test (Cochran and Cox,1957)

ศึกษาสมมติฐานที่ว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใสได้

โดยการนำสารสกัดส่วนที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี gel filtration มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 2 วิธี คือ uv-absorption และ Lowry

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลสถิติแบบ randomized complete block design ขนาด 4x2 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองโดยใช้ Duncan new multiple range test (Cochran and Cox,1957)

จากนั้นนำสารสกัดส่วนที่ได้นำมาทดสอบสมมติฐานดังกล่าว โดยการนำไปใส่ในน้ำองุ่นที่เตรียมไว้ โดยการแปรความเข้มข้นโปรตีน 2 ระดับ คือ ร้อยละ0 และ 3 สังเกตผลการทดลองที่ได้

<u>การวิเคราะห์และการประเมินผล</u>

เช่นเดียวกับ หัวข้อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน(ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส และเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ในหัวข้อ ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในน้ำผึ้งและแทนนิน (ในรูปกรดแทนนิค) ที่มีผลต่อการทำน้ำองุ่นให้ใส

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลสถิติแบบ factorial randomized complete block design ขนาด 4x2 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองโดยใช้ Duncan new multiple range test (Cochran and Cox,1957)