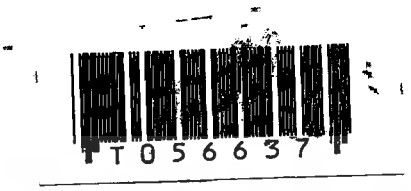
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์โดยใช้เห็ดในการหมัก

DEVELOPMENT OF WINE PRODUCT BY MUSHROOM FERMENTATION



วัฒนา อัจฉริยะโพธา

WATTANA ASCHARIYHAPHOTHA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2547

ISBN 974-15-1313-5

ว.
ว399ก
2547

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 56637/

วัน,เดือน,ปี 12 ก.ค. 2548

ลิขสิทธิ์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b.11143926/

i.....

DEVELOPMENT OF WINE PRODUCT BY MUSHROOM FERMENTATION

WATTANA ASCHARIYHAPHOTHA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KINGMUNGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2004

ISBN 974-15-1313-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPY RIGHT 2004

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KINGMUNGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์โดยใช้เห็ดในการหมัก
นักศึกษา	นายวัฒนา อัจฉริยะโพธา
รหัสนักศึกษา	44065211
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้นำเสนอการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์โดยใช้เส้นใยเห็ดบางชนิดที่มีในประเทศไทยมาหมักกับน้ำองุ่น แทนการใช้ยีสต์เพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ตามคุณลักษณะของไวน์ สำหรับเห็ดที่ใช้เพื่อการทดลองนี้ ได้แก่ เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม) *Tricholoma crassum* (เห็ดตีนแรด) *Ganooderma lucidum* (เห็ดหลินจือ) และ *Pleurotus sajor-caju* (เห็ดนางฟ้า) ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ว่าไวน์ที่ผ่านการหมักด้วยเส้นใยเห็ดนางรมปริมาณ 15 เพลเลตต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตรในวันที่ 30 มีปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุดคือร้อยละ 3.65 ส่วนไวน์ที่หมักด้วยเส้นใยเห็ดนางฟ้าปริมาณ 5 เพลเลตต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตรมีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยที่สุดคือร้อยละ 0.56 จากการวิเคราะห์คุณลักษณะทางด้านเภสัชธรรมพบสารพอลิแซคคาไรด์ชนิดอินูลินในปริมาณต่างกัน ไวน์ที่หมักด้วยเส้นใยของเห็ดนางฟ้า 15 เพลเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร ให้ปริมาณอินูลินมากที่สุดคือ 37.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไวน์ที่หมักด้วยเส้นใยเห็ดนางรมที่ปริมาณ 5 เพลตเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร ให้ปริมาณอินูลินน้อยที่สุด 20.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากการทดลองครั้งนี้สามารถนำผลสรุปมาปรับเปลี่ยนเพื่อเพิ่มคุณค่าของการผลิตและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์เพื่อผลทางอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Development of Wine Product by Mushroom Fermentation
Student	Mr. Wattana Aschariyaphotha
Student ID	44065211
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2004
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojan

ABSTRACT

This thesis presented the development of wine production by using various types of mushroom, which were selected in Thailand. In stread of yeast, the mushroom was performed with grape juice for alcoholic fermentation and characteristic of wine property. *Pleurotus ostreatus, Tricholoma crassum, Ganooderma lucidum* and *Pleurotus sajor-caju* were examined. The results showed that wine production produced the highest alcoholic of 3.65 % by using 15 pellets of *Pleurotus ostreatus* per 30 ml of grape juice with 30 days. On the other hand, wine production by using 5 pellets of *Pleurotus sajor-caju* on 30 ml of grape juice gave the lowest alcoholic of 0.56 %. The medical characteristic analysis showed that the amount of Inulin in wine production from 15 pellets of *Pleurotus sajor-caju* and 5 pellets of *Pleurotus ostreatus* in 30 ml of grape juice presented 37.2 mg/ml and 20.4 mg/ml, respectively. It was concluded that the improvement of wine production by mushroom could be useful for scale up in the industrial aspect.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ทั้งทางด้านความรู้และคำแนะนำจากรองศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมทั้งรองศาสตราจารย์อรุณี คงศักดิ์ไพศาล และรองศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์ ซึ่งอาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งและขอบพระคุณในความอนุเคราะห์ของท่านเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่ท่านกรุณาสละเวลาอันมีค่าในการตรวจรูปเล่ม และให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณตา คุณยาย และ น้องๆ ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ธุรการและเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในทุกๆเรื่องที่ต้องการ

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาโท และ น้องๆ นักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

วัฒนา อัจฉริยะโพธา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VIII

สารบัญรูป IX

บทที่ 1 ความเป็นมาและที่มาของวิทยานิพนธ์

1.1 ความเป็นมาและที่มาของวิทยานิพนธ์ 1

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการศึกษา 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของเห็ด 3

2.1.1 การจำแนกประเภทของฟังไจ (Classification) 3

2.1.2 การขยายพันธุ์ของฟังไจ 5

2.1.3 วงจรชีวิตของเห็ด 6

2.1.4 ส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด 7

2.2 คุณค่าทางโภชนาการของเห็ด 9

2.3 การใช้ประโยชน์ของเห็ด 9

2.3.1 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในอดีต 9

2.3.2 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในปัจจุบัน 10

2.3.3 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในอนาคต 11

2.4 คุณสมบัติทางยาของเห็ด 11

2.4.1 การต่อต้านมะเร็ง 12

2.4.2 การลดไขมันในเลือด 12

2.4.3 การต่อต้านไวรัส 12

2.4.4 การต่อต้านจุลินทรีย์และพยาธิ 13

2.4.5 การลดความดันโลหิต 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 แหล่งอาหารของเห็ด 13

2.6 เห็ดหลินจือ 15

2.6.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดหลินจือ 15

2.7 เห็ดนางรม 18

2.7.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม 19

2.8 เห็ดตีนแรด 20

2.8.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด 20

2.8.2 การเพาะเห็ดตีนแรด 21

2.9 เห็ดนางฟ้า 22

2.9.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางฟ้า 22

2.10 งานวิจัยเกี่ยวกับเห็ดที่ใช้ในการรักษาโรค 24

2.11 งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เห็ดเพื่อหมักแอลกอฮอล์ทดแทนเชื้อยีสต์ 27

2.12 เทคนิคอิเล็คโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะครีลาไมด์-เจล (Polyacrylamide-gel electrophoresis) 27

2.12.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล 29

2.12.2 อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล 30

2.12.3 โครงสร้างของพอลิอะคริลาไมด์เจล 31

2.12.4 กลไกการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน 32

2.12.5 ระบบของตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst System) 33

2.12.6 ผลของขนาดรูพรุน (Pore Effects) 34

2.12.7 สารเคมีในปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Chemicals in Polymerization Reaction) 34

2.12.8 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันอุณหภูมิ 38

2.12.9 การเลือกระบบของเจลและบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม 39

2.12.10 คอลัมน์เจลหรือเจลรูปแท่งและสแลบเจล (Column Gel or Rod Gel and Slab Gel) 40

2.12.11 คุณสมบัติของพอลิอะคริลาไมด์เจล 42

2.12.12 การเลือกระบบของบัฟเฟอร์ 42

2.12.13 การเลือกพีเอช 42

2.12.14 การเตรียมสารตัวอย่าง....43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.12.15 การย้อมด้วยเอนไซม์ (Enzyme Stain) 43
2.13 อิเล็คโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล 44
2.13.1 คุณสมบัติของเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์ 46
2.13.2 การทำกราฟมาตรฐาน 47
2.13.3 คุณสมบัติที่ผิดปกติของพอลิเพปไทด์....48
2.14 การย้อมเจล....48
2.14.1 วิธีการย้อมสีเจล (Gel Staining Method).... 48
2.14.2 การตรึง (Fixing) 48
2.14.3 การย้อมโดยใช้โคแมสซีบลู 49
2.14.4 กลไกการย้อมด้วยโคแมสซีบลู 50
2.15 การเตรียมสแลบเจลในแนวตั้งตรง....50
2.16 เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 52
2.17 นิโคตินาไมด์ (nicotinamide) หรือไนอาซินาไมด์ (niacinamide).... 54

บทที่ 3 วิธีดำเนินงาน
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์....57
3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการวิจัย 57
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ 57
3.2 วิธีดำเนินการ 58
3.2.1 เห็ดที่ใช้ในการศึกษา 58
3.2.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น 58
3.2.3 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ด 58
3.2.4 การเตรียมสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยง 59
3.2.5 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี ..59
3.2.6 การเลี้ยงและเตรียมเส้นใยเห็ดเพื่อทำการหมัก 59
3.2.7 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบ
โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 60
3.2.8 การย้อมสีเพื่อวิเคราะห์ Alcohol Dehydrogenase 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.9 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 60
3.2.10 การผลิตไวน์ 60
3.2.11 การหาปริมาณแอลกอฮอล์ 61
3.2.12 การหาปริมาณโพลิแซคคาไรด์โดยวิธี Anthrone test 61
3.2.13 การหาปริมาณสารอินูลิน 61

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์
4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น 62
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ด 63
4.3 ผลการเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ดจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยง 64
4.4 ผลของการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry 65
4.5 ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีการทางเคมี 65
4.6 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 67
4.7 ผลการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 68
4.8 ผลของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการใช้เส้นใยของเห็ดหมัก 69
4.9 ผลการหาปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในน้ำไวน์ที่ผ่านการหมักด้วยเส้นใยเห็ด 72
4.10 ผลการหาปริมาณสารอินูลินในน้ำไวน์ที่ผ่านการหมักด้วยเส้นใยเห็ด 72

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 75

บรรณานุกรม 77

ภาคผนวก 82

ประวัติผู้เขียน 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดและสรรพคุณของเห็ดที่ใช้เป็นยาสมุนไพร 10

2.2 แสดงสรรพคุณของเห็ดหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคชนิดต่างๆ 25

2.3 ปริมาณอินูลิน และโอลิโกฟรุกโตสในอาหารชนิดต่างๆ 26

ค-1 แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ที่วัดได้หลักจากการหมักไวน์ด้วยเส้นใยเห็ดเป็นเวลา 30 วัน 92

ค-2 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเห็ดชนิดต่างๆ ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/ml) 92

ค-3 แสดงปริมาณการดูดกลืนแสงของเส้นใยเห็ดเพื่อหาปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร 93

ค-4 แสดงปริมาณสารอินูลินในน้ำไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยเห็ดในการหมักหลังจากผ่านไป 30 วัน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 94

ค-5 แสดงรายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณอินูลินจากศูนย์ทดสอบและมาตร วิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 95

ค-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดนางฟ้า.... 97

ค-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดตีนแรด.... 97

ค-8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดนางรม.... 98

ค-9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดหลินจือ .. 98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ลายพิมพ์สปอร์ของดอกเห็ด 8

2.2 การแยกสารโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสแบบ acrylamide-gel (ตัวกลางเจลถูกพอริเมอร์ไรซ์เป็นแผ่นบางๆ ที่เรียกว่า slab gel) 29

2.3 โครงสร้างของอะคริลาไมด์ บิส และพอลิอะคริลาไมด์ 31

2.4 เครื่องมือการทำ PAGE แบบสแล้บเจลในแนวนอน 41

2.5 การทำ PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งแบบสแล้บ เจลและเจลรูปแท่งในระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน (a) และ (c) และระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน(b) และ (d)..... 42

2.6 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้การย้อมด้วยเอนไซม์.....44

2.7 แสดงสารไธออล 45

2.8 สีย้อมโคเมสซีบลูที่ใช้ตรวจสอบการแยกโปรตีนโดยเทคนิค PAGE.....50

2.9 การเตรียมสแล้บเจลในแนวตั้งตรง.....52

2.10 แบบจำลองบริเวณเร่งของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส.....53

2.11 แบบจำลองโครงสร้างของ NAD^+ 53

2.12 โครงสร้างของกรดนิโคตินิก (ไนอาซิน) และนิโคตินาไมด์.....54

2.13 นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NAD^+) และนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ($NADP^+$).....55

4.1 แสดงเส้นใยเห็ดตีนแรดบนอาหารวุ้น PDA อายุ 25 วัน 62

4.2 แสดงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน.....62

4.3 แสดงเส้นใยเห็ดนางรมบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน 63

4.4 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน 63

4.5 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว PDB อายุ 0 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....64

4.6 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว อายุ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....64

4.7 แสดงสารสกัดจากเห็ดที่ใช้ในการทดสอบเอนไซม์ ADH จากซ้ายไปขวา 1, 2 เห็ดนางรม 3, 4 เห็ดหลินจือ 5, 6 เห็ดตีนแรด 7, 8 เห็ดนางฟ้า 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.8 แสดงปริมาณโปรตีนที่วัดโดยนำเซลล์สกัดของเห็ดแต่ละชนิดมาหาปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธีของ Lowry แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA....66

4.9 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase โดยแสดงออกมาในหน่วยของยูนิตต่อมิลลิลิตร....67

4.10 แสดงแถบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีเอนไซม์ โดยช่องที่ 1 และ 2 เป็นเห็ดตีนแรด ช่องที่ 4 และ 5 เป็นเห็ดนางรม ช่องที่ 6 และ 7 เป็นเห็ดหลินจือ ช่องที่ 8 และ 9 เป็นเห็ดนางฟ้า....68

4.11 แสดงแถบสีที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีโปรตีนช่องที่ 1, 10 Marker 2, 3 เห็ดนางรม 4, 5 เห็ดนางฟ้า 6, 7 เห็ดตีนแรด 8, 9 เห็ดหลินจือ....70

4.12 แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ที่ในไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยเห็ดปริมาณต่างๆ การหมักเป็นเวลา 30 วัน....71

4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยเห็ดในการหมักเพื่อทำการค่าปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ที่ปริมาณเส้นใยต่างๆ....73

4.14 แสดงผลการวิเคราะห์สารพอลิแซคคาไรด์ชนิดอินูลินในไวน์ที่ใช้เส้นใยเห็ดในการหมักที่ปริมาณเส้นใยต่างๆ....74

ข-1 กราฟมาตรฐานสารละลาย NADH....87

ค-1 กราฟมาตรฐานสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA)....96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและที่มาของวิทยานิพนธ์

ในสังคมปัจจุบันนี้มีการนิยมนำไวน์มาเป็นเครื่องดื่มโดยบริโภคกันอย่างกว้างขวางไปทั่วโลก ซึ่งมีการบันทึกว่าไวน์นี้สามารถช่วยบำรุงรักษาสุขภาพได้ และสร้างบรรยากาศได้ในวงสังคมกันมาเป็นเวลานาน ซึ่งการผลิตไวน์จะผลิตจากผลองุ่นที่มีรสชาดที่ดีจากแถบยุโรปเป็นส่วนใหญ่ แต่ในปัจจุบันนี้มีการคิดค้นนำผลไม้ชนิดต่างๆ เช่น สับปะรด ลิ้นจี่ สตอรเบอรี่ มาทำการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์นำมาดื่มแทนไวน์จากผลองุ่นได้ ซึ่งการผลิตไวน์โดยทั่วไปนิยมใช้เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อหมักให้ได้แอลกอฮอล์

ในการค้นคว้าได้นำเห็ดที่เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่ม ฟังไจ (Fungi) เช่นเดียวกับยีสต์ มีการเจริญเติบโตเป็นเส้นใย เมื่อถึงระยะที่จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน มีรูปร่างเป็นดอกเห็ดที่เรารู้จักกัน เห็ดส่วนมากจัดอยู่ในชั้น Basidiomycetes สปอร์ของเห็ดในชั้นนี้เกิดติดอยู่บนก้านไม้พาย ที่เรียกว่า Basidium ซึ่งเรียงกันอยู่บนครีบ (Gills) หรือในรู (Pores) หรือบนฟันเลื่อน (Teeth) ของดอกเห็ด หรือฝังอยู่ในวุ้น แต่มีเห็ดหลายชนิดที่จัดอยู่ในชั้น Ascomycetes เพราะสปอร์เกิดในถุง ที่เรียกว่า Ascus เรียงอยู่ในดอกเห็ด

เนื่องจากเห็ดมีคุณสมบัติพิเศษหลายประการ คือ จากการศึกษาพบว่ามีเห็ดบางชนิดที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ Alcohol Dehydrogenase (ADH) เพื่อเปลี่ยนสารอะซิตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เป็นเอทานอล (Ethanol) เช่น เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม) *Tricholoma crassum* (เห็ดตีนแรด) และ *Ganoderma lucidum* (เห็ดหลินจือ) (พรทิพย์ ภูมิแกดำ. 2546; Okamura *et al.* 2001) เห็ดมีสรรพคุณทางเภสัชศาสตร์เช่นในเห็ดหลินจือพบว่ามีสารออกฤทธิ์และสรรพคุณทางยา คือ สาร ไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขม กรดกาโนเดอริค และกรดลูซิเดนิค ช่วยลดความดันโลหิต และช่วยลดไขมันในเลือด ป้องกันการอุดตันของไขมันในเส้นเลือด และยังพบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในตับ และการต้านสารพิษที่มีต่อตับอีกด้วย สารพอลิแซคคาไรด์ ได้แก่ กาโนเดอแรนส์ ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด สารเบต้าดีกลูแคนมีฤทธิ์ในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนในเลือดไขกระดูกและในตับ ช่วยลดการอักเสบ ช่วยกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิด บี-เซลล์ และที-เซลล์ สารสเตอรอยด์ คือ กาโนสเตอโรน หรือ กาโนโดสเตอโรน มีฤทธิ์ในการลดพิษที่มีในตับ (Chung *et al.* 2001) มีการพบสารพอลิแซคคาไรด์ชนิดอินูลิน (Inulin) ในเห็ดซึ่งจากการย่อยสลายอินูลินจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลฟรุกโตส (มาลี จิรวงศ์ศรี. 2000) ปี 1905 ได้มีการแนะนำให้ผู้ป่วยเบาหวานบริโภคอินูลินปริมาณ 40-100 กรัม/วัน ซึ่งเกิดผลดีต่อผู้ป่วยคือทำให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลง (Leon. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม) และ *Agaricus blasie* (เห็ดเข็มทอง) มีส่วนช่วยให้การจับตัวของเลือดช้าลงทำให้ไม่เกิดการอุดตันของเส้นเลือด นอกจากนี้ยังมีความ สามารถในการสลายลิ่มเลือด (Okamura *et al.* 2001)

โดยปกติคนส่วนใหญ่นิยมบริโภคเห็ดในลักษณะที่เป็นดอกเห็ดทั้งแบบสดและแบบที่แปรรูปแล้ว แต่จากการศึกษาและวิจัยพบว่าส่วนของเห็ดที่มีกิจกรรมทางเภสัชศาสตร์ และ การผลิตเอนไซม์ ADH สูงคือส่วนที่เป็นเส้นใยหรือไมซีเลียม (สิริลักษณ์ ชัยจำรัส. 2536)

จากคุณสมบัติของเห็ดที่กล่าวมานี้จึงเป็นเหตุจูงใจให้ทำการศึกษาวิจัยเพื่อนำเส้นใยหรือไมซีเลียมของเห็ดมาหมักไวน์แทนเชื้อยีสต์ ซึ่งผู้บริโภคไวน์นอกจากจะได้ประโยชน์จากการดื่มไวน์คือใช้ดื่มก่อนอาหารเพื่อเป็นตัวกระตุ้นการหลั่งน้ำย่อยและช่วยให้อาหารอื่นดูดซึมง่าย ยังใช้ไวน์บำบัดความเจ็บปวดอาการที่ไม่รุนแรง ใช้เป็นยาระงับความตื่นเต้น กังวล ช่วยให้เส้นเลือดขยายตัวในคนไข้ที่เป็นความดันต่ำ ช่วยให้ขับถ่ายปัสสาวะสะดวก และทำให้ผู้บริโภคไวน์ได้ประโยชน์ในลักษณะเป็นอาหารบำรุงสุขภาพอีกด้วย (วันชัย สุทธินุ่น. 2541)

ดังนั้นไวน์ที่ผลิตจากไมซีเลียมของเห็ดจึงน่าจะเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่มีประโยชน์มากกว่าการบริโภคเฉพาะส่วนที่เป็นดอก นอกเหนือจากนั้นยังเป็นแนวทางพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์ให้ออกมาในรูปแบบอาหารเพื่อสุขภาพอีกทางหนึ่ง เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ไวน์ และเป็นแนวทางขยายตลาดไปสู่ผู้บริโภคให้มากยิ่งขึ้น

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาและตรวจวิเคราะห์หาเอนไซม์ Alcohol Dehydrogenase (ADH) จากเห็ดที่กินได้บางชนิดในประเทศไทย

1.2.2 ศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์จากไมซีเลียมของเห็ดในรูปของอาหารเพื่อสุขภาพ

1.2.3 ศึกษาถึงคุณลักษณะพิเศษทางด้านเภสัชกรรมและคุณสมบัติของไวน์ที่ผลิตได้

1.3 ขอบเขตการศึกษา

1.3.1 เป็นงานวิจัยที่ศึกษาเพื่อตรวจวิเคราะห์หาเอนไซม์ ADH จากเห็ดที่กินได้ในประเทศไทย

1.3.2 ศึกษาลักษณะพิเศษและคุณสมบัติของไวน์ที่ผลิตได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถใช้เห็ดที่ตรวจพบเอนไซม์ ADH มาใช้ในการหมักไวน์

1.4.2 ไวน์ที่ผลิตจากไมซีเลียมของเห็ดจะมีสารชนิดต่างๆที่มีสรรพคุณทางยาหลายชนิด เช่น สารพอลิแซคคาไรด์ช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้

1.4.3 เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ไวน์ในรูปอาหารเพื่อสุขภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของเห็ด

2.1.1 การจำแนกประเภทของฟังไจ (Classification)

สิ่งมีชีวิตเล็กๆ ที่จัดอยู่ในพวกฟังไจได้แก่ รา (mold) ยีสต์ (yeast) และเห็ด (mushroom) พวกฟังไจจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) จึงสังเคราะห์แสงไม่ได้ ส่วนการขยายพันธุ์อาจจะขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือแบบไม่อาศัยเพศก็ได้ นักวิทยาศาสตร์ได้จำแนกชนิดของฟังไจได้ดังนี้

2.1.1.1 การจำแนกฟังไจโดยอาศัยลักษณะการดำรงชีวิต (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520)

จากการที่ฟังไจไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงสังเคราะห์แสงไม่ได้ การเจริญเติบโตของฟังไจจึงจำเป็นต้องใช้อาหารจากสารอินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นสิ่งที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิตก็ได้ จากลักษณะการดำรงชีพดังกล่าวจึงได้มีการจำแนกฟังไจออกเป็น 3 ประเภท คือ

1. พวกปรสิต (Parasite) ฟังไจกลุ่มนี้มีการดำรงชีวิตโดยอาศัยอาหารจากสิ่งที่มีชีวิต ส่วนใหญ่เป็นฟังไจที่ทำให้เกิดโรคแก่ พืช มนุษย์ และสัตว์

2. พวกพาราสิตตามโอกาส (Facultative Parasite) ฟังไจกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนสิ่งมีชีวิต หรือสิ่งที่ตายแล้ว และใช้อินทรีย์วัตถุจากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว

3. พวกซาโปรบ (Saprophyte) เป็นฟังไจที่มีการดำรงชีวิตโดยอาศัยอาหารจากสิ่งเน่าเปื่อย เช่น รา

2.1.1.2 การจำแนกฟังไจโดยอาศัยรูปร่างและการวิวัฒนาการ (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520)

แบ่งออกเป็น 5 ชั้น (class) คือ

1. คลาสไมโสไมซิติส (Class Myxomycetes) ฟังไจกลุ่มนี้อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ราเมือก (slime mold) จัดเป็นฟังไจที่มีลักษณะคล้ายกับโปรโตซัว ภายในเส้นใยราเมือกมีหลายนิวเคลียส

2. คลาสไฟโคไมซิติส (Class Phycomycetets) ฟังไจกลุ่มนี้ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ฟังไจชั้นต่ำ (lower fungi) จัดเป็นฟังไจที่มีวิวัฒนาการต่ำสุด ส่วนมากจะเจริญเติบโตอยู่ในน้ำ เรียกว่า water mold

3. คลาสแอสโคมัยซิส (Class Ascomycetes) ฟังไจกลุ่มนี้ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Sac fungi ซึ่งจัดเป็นฟังไจที่มีวิวัฒนาการมากกว่าสองกลุ่มแรก ฟังไจกลุ่มนี้จัดว่าเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ ได้แก่ พวกเชื้อยีสต์ และฟังไจในสกุล Aspergillus และ Penicilium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. คลาสเบซิดิโอไมซิติส (Class Basidiomycetetes) ฟังไจกลุ่มนี้ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Club fungi ซึ่งจัดเป็นฟังไจที่มีขนาดใหญ่ เส้นใยเห็ดมีการแตกแขนงมากมาย และมีการดูดซึมนำอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่พวกเห็ด ซึ่งเห็ดจัดว่าเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของโปรตีนในปริมาณสูง แบ่งออกเป็น 2 subclass คือ

- Subclass Heterobasidiomycetidae ฟังไจกลุ่มนี้เป็นฟังไจที่มีขนาดใหญ่เกี่ยวข้องกับเห็ด 2 order คือ

- Order Tremellales จัดเป็นฟังไจที่มีการดำรงชีวิตแบบอิสระ เบซิเดียม (basidium) มีผนังกั้นตามยาวแบ่งออกเป็น 4 เซลล์ ได้แก่ พวกเห็ดหูหนูขาว

- Order Auriculariales ฟังไจกลุ่มนี้เบซิเดียมจะมีผนังกั้นตามขวางและแบ่งเบซิเดียมออกเป็น 4 เซลล์ ได้แก่ เห็ดหูหนูชนิดต่างๆ

- Subclass Homobasidiomycetidae ฟังไจกลุ่มนี้เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นฟังไจขนาดใหญ่และมีการสร้างดอกเห็ด (fruiting body) ซึ่งสามารถนำมารับประทานเป็นอาหารได้ ลักษณะของเบซิเดียมเป็นกระบอง ไม่มีผนังกั้น เห็ดที่อยู่ใน Subclass นี้มีอยู่ 2 ซีรีส์

Series Hymenomycetes มี 2 order คือ

- Order Polyporales ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่ ครีบดอกมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายรังผึ้ง สร้างดอกเห็ดเรียงกันเป็นชั้นๆ ได้แก่ กลุ่มของเห็ดหิ้ง (Shelf fungi)

- Order Agaricales มีการสร้างเบซิเดียมที่บริเวณครีบของดอก ดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายร่ม ได้แก่ เห็ดในตระกูล *Amanitaceae* กับตระกูล *Tricholomataceae* เช่น เห็ดตีนแรด เห็ดเป๋าฮื้อ

Series Gasteromycetes มักพบในช่วงฤดูฝน ดอกเห็ดมีลักษณะค่อนข้างกลม และไม่มีครีบดอก ได้แก่ เห็ดเผาะ เห็ดหัวเข่า เป็นต้น

5. คลาสดิวเทอโรไมซีติส (Class Deuteromycetes) อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Imperfect fungi ลักษณะของเส้นใยเป็นแบบที่มีผนังกั้น การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยมีการสร้างคอนนิเดีย (conidia) เพียงอย่างเดียว การดำรงชีวิตมีทั้งแบบย่อยสลาย และแบบปรสิต

2.1.1.3 การจำแนกประเภทเห็ดตามการนำไปใช้ (Alexopoulos and Mims. 1996)

1. เห็ดที่ใช้เป็นอาหาร (dietary mushroom) มีอยู่ประมาณร้อยละ 90 ของเห็ดที่พบทั่วไป เช่น เห็ดฟาง เห็ดหอม เห็ดหูหนู เห็ดโคน เห็ดเข็มทอง เป็นต้น

2. เห็ดที่ใช้เป็นสมุนไพร (medicinal mushroom) เห็ดสมุนไพรมีค่อนข้างจำกัด อาจเป็นเห็ดที่กินได้และรู้จักคุ้นเคยเป็นอย่างดี เช่น เห็ดหอม เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู เป็นต้น หรือเห็ดบางอย่างที่ไม่เป็นที่รู้จักและหายาก เช่น เห็ดหัวลิง (*Hericium erinaceus)* เป็นต้น นอกจากนี้เห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมุนไพรยังได้จากเห็ดพิษบางชนิดด้วย เช่นเห็ดร่างแห เห็ด *Amanita phalloudes* และเห็ดอื่น ๆ ที่ยังไม่มีการวิจัยและพัฒนาอีกหลายชนิด

2.1.2 การขยายพันธุ์ของฟังไจ (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520)

แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

2.1.2.1 การขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศ (Asexual reproduction) เป็นการขยายพันธุ์แบบใช้เส้นใยหรือเนื้อเยื่อของเห็ด และ มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) คือ

1. Clamydospore เป็นสปอร์ที่มีผนังหนา ซึ่งภายในจะมีการสะสมอาหารจึงทำให้สามารถพักตัวอยู่ได้นาน และมีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้เป็นอย่างดี

2. Conidiospore หรือ conidia เป็นสปอร์ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม และเกิดจากเซลล์ที่เรียกว่า sterigma

3. Blastospore มีการขยายพันธุ์คล้ายกับเซลล์ของยีสต์ หน่อที่แตกออกมาเรียกว่า Blastospore

4. Sporangiospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากการที่ปลายเส้นใยพองตัวออกคล้ายกระเปาะภายในกระเปาะจะมีผนังหนา และผนังกั้นเกิดขึ้นจากนั้นก็จะเจริญไปเป็นอับสปอร์ (sporangium) เมื่ออับสปอร์แตกสปอร์ที่อยู่ภายใน (sporangiospore) ก็จะแพร่กระจาย ถ้าปลิวไปตกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยออกมา

2.1.2.2 การสืบพันธุ์แบบมีเพศ (Sexual reproduction) เป็นการสืบพันธุ์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของนิวเคลียส ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 เรียกว่า Plasmogamy เป็นระยะที่โปรโตพลาสซึมของเซลล์ทั้งสองมารวมตัวกัน

ระยะที่ 2 เรียกว่า Karyogamy เป็นระยะที่นิวเคลียสทั้งสองมารวมกัน จึงทำให้มองเห็น 2 นิวเคลียสในเซลล์เดียวกัน เรียกระยะนี้ว่า diakaryon

ระยะที่ 3 เรียกว่า Meiosis นิวเคลียสมีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ทำให้จำนวนโครโมโซมลดลงเป็น n (haploid)

การสืบพันธุ์ของฟังไจแบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์เรียกสปอร์พวกนี้ว่า Sexual spore ซึ่งมีอยู่หลายชนิด คือ

1. Zygospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของนิวเคลียสในเส้นใย 2 เส้นมาพบกัน และมีการสร้างผนังหนาขึ้นห่อหุ้ม

2. Oospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียแบบ oogamete จากนั้นเซลล์จะมีการสร้างผนังห่อหุ้มเอาไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Ascospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลล์ต่างเส้นใย หรือเส้นใยเดียวกันก็ได้ และนิวเคลียสของเส้นใยจะรวมตัวกันเป็น 2n จากนั้นนิวเคลียสจะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสและไมโตซิสได้เป็น 8 นิวเคลียส โดยสปอร์จะเกิดภายใน ascus จึงเรียกว่า ascospore

4. Basidiospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์ที่มีนิวเคลียสเป็น haploid (n) 2 อัน เซลล์นี้จะเกิดที่ปลายสุดของเบซิเดียม ต่อมานิวเคลียสจะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสได้ 4 นิวเคลียสและเคลื่อนที่ไปเจริญที่ปลาย sterigma และกลายเป็น basidiospore ซึ่งเห็ดจะมีการสืบพันธุ์แบบมีเพศโดยการสร้าง basidiospore

2.1.3 วงจรชีวิตของเห็ด (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520)

วงจรชีวิตของเห็ดจะมีลักษณะคล้ายกันโดยจะหมุนเวียนเริ่มจากเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) เมื่อปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสม สปอร์ก็จะงอกเส้นใยออกมา และเส้นใยเหล่านี้จะรวมตัวกันและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด จากนั้นก็จะมีการสร้างสปอร์ หมุนเวียนกันไปเรื่อยๆ วงจรชีวิตของเห็ดแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แต่ตามปกติจะมีระยะการเจริญเติบโต 9 ระยะ คือ

1. เมื่อเห็ดเจริญเติบโตที่จะมีการสร้างเบซิดิโอสปอร์ บริเวณเบซิเดียมซึ่งอยู่ใต้ครีบดอก สปอร์เหล่านี้เป็นพวก haploid เมื่อสปอร์ปลิวไปตกบริเวณที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใย (mycelium) ออกมา

2. เส้นใยที่งอกออกมานี้ เรียกว่า เส้นใยขั้นที่หนึ่ง (primary mycelium) ซึ่งมีโครโมโซมเป็น haploid (n) จึงเรียกว่า homokaryotic mycelium

3. เส้นใยขั้นที่หนึ่งจะรวมตัวกันเป็นเส้นใยขั้นที่สอง เรียกระยะนี้ว่า Plasmogamy ซึ่งเป็นระยะที่เส้นใยขั้นที่หนึ่งของเห็ดเชื่อมต่อกัน และไซโตพลาสซึมของทั้งสองฝ่ายมารวมเข้าด้วยกัน ทำให้นิวเคลียสทั้ง 2 อันมารวมอยู่ในเซลล์เดียวกัน จากนั้นก็มีการพัฒนาไปเป็นเส้นใยขั้นที่สอง (secondary mycelium) การรวมตัวของเส้นใยขั้นที่หนึ่ง แบ่งออกได้เป็น 2 กรณี คือ

1) Homothallic เป็นลักษณะการรวมตัวของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดียวกัน แล้วเจริญไปเป็นเส้นใยขั้นที่สองโดยไม่ต้องเกิดการรวมตัวของเส้นใยขั้นที่หนึ่งที่งอกจากสปอร์อื่นๆ ลักษณะการรวมตัวของเส้นใยขั้นที่สอง ลักษณะการรวมตัวของเส้นใยที่งอกจาก สปอร์ของตัวเองนี้เรียกว่า มีวงจรชีวิตแบบ Homothallic Life Cycle

2) Heterothallic เห็ดบางชนิดจะเจริญเติบโตเป็นดอกได้จะต้องผ่านการรวมตัวกันระหว่างเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกันจึงจะพัฒนาไปเป็นเส้นใยขั้นที่สองและสามารถรวมตัวกันเป็นดอกเห็ดได้จึงเรียกเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบนี้ว่า Heterothallic Life Cycle

4. Karyogamy เป็นระยะที่นิวเคลียสสองอันรวมตัวกัน ถ้าเป็นฟังไจชั้นต่ำจะเกิดอย่างรวดเร็วแต่ถ้าเป็นฟังไจชั้นสูงระยะการรวมตัวกันจะต้องใช้เวลาพอสมควร จึงทำให้เห็นว่าภายในเซลล์มี 2 นิวเคลียส (binucleus) ซึ่งระยะนี้ว่า Dikaryon เส้นใยขั้นที่สองจะเจริญเติบโตอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็ว เส้นใยขั้นที่สองแต่ละเซลล์จะมีข้อยึดระหว่างเซลล์ เรียกว่า Clamp connection เส้นใยขั้นที่สองนี้ สามารถขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างแคลมไมโดสปอร์ (Clamydospore) หรือสร้างออยเดียม (Oidium)

5. เส้นใยขั้นที่สองจะเจริญเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เรียกเส้นใยในระยะนี้ว่า เส้นใยขั้นที่สาม (Tertiary mycelium) ซึ่งเป็นพวก dikaryotic mycelium เส้นใยจะเริ่มพัฒนาไปเป็นตุ่มดอกเล็กๆ และเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ

6. ดอกเห็ดในระยะนี้ มีการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่มีรูปร่างคล้ายร่มและมีการสร้างเบซิเดียมคล้ายรูปทรงกระบอก ในแต่ละเบซิเดียม จะมีนิวเคลียสอยู่สองอัน (binucleus)

7. นิวเคลียสทั้ง 2 อัน (n+n) ในเบซิเดียมจะรวมตัวกัน และมีการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมกัน นิวเคลียสในระยะนี้ เรียกว่า diploid nucleus (2n)

8. นิวเคลียสที่รวมตัวกัน (diploid nucleus) จะมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ลดจำนวนโครโมโซมเป็น hapliod (n) จำนวน 4 อัน

9. เบซิเดียมจะมีการสร้างก้านชูสปอร์ (sterigma) 4 อัน และนิวเคลียสทั้ง 4 อัน จะเคลื่อนที่สู่ปลาย sterigma นิวเคลียสทั้ง 4 อัน จะพัฒนาไปเป็นเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore)

2.1.4 ส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520)

เห็ดที่เจริญเติบโตบนพื้นโลก ส่วนใหญ่มีมากมายหลายชนิด บางชนิดมีสรรพคุณทางยารักษาโรค บางชนิดนำมารับประทานเป็นอาหาร และบางชนิดเป็นเห็ดพิษ ดอกเห็ดพวกนี้มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน แต่โดยทั่วๆ ไป เห็ดจะประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

หมวกดอก (Cap) เป็นส่วนที่อยู่ปลายสุดของดอก ที่เจริญเติบโตขึ้นไปในอากาศ เมื่อเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่หมวกดอกก็จะกางออกคล้ายร่ม เช่น เห็ดฟาง เห็ดแชมปิญอง เป็นต้น แต่หมวกดอกของเห็ดบางชนิดจะแบนราบ และกลางหมวกดอกอาจจะเว้าลงไปเป็นแอ่ง เช่น เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดเป๋าฮื้อ เป็นต้น บริเวณด้านบนของหมวกดอกเห็ดบางชนิดจะเรียบ บางชนิดมีผิวขรุขระ ดอกเห็ดบางชนิดหมวกดอกมีเนื้อเหนียว แต่บางชนิดหมวกดอกฉีกขาดง่าย สีของเนื้อภายในดอกเห็ด กับสีภายนอกอาจเป็นสีเดียวกัน หรือต่างกันก็ได้ขึ้นกับชนิดของดอกเห็ด

ครีบดอก (Gills) หมายถึงส่วนที่อยู่ด้านล่างหรือส่วนที่อยู่ใต้หมวกดอกมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ เรียงติดกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก และแผ่ขยายออกไปยังหมวกดอก ครีบดอกของเห็ดบางชนิดจะยึดติดแน่นกับก้านดอก แต่บางชนิดจะเกาะกันแบบหลวมๆ บริเวณของครีบจะเป็นแหล่งกำเนิด สปอร์ เห็ดบางชนิดครีบดอกมีรูปร่างลักษณะเป็นรูพรุน (pores) บางชนิดอาจมีลักษณะเป็นฟันเลื่อย (teeth) ความหนาของครีบดอกแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน

ก้านดอก (Stalk หรือ Stipe) ก้านของดอกเห็ดแต่ละชนิดจะมีลักษณะแตกต่างกัน ทั้งทางด้านขนาดและความยาว ตามปกติก้านของดอกเห็ดจะมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แต่บริเวณโคนก้านดอกจะใหญ่ และค่อยๆ เรียวเล็กไปยังส่วนปลาย ส่วนบนของก้านดอกจะติดอยู่กับหมวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกหรือครีบดอก ถ้าก้านดอกยึดบริเวณกลางก้านดอกพอดีควรเรียกก้านดอกในลักษณะนี้ว่า Central Stalk แต่ถ้าก้านดอกยึดติดกับหมวกดอกโย้ไปด้านใดด้านหนึ่ง โดยไม่ได้ยึดกับตรงกลาง ดอกเรียกก้านดอกในลักษณะนี้ว่า Excetric Stalk ส่วนเนื้อภายในก้านดอกจะมีลักษณะเป็นเส้นใยสานกันอยู่อย่างหลวมๆ คล้ายฟองน้ำหรือแน่นทึบก็ได้ขึ้นกับชนิดของเห็ด

สปอร์ของเห็ดเป็นแบบเบซิดิโอสปอร์ (Basidiospore) สปอร์พวกนี้จะถูกสร้างขึ้นบริเวณครีบดอก สปอร์ของดอกเห็ดมีขนาดเล็กมากไม่มีสี แต่ถ้าสปอร์เหล่านี้รวมกันเป็นกลุ่มก้อนจะมีสีคล้ายกับสีของครีบดอก สปอร์ของดอกเห็ดแต่ละชนิด จะมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของเห็ด ถ้านำหมวกดอกของเห็ดมาวางบนกระดาษบริเวณที่อับลม สปอร์ของเห็ดจะตกลงบนแผ่นกระดาษเป็นกลุ่ม มีลักษณะแผ่ขยายไปตามเส้นขอบครีบดอก ดังแสดงในรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 ลายพิมพ์สปอร์ของดอกเห็ด
ที่มา : ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520

วงแหวน (Ring) วงแหวนของเห็ดมีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อบางๆ ยึดติดอยู่กับก้านดอกโดยอยู่รอบก้านดอก เมื่อหมวกดอกกางออกเนื้อเยื่อที่ยึดติดก้านดอกกับหมวกดอกจะขาดจากกัน และมีเศษเนื้อเยื่อบางส่วนยึดติดกับก้านดอกทำให้ดูคล้ายกับว่าบริเวณก้านดอกมีแผ่นเยื่อบางๆ สวมอยู่

ปลอกหุ้มโคน (Volva) เป็นส่วนที่อยู่ด้านล่างของโคนก้าน ดอกเห็ดแต่ละชนิดมีปลอกหุ้มโคนที่มีความหนาบางแตกต่างกัน ปลอกหุ้มโคนก็คือเนื้อเยื่อที่หุ้มดอกเห็ดไว้ในขณะที่ดอกเห็ดยังตูมอยู่เรียกเนื้อเยื่อพวกนี้ว่า outer veli เมื่อเห็ดเจริญเติบโตขึ้น ก็จะดันเนื้อเยื่อที่หุ้มออกมา และก้านดอกเห็ดก็จะชูหมวกดอกขึ้นไปในอากาศ ทิ้งส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อไว้ด้านล่างบริเวณโคนดอกเห็ดลักษณะคล้ายถ้วยวางหงายรองรับดอกเห็ดอยู่ เห็ดที่มีปลอกหุ้มโคนได้แก่ เห็ดฟาง เห็ดตระกูลอะมานิต้า

กลุ่มเส้นใย (Mycelium) หมายถึง กลุ่มเส้นใยที่รวมตัวกันแน่น เห็ดบางชนิดจะมีกลุ่มเส้นใยรวมตัวกันแน่นที่บริเวณโคนก้านดอก กลุ่มเส้นใยพวกนี้มีลักษณะเป็นใยหยาบๆ แต่บางชนิดกลุ่มเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นใยละเอียด กลุ่มของเส้นใยดังกล่าวจะมีสีขาวเกาะยึดระหว่างโคนก้านดอกกับวัสดุที่เห็ดเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 คุณค่าทางโภชนาการของเห็ด

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเห็ดหลายชนิดพบว่า เห็ดจัดว่าเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชผักต่างๆ นอกจากนี้เห็ดยังมีกรดอะมิโน (amino acid) เป็นส่วนประกอบมากกว่า 20 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน กรดอะมิโนเหล่านี้มีอยู่ 9 ชนิดที่มีความสำคัญต่อการสร้างโปรตีนในร่างกายมนุษย์ ได้แก่ tryptophane threonine valine leucine isoleucine cystine lysine methionine และ phenylalanine ตามปกติแล้วโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์จะมีปริมาณสูงกว่าพืช ในเมล็ดธัญพืชจะมีกรดอะมิโนพวก lysine ในปริมาณที่น้อยมาก ส่วนในพืชตระกูลถั่วมักจะขาดกรดอะมิโนพวก methionine และ tryptophane แต่ในเห็ดจะมีกรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกายมนุษย์ครบทั้ง 9 ชนิด นอกจากนี้เห็ดยังมีคุณค่าทางอาหารอีกหลายอย่าง ได้แก่ ไขมัน ฟอสฟอรัส เหล็ก Thiamine (B_1) Riboflavin (B_2) และ Niacine เห็ดจัดเป็นอาหารที่มีปริมาณของแคลอรี่ คาร์โบไฮเดรต และแคลเซี่ยมต่ำ (ราชบัณฑิตยสถาน. 2539)

ในปัจจุบันอัตราการเพิ่มประชากรของโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ความต้องการปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นไปด้วย อาหารประเภทโปรตีนอาจได้มาจากพืชหรือสัตว์ก็ได้ แต่อาหารโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์มีราคาค่อนข้างแพงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารประเภทอื่น ๆ และคนส่วนใหญ่เชื่อว่าถ้าต้องการโปรตีนก็ต้องบริโภคเนื้อสัตว์ แต่ความจริงแล้วไม่จำเป็นต้องบริโภคเนื้อสัตว์เสมอไป เพราะมีอาหารหลายอย่างที่มีปริมาณโปรตีนสูงและสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้ โดยเฉพาะเห็ดซึ่งจัดว่ามีโปรตีนสูงและอาหารโปรตีนที่ได้จากเห็ดไม่มีสารพวกคลอเรสเตอรอลที่ทำให้เส้นเลือดอุดตันและเห็ดยังมีราคาถูกกว่าเนื้อสัตว์มาก และเห็ดยังจัดว่าเป็นอาหารที่เหมาะสำหรับผู้ที่นิยมรับประทานมังสะวิรัติ ตลอดจนผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจ โรคตับ โรคความดัน ฯลฯ (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538) ชาวจีนเชื่อว่าถ้ารับประทานเห็ดหอมและเห็นหูหนูขาวเป็นประจำจะช่วยป้องกันการสะสมไขมันในเส้นเลือด โรคความดัน และเห็ดพวกนี้ยังมีสารที่ต่อต้านเนื้องอก (สุทธพรรณ ตรีรัตน์. 2533)

2.3 การใช้ประโยชน์ของเห็ด

2.3.1 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในอดีต

ในอดีตมีการใช้เห็ดเป็นสมุนไพรมีมานานมากกว่า 4000 ปีแล้วในประเทศจีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน และเกาหลี ตัวอย่างเห็ดสมุนไพรที่ใช้ เช่น เห็ดหอม เห็ดหลินจือ เห็ดไมตาเกะ และเห็ดอื่น ๆ สำหรับเห็ดสมุนไพรที่ใช้กันมานานและแพร่หลายมากที่สุดในประเทศจีนและญี่ปุ่น คือ เห็ดหลินจือ ซึ่งต่อมาประมาณปี ค.ศ. 1960 มีการขยายตลาดไปยังยุโรปและอเมริกา และมีการนำเห็ดสมุนไพรบางชนิดมาใช้เป็นอาหาร เช่น เห็ดหอม (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520)

ในประเทศไทยแพทย์พื้นบ้านมักจะใช้เห็ดงูเห่าซึ่งขึ้นตามเชิงป่าเขา เห็ดไม้แดง เห็ดไม้รั้ว และเห็ดกระถินพิมาน ที่ขึ้นตามตอไม้ที่ผุแล้วมาผสมเป็นยากิน เช่น ยาจักรวาลฟ้าครอบกินแก้ไข้กาฬ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุกชนิด หรือใช้ทาภายนอกแก้โรคไฟลามทุ่ง สามารถทำให้น้ำเหลืองแห้งได้ดี นอกจากนั้นยังมีการนำเห็ดร่างแหมาผสมกับตัวยาอื่นเพื่อใช้เป็นยารักษาแผล รวมทั้งใช้เห็ดตากแห้งนำมาผสมกับของเมาอย่างอื่นและจันทร์หอมทำเป็นธูป หรือทำเป็นยาชุดจุดไฟเอาควันรมทำให้ผู้ถูกควันมึนเมาและหลับหมดสติไป นอกจากนี้ยังมีสมุนไพรอื่นๆ อีก (ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์. 2546) ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดและสรรพคุณของเห็ดที่ใช้เป็นยาสมุนไพร

ชื่อ	สรรพคุณ
เห็ดชิง	แก้หวัด ปวดตามข้อ
เห็ดแครง	แก้อ่อนเพลีย รักษาโรคสตรี
เห็ดม้องเขาเขียว	บำบัดอาการผื่นคัน ปวดแสบปวดร้อนในโรคเริม
เห็ดจวักงู	ลดไข้ คนญี่ปุ่นใช้รักษาโรคกระเพาะอาหาร
เห็ดจาวมะพร้าว	ใช้บำรุงร่างกาย กระจายโลหิต
เห็ดจิก	ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ เช่น พยาธิตัวตืด
เห็ดตับเต่า	แก้หวัด ปวดในข้อ รักษาตกขาว
เห็ดนมเสือ	แก้หืด ปวดหู ปวดแสบปวดร้อน
เห็ดเป๋าฮื้อ	ช่วยให้หายใจสะดวกขึ้น ระงับอาการปวดข้อ ยับยั้งมะเร็ง
เห็ดฝุ่น	ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ต่อต้านมะเร็ง
เห็ดมันปูใหญ่	ระงับอาการแพ้ คัน บวม หายใจไม่สะดวก ใช้ห้ามเลือด
เห็ดสน	แก้โรคตาขุ่นมัว ช่วยการทำงานของปอด กระเพาะลำไส้
เห็ดหูหนูขาว	ใช้ช่วยย่อยอาหาร รักษาฝี ช่วยละลายเสมหะ ทำให้หายใจสะดวก
เห็ดหูหนูดำ	แก้ร้อนใน หายใจไม่สะดวก แก้ไข้ ลดความดันโลหิต ห้ามเลือด
เห็ดหิ่งห้อย	แก้การหายใจไม่สะดวก แก้ริดสีดวงทวาร ต่อต้านมะเร็ง

ที่มา : ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์ (2546)

2.3.2 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในปัจจุบัน

ในด้านโภชนาการเห็ดถือว่าเป็นอาหารที่ดี เห็ดสดทั่วไปมีองค์ประกอบคือ ความชื้นร้อยละ 90 โปรตีนประมาณร้อยละ 3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์มีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ครบ คือมีดรรชนีกรดอะมิโนจำเป็นเท่ากับร้อยละ 72-98 ของเนื้อสัตว์ และมีกรดนิวคลีอิกค่อนข้างสูง มีคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 3-28 เส้นใยร้อยละ 3-32 และให้พลังงานน้อยเพียง 60-90 แคลอรีต่อปอนด์ น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในเห็ดมีหลายชนิด ความหวานของเห็ดเกิดจากน้ำตาลพิเศษ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

trehalose เรียกเฉพาะว่าเป็นน้ำตาลเห็ด น้ำตาลนี้จะพบมากในเห็ดอ่อน เมื่อเห็ดโตเต็มที่น้ำตาล trehalose นี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่มีความหวานลดลง (ราชบัณฑิตยสถาน. 2539)

เห็ดทั่วไปมีไขมันต่ำมากประมาณร้อยละ 2-8 เห็ดหลายชนิดจะมีเออโกสเตอรอล (ergosterol) สูง 0.2 - 270 มิลลิกรัมต่อร้อยละของน้ำหนักแห้ง เห็ดเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินบี 1 บี 2 ไนอะซิน ไบโอติน วิตามินซี และวิตามินดี เห็ดบางชนิดจะมีเบต้าแคโรทีนด้วย ส่วนเกลือแร่ที่พบมากในเห็ด คือ ฟอสฟอรัส โซเดียม และโพแทสเซียม รองลงมาคือ แคลเซียมและเหล็ก (ราชบัณฑิตยสถาน. 2539)

ดังนั้นในปัจจุบันจึงเป็นที่ยอมรับกันว่า เห็ดเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีคุณภาพ ราคาถูก มีรสและกลิ่นดี มีความหลากหลายให้เลือกได้มาก เห็ดพื้นบ้าน เช่น เห็ดโคน เห็ดเผาะ เห็ดไข่ห่าน และเห็ดเพาะเลี้ยง เช่น เห็ดฟาง เห็ดหอม เห็ดหูหนู จึงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเพื่อสุขภาพ เป็นแหล่งของโปรตีนและสารชูรสในอาหารมังสะวิรัติและอาหารเจ รวมทั้งเป็นวัตถุดิบในการเตรียมผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหลายชนิด

2.3.3 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในอนาคต

เป็นที่น่าสังเกตว่าเห็ดมีปริมาณกรดนิวคลีอิกต่อหน่วย 100 กรัม (กรัมร้อยละ) สูงมากกรองจากยีสต์ เช่น เห็ดฟางมีกรดนิวคลีอิก 8.8 กรัมร้อยละ เห็ดแชมปิญอง 7.4 กรัมร้อยละ และเห็ดเป๋าฮื้อ 6.2 กรัมร้อยละ ในขณะที่พืช เนื้อสัตว์ใหญ่ เนื้อปลามีเพียง 1.1-6.2 กรัมร้อยละ กรดนิวคลีอิกเป็นพอลินิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของพืชและสัตว์ทั่วไป อาจนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยากระตุ้นภูมิคุ้มกันและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเด็ก โดยเปลี่ยนแปลงโมเลกุลกรดนิวคลีอิกให้เล็กลงเป็นกรดนิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไซด์ และสารเบสไนโตรเจน แล้วนำไปเติมในนมและอาหารเด็กเพื่อกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในเด็กได้ นอกจากนี้ยังมีเห็ดบางชนิดที่มีสารชีวภาพพิเศษมากพอที่จะนำมาวิจัยและพัฒนาใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ เช่น เห็ดขมิ้นซึ่งมีสารโปรวิตามินเอ หรือเบต้าแคโรทีนสูงถึง 54.94 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับผักใบเขียว มะละกอสุก และแครอท ถือว่าเห็ดขมิ้นมีเบต้าแคโรทีนสูงมาก อาจใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพได้ดีเช่นเดียวกับผักและผลไม้ ดังนั้นควรมีการวิจัยระดับพื้นฐานในทุกๆด้านและมีการพัฒนาเห็ดสมุนไพรชนิดอื่นๆภายในประเทศให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ดีมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เพื่อเพิ่มมูลค่าของเห็ดให้มากขึ้นต่อไป (ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์. 2546)

2.4 คุณสมบัติทางยาของเห็ด

จากการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีววิทยาของเห็ดสมุนไพรหลายชนิด มีรายงานว่าเห็ดบางสายพันธุ์ประกอบด้วยสารซึ่งป้องกันหรือบรรเทาโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจากไวรัส ซึ่งโรคทั้ง 3 ชนิดนี้ทำอันตรายต่อมนุษย์มากที่สุด ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาคุณค่าทางยาของเห็ดและเป็นการพัฒนาของอุตสาหกรรมเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 การต่อต้านมะเร็ง

เห็ดหลายชนิด เช่น เห็ดหลินจือ เห็ดหอม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเข็มทอง เห็ดหูหนู เห็ดแชมปิญอง เห็ดตับเต่า มีสารซึ่งช่วยป้องกันมะเร็ง สืบเนื่องมาจากกลไกในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและมีงานวิจัยมากมายในด้านผลการยับยั้งเนื้องอกของเห็ดหรือสารสกัดจากเห็ด ส่วนใหญ่จะทำการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น

ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์ (2546) ทำการศึกษาและรายงานว่าสถาบันมะเร็งแห่งชาติมีการศึกษาสารต้านทานเนื้องอกในเห็ดชิตาเกะ (shitake) เมื่อแยกและทำให้บริสุทธิ์ นำมาทดสอบกิจกรรมการต้านทานเนื้องอก เรียกสารนั้นว่าเลนทิแนน (lentinan) ยับยั้งการเจริญของเซลล์ Sarcoma 180 ในหนู ซึ่งชักนำให้เกิดผลการเสื่อมถอยของเนื้องอกอย่างสมบูรณ์ เมื่อให้ในปริมาณ 10 โดส (dose) ของ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และไม่มีผลข้างเคียง เลนทิแนนเป็นสาร β-(1-3)-glucan แลนทิแนนทำงานผ่านระบบภูมิคุ้มกันซึ่งตอบสนองโฮสท์ที่เป็นสัตว์ โดยการชักนำของอินเทอเฟียรอน (interferon) ซึ่งเป็นสารโปรตีนชนิดหนึ่งจากเซลล์ที่ถูกเชื้อไวรัสรุกรานมีฤทธิ์ป้องกัน การแพร่พันธุ์ของไวรัส

2.4.2 การลดไขมันในเลือด

เห็ดกินได้หลายชนิด เช่น เห็ดฟาง เห็ดหอม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม มีสารสกัดมีฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดยกเว้นเห็ดหูหนูสายพันธุ์ที่มีขนและเห็ดเข็มทอง สารสกัดจากพวกเห็ดเป๋าฮื้อทำให้ความดันโลหิตในหนูพุกขาวและหนูแฮมส์เตอร์ลดลง และสารสกัดหลายชนิดมีฤทธิ์ลดไขมันอาจเกิดโดยสารจำพวกเส้นใยที่มีปริมาณสูงในเห็ดช่วยดูดซับและขัดขวางการดูดซึมไขมันในทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังพบในหนูทดลองอีกว่าสารสกัดจากเห็ดบางชนิดช่วยเพิ่มการนำสารไขมันบางชนิดไปใช้ (ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์. 2546)

2.4.3 การต่อต้านไวรัส

สารสกัดจากเห็ดหลายชนิดที่กินได้ เช่น เห็ดหอม เห็ดตับเต่า และเห็ดหัวก้าน ช่วยยับยั้งไวรัสที่ทำให้เกิดไข้หวัดใหญ่ทั้งในหนูทดลองและในหลอดทดลอง เห็ดหัวก้านมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสได้ ซึ่งอาจไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สร้างสารภูมิคุ้มกัน ชื่ออินเทอเฟียรอนก็ได้ มีรายงานพบว่าสารสกัดจากเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV โดยการศึกษาในระดับหลอดทดลอง (Mukkawy *et al.* 1998)

ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์. (2546) รายงานผลการทดสอบสารสกัดจากพืชและเห็ดราหลายชนิดต่อผลการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ในหลอดทดลองและในหนู พบว่าสารสกัดจากแอปเปิ้ล ถั่วและผักขมไม่สามารถมีกิจกรรมการยับยั้งไวรัสได้ แต่ในเห็ดชิตาเกะพบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ และมีรายงานว่าของเหลวสกัดจากเห็ดชิตาเกาะยังมีผลป้องกันไวรัสโรคโปลิโอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 การต่อต้านจุลินทรีย์และพยาธิ

จากการที่นักวิทยาศาสตร์สามารถผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลินจากฟังไจได้ ทำให้นักวิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์จากเห็ดทั้งชนิดที่กินได้และกินไม่ได้ พบว่าเห็ดหอมและเห็ดอีกหลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านฟังไจและเห็ดบางชนิดมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิแต่ฤทธิ์เหล่านี้ยังไม่เด่นชัด (ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์. 2546)

2.4.5 การลดความดันโลหิต

ประเทศจีนและญี่ปุ่นใช้เห็ดเป๋าฮื้อในการลดความดันโลหิตมานานแล้ว จากการศึกษาวิจัยยืนยันว่ามีสารออกฤทธิ์นี้ในเห็ดบางชนิด นอกจากนี้ยังพบสารที่ออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดในสารสกัดจากเห็ดหอม เห็ดหลินจือ และเห็ดไมตาเกะ (maitake) (ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์. 2546)

2.5 แหล่งอาหารของเห็ด (ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520)

ตามปกติเห็ดมีความต้องการธาตุอาหารจากอินทรียวัตถุโดยผ่านขบวนการย่อยที่ค่อนข้างซับซ้อน จากการศึกษาพบว่า เห็ดมีความต้องการอาหารหลายชนิด แต่ละชนิดเห็ดใช้ในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังนี้

แหล่งอาหารคาร์บอน (Carbon source) ตามปกติเห็ดต้องการอาหารประเภทคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเกี่ยวกับการสร้างเซลล์ที่เป็นโครงสร้างของเห็ดและเป็นแหล่งให้พลังงานแก่เห็ด แหล่งอาหารประเภทคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลต่าง ๆ เช่น กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และ ฟรุคโตส ซึ่งจัดเป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก แต่ในวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดมีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส จึงจำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่ปุ๋ยหมักย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เหล่านี้ให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งเห็ดจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้

แหล่งอาหารไนโตรเจน (Nitrogen source) เห็ดต้องการอาหารประเภทไนโตรเจนไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน แหล่งอาหารประเภทไนโตรเจน ได้แก่ ปุ๋ยประเภทไนเตรต แอมโมเนีย และสารอินทรีย์ที่มีส่วนประกอบของไนโตรเจนในปุ๋ยหมักซึ่งเห็ดจะได้อาหารโปรตีนจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่เจริญเติบโตบนปุ๋ยหมัก โดยเฉพาะมูลม้า มูลโค มูลกระบือ มูลไก่ ฯลฯ ซึ่งมูลสัตว์แต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการเพาะเห็ดแตกต่างกัน

แหล่งอาหารประเภทธาตุอาหาร (Element) ในการเพาะเห็ดจำเป็นต้องเพิ่มธาตุอาหารหลัก (Major Element) เข้าไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงเห็ด เพื่อที่เห็ดจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ธาตุอาหารหลักได้แก่ แคลเซี่ยม (Ca) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซี่ยม (K) แมกนีเซี่ยม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) แม้ว่าเห็ดจะต้องการธาตุอาหารหลักไม่มากนักก็ตาม แต่ธาตุอาหารเหล่านี้มีส่วนทำให้ขบวนการทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของเห็ดเป็นไปตามปกติ ดังนั้นปุ๋ยหมักที่ใช้ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเห็ดจึงมีการใส่ยิปซั่ม ($CaSO_4$) ดีเกลือ ($Mg\ SO_4$) ปุ๋ยพวกฟอสฟอรัสและปุ๋ยพวกโพแตสเซี่ยม เพื่อที่เห็ดจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้อาหารพวกจุลธาตุ (Minor Element) ก็มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเห็ด ได้แก่ เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) โมลิบดินั่ม (Mo) จุลธาตุเหล่านี้อาจอยู่ในรูปของสารละลายซึ่งเห็ดต้องการใช้ในบางระยะของการเจริญเติบโต

แหล่งอาหารประเภทวิตามิน (vitamin) จากการศึกษาบทบาทของวิตามินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด พบว่า พวกไบโอติน (biotin) และไทอามีน (thiamine) มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด

แหล่งอาหารประเภทกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth Promoting Activity) จากการศึกษาสารที่มีผลต่อการกระตุ้นหรือเร่งการเจริญเติบโตของเห็ดมีหลายชนิด คือ Indole acetic acid (IAA) สารพวกเอสเทอร์ของกรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และยังมีสารพวกกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ เฟนิลอลานีน (phenylalanine) เมไธโอนีน (methionone) และโปรลีน (proline)

เห็ดเป็นฟังไจที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มาก ทั้งด้านอาหาร ยา และสิ่งแวดล้อม ในโลกนี้มีเห็ดประมาณ 38,000 ชนิด แต่คนรู้จักนำมารับประทานได้เพียง 2,000 ชนิด คนส่วนมากมักคิดถึงประโยชน์ของเห็ดในด้านการประกอบอาหาร โดยนำมาปรุงอาหารให้มีรสชาติที่อร่อยขึ้นเท่านั้น ความจริงแล้ว เห็ดมีความสำคัญกว่าที่คิด ทั้งในอดีตจนถึงปัจจุบันนี้ เห็ดหลายชนิดมีความสำคัญในด้านสุขภาพโดยตรงด้วย โดยใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อบำบัดโรค ผลิตเป็นอาหาร และผลิตภัณฑ์ต่างๆ

คนในสมัยก่อนมีการนำเห็ดกินได้มาใช้ในการรักษาสุขภาพโดยใช้เป็นยาอายุวัฒนะ ในปัจจุบันจึงมีผู้บริโภคเห็ดมากเพราะนอกจากเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสที่ดีแล้ว ยังมีคุณสมบัติทางโภชนาการและทางยาด้วย เห็ดมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากเพราะว่ามีแคลอรี และไขมันต่ำ แต่มีโปรตีน แร่ธาตุ วิตามินและเส้นใย (dietary fibre) มาก

มนุษย์จึงรู้จักนำเห็ดมาใช้ประกอบอาหารมาตั้งแต่อดีต ซึ่งเห็ดถือว่าเป็นอาหารที่ดีทั้งด้านเนื้อสัมผัสและกลิ่นรส รวมทั้งสารอาหารที่สมบูรณ์ คือมีโปรตีน แร่ธาตุ และเส้นใยมาก แต่มีแคลอรีและไขมันต่ำ ในช่วงปี ค.ศ. 1991-1994 อุตสาหกรรมการเพาะเห็ดได้เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 30.5 โดยเห็ด 6 ชนิดแรกที่มีการเพาะกันมากได้แก่ เห็ดกระดุม เห็ดหอม เห็ดกลุ่มนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนู เห็ดฟาง และเห็ดเข็มทอง ซึ่งส่วนใหญ่ใช้บริโภคเป็นอาหาร เมื่อมีความเจริญก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้น ทำให้เราทราบว่าเห็ดมีประโยชน์มากกว่านั้นโดยสามารถนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคได้

สารโพลีแซคคาไรด์ที่แยกได้จากเห็ดชนิดต่างๆ เช่น *Lentinus edodes* *Schizophyllum commune* และ *Coriolus versicolor* เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เห็ดมีคุณสมบัติทางยา โดยมีผลช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ยับยั้งการเกิดโรคมะเร็ง ลดระดับคอเลสเตอรอล และป้องกันเลือดจับตัวกันเป็นลิ่มทำให้เกิดการอุดตันเส้นโลหิต (thrombosis) (Okamura *et al.* 2001)

2.6 เห็ดหลินจือ *(Ganoderma lucidum)*

2.6.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดหลินจือ

2.6.1.1 การจำแนก (Taxonomy) (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538; Alexopoulos and Mims. 1996)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Ganoderma lucidum* (Fr) karst.
ชื่อสามัญ	Ling Zhi (ประเทศจีน)
	Man-mentake (ประเทศญี่ปุ่น)
	Lacquered mushroom (ประเทศอังกฤษ)
	Holy mushroom (ประเทศอังกฤษ)
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae
Series	Hymenomycetes
Order	Polyporales
Family	Polyporaceae
Genus	*Ganoderma*
Species	*lucidum*

2.6.1.2 ส่วนประกอบของเห็ดหลินจือ

1) หมวกดอก (Cap) หมวกดอกเห็ดหลินจือ อาจเกิดเป็นหมวกดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มๆ ละ 3-4 หมวกดอก ที่มีโคนดอกติดกัน หมวกดอกที่เกิดออกมาใหม่ๆ จะมีลักษณะเป็นทางสีเหลือง สีของดอกเห็ดจากจอดลงมาจะมีสีขาว สีเลือง และสีน้ำตาล ตามลำดับ ส่วนบนของหมวกดอกจะแผ่ออกคล้ายพัดเจริญเติบโตเต็มที่ ของหมวกดอกจะงองุ้มลง สีของหมวกดอกจะเข้มมากขึ้น เนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดจะมีผิวของหมวกดอกมีลักษณะเป็นเงามันคลายทาด้วยแชลแลค มีสีน้ำตาลแดง หรือสีเชสนัส

2) ครีบดอก (Gills) ครีบดอกของเห็ดหลินจือ จัดเป็นพวกหลายรู (polypore) ใต้หมวกดอกมีลักษณะร่องสีขาวหรือสีเหลืองจำนวนมากมาย ภายในรู (pore) ใต้หมวกดอกเป็นแหล่งกำเนิดของสปอร์ เมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างสปอร์และปล่อยสปอร์ออกมามากมาย สปอร์บางส่วนจะปลิวตกลงบนพื้นแต่สปอร์บางส่วนจะลอยขึ้นไปปกคลุมผิวของหมวกดอก มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเมื่อนำสปอร์มาชิมดูจะพบว่ามีรสขม สปอร์ของเห็ดหลินจือมีสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลเป็นผง สปอร์มีรูปร่างกลมรีปลายด้านหนึ่งตัด มีผนังหนา 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียบ ส่วนผนังชั้นในมีลักษณะคล้ายหนาม ยื่นออกมาชนผนังชั้นนอก

3) ก้านดอก (Stalk) เห็ดหลินจืออาจจะมีก้านดอกหรือไม่ก็ได้โดยเฉพาะเห็ดหลินจือที่ขึ้นตามตอไม้อาจไม่พบก้านดอกก็ได้ ก้านดอกอาจจะอยู่ถึงกลาง หรือค่อนไปข้างใดข้างหนึ่งของหมวกดอกก็ได้

2.6.1.3 ลักษณะทั่วไปของเห็ดหลินจือ

G. lucidum พบในธรรมชาติขึ้นกับไม้ในป่าเขตอบอุ่นและเขตร้อน อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2530) ได้สำรวจและรวบรวมเห็ดสกุล *Ganoderma* และสกุลใกล้เคียงในประเทศไทยพบ *G. lucidum* เจริญบนต้นไม้บางชนิด เช่น คูณ ก้ามปู หางนกยูงฝรั่ง ยางนา ยางพารา ดอกเห็ดมักขึ้นกับตอไม้บางกรณีอาจเป็นพาราสิตของรากพืช

เห็ดจำพวก Polypore ซึ่งมีรูอยู่ข้างใต้หมวกพบทั่วไปในประเทศไทย มีอยู่หลายชนิด เช่นที่ชื่อสามัญเรียกรวมๆ ว่าเห็ดหิ้ง รูปร่างคล้าย *Ganoderma* อาจเป็นเห็ดสายพันธุ์ *Ganoderma* แต่ไม่ใช่สกุล *G. lucidum* สำหรับเรื่องความเป็นพิษนั้นเห็ดพิษส่วนมากพบแต่ในเห็ดชนิดมีครีบ (agarics) ซึ่งยังไม่เคยเห็นรายงานเกี่ยวกับเห็ด Polypore ที่เป็นพิษ อย่างไรก็ตามไม่ควรนำเห็ดที่ไม่ทราบชื่อแน่นอนมาต้มรับประทาน เพราะถึงแม้เห็ดนั้นไม่เป็นพิษอาจมีเชื้อแปลกปลอม หรือสิ่งอื่นอยู่ที่เห็ดที่ทำให้เกิดโทษได้

ปรีชา กลิ่นเกษร (2530) รายงานว่าพบเห็ด *G. lucidum* ในบางพื้นที่ของประเทศไทยหลังจากนั้นความสนใจได้เพิ่มทวีขึ้นเกี่ยงกับเรื่องการใช้เห็ดหลินจือรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งอ้างถึงนายแพทย์ชาวญี่ปุ่น คือ Mr. Morishige Fukumi และคณะได้มาบรรยายเรื่องการใช้เห็ดหลินจือรักษาโรคมะเร็ง ซึ่งเป็นผู้เชี่ยวชาญทางการผ่าตัดมะเร็ง และมีประสบการณ์ในการรักษาโรคมะเร็งโดยใช้วิตามินซีและการควบคุมอาหารหลังการผ่าตัดมานาน โดยได้เริ่มใช้สารสกัดจากเห็ดนี้ 2 ปีพร้อมกับวิตามินซีและวิตามินอื่น วิตามินซีช่วยให้สารสกัดจากเห็ดซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่มีโมเลกุลเล็กลง ทำให้ร่างกายนำไปใช้ได้ดีขึ้น และสารสกัดนี้ช่วยทำลายเซลล์มะเร็ง รายงานนี้ปรีชา กลิ่นเกษร กล่าวว่านายแพทย์ Mr. Morishige Fukumi ยังมิได้ตีพิมพ์ผลงานเรื่องการใช้สารจากเห็ดหลินจือ แต่มีงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้วในเรื่องการใช้วิตามินซีกับการควบคุมอาหารในการรักษาโรคมะเร็ง ในการบรรยายกล่าวถึงปริมาณของสารสกัดที่ให้คนป่วยกินไม่ชัดเจนแต่ที่แน่นอนคือค่าใช้จ่ายในการซื้อสารสกัดนี้เพื่อการรักษาสูงมากเพราะการบำบัดต้องกินต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน 1 ปีครึ่ง และสารที่สกัดได้จากดอกเห็ดมีปริมาณน้อย และเห็ดก็มีราคาแพง

สุทธพรรณ ตรีรัตน์ (2533) ได้ร่วมมือกับหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ดจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดหลินจือที่เจริญบนต้นไม้ภายในของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วทำหัวเชื้อ เพาะลงถุงขี้เลื่อย ตามขั้นตอนพื้นฐานของการเพาะเห็ดด้วยถุงขี้เลื่อย โดยใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพาราผสมรำ ยิบซั่ม ดีเกลือ บ่มในถุงที่อุณหภูมิห้อง เพาะในช่วงฤดูฝนซึ่งอากาศไม่ร้อนจัดเส้นใยเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ได้ดี เมื่อเส้นใยเต็มถุงแล้วต้องรอให้ก้อนเชื้อสมบูรณ์อีก 2 สัปดาห์ จึงทำการเปิดออกโดยดึงจุกสำลีออก แล้วให้ความชื้น เห็ดจะเริ่มแสดงส่วนก้านขึ้นมาในเวลา 7-10 วัน ดอกเห็ดเจริญเติบโตช้า ใช้เวลาอีกประมาณ 3 สัปดาห์ จึงพัฒนาเต็มที่ สร้างรู (pore) ใต้หมวกและสร้างสปอร์ ลักษณะดอกที่เพาะจากถุงขี้เลื่อยอาจมีรูปร่างและสีต่างจากที่ขึ้นในธรรมชาติ

ชาวญี่ปุ่นเรียนรู้เรื่องสมุนไพรบางชนิดจากชาวจีน และเริ่มให้ความสนใจเห็ดนี้เมื่อประมาณ 20 ปีที่แล้วได้มีการทำวิจัยอย่างกว้างขวางในเรื่อง การสกัดสารจากเห็ด ชนิดของสาร และทดสอบสมบัติหรือสรรพคุณในการบำบัดโรค มีการรวบรวมข้อมูลในเรื่องนี้ และรายชื่อเอกสารอ้างอิงกว่า 40 รายการเป็นผลงานของชาวญี่ปุ่นกว่าครึ่ง นอกนั้นคือ เกาหลี จีน และประเทศอื่นๆ สรุปโดยสังเขปได้ดังนี้ สารและประเภทของสารที่มีใน *Ganoderma lucidum* คือ Cholestan (steroid) Esgosterol (steroid) Ganoderan (carbohydrate) Ganoderic acid (triterpene) (มีหลายชนิด) *G.lucidum* antibiotic (carbohydrate) *G. lucidum* polysaccharide (carbohydrate) และ Lucidenic acid (triterpene) (ปรีชา กลิ่นเกษร. 2530)

Sone *et al.* (1985) ศึกษาสารที่มีสมบัติต่อต้านเนื้องอก (antitumor) คือ (1-3)–เบต้า-ดี-กลูแคน ((1-3) –β-D-glucan) ซึ่งเป็น Polysaccharide พบในเห็ดหลายชนิดที่สำคัญเช่นในเห็ดหอม เห็ดหลินจือ และในเห็ดอื่นๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน มีรายงานถึงวิธีสกัดสารและการทดสอบสมบัติของสารชักนำเกิดกับหนูที่ให้เป็นเนื้องอกชนิด Sacroma-180 โดยดูเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ซึ่งให้ผลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้สูงสุดถึง 96 เปอร์เซ็นต์

นอกจากเรื่องเนื้องอกแล้ว Sone *et al.* (1985) รายงานถึงผลของสารสกัดของเห็ด *G. lucidum* เกี่ยวกับโรคหลายชนิด เช่นโรคภูมิแพ้ โรคความดัน โรคตับ โรคกระเพาะ และเพิ่มความต้านทานโรค ลดน้ำตาลในเลือด การทดสอบกับสิ่งมีชีวิต (in vivo) เกือบทั้งหมดชักนำให้เกิดกับหนูและมีการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) บ้าง

เห็ดหลินจือได้รับยกย่องว่าเป็นยาสมุนไพรมาหลายพันปีทั้งในประเทศจีนและในประเทศญี่ปุ่น พระเจ้าจักรพรรดิหลายพระองค์ในราชวงศ์ของจีน และพระราชวงศ์ของญี่ปุ่นดื่มชาและน้ำต้มจากเห็ดหลินจือเป็นยาบำรุงร่างกาย และเพื่อให้มีอายุยืนนาน ชนเผ่าเต๋าโบราณนิยมแสวงหาเครื่องดื่มที่เป็นน้ำเชื่อมหวานเพื่อรักษาความหนุ่มไว้ตลอดกาล และเชื่อกันว่าเห็ดหลินจือเป็นตัวยาตัวหนึ่งในจำนวนตัวยาที่มีส่วนประกอบในนั้นด้วย (ปริญญา รัตนพิมาน. 2535)

เห็ดหลินจือยังใช้เป็นยาแก้อาการนอนไม่หลับ แก้แผลในกระเพาะ อาการอ่อนเพลียทางระบบประสาท ข้ออักเสบ ไตอักเสบ โรคหอบหืด หลอดลมอักเสบ โรคความดันโลหิตสูง และแก้พิษของสารพิษต่างๆนอกจากนี้ยังใช้รักษาอาการเครียดที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติของระบบเส้นประสาทที่เลือดมาเลี้ยงสมองไม่เพียงพอ และโรคกล้ามเนื้อลีบ ทั้งหมดนี้จะให้ผลการรักษาที่ดีได้ในระดับต่างๆ กัน ในปัจจุบันมีการนำเห็ดหลินจือไปใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น ลดหรือเพิ่มความดันโลหิต กระตุ้นการทำงานของตับ ล้างเลือดให้สะอาด ช่วยในเพิ่มการทำงานของระบบภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

56637

คุ้มโรค คลายความตึงเครียดทางระบบประสาท และเป็นตัวปรับสภาวะเพื่อช่วยให้ร่างกายต่อสู้กับความเครียดได้ เห็ดหลินจือยังเป็นที่ยอมรับกันว่าใช้เป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มโรคในขณะที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งควบคู่กัน การใช้รักษาโรคมะเร็งนี้เขาใช้กันมาเป็นเวลาหลายศตวรรษแล้วในโลกตะวันออก ตามแนวคิดที่ว่าใช้เป็นยาบำรุงนั้น เห็ดหลินจือยังเป็นยาที่ช่วยเพิ่มความแข็งแกร่งของความต้านทานในร่างกายที่จะต่อสู้กับแรงต่อต้านภายนอกได้มากขึ้นอีกด้วย

(ปริญญา รัตนพิมาน. 2535)

ปริญญา รัตนพิมาน (2535) ได้กล่าวไว้ว่าส่วนที่คล้ายรากที่เรียกว่าไมซีเลียมของเห็ดหลินจือประกอบด้วยสารพวกพอลิแซคคาไรด์หลายชนิด ซึ่งช่วยให้เกิดการสร้างอินเตอร์ฟีรอน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตขึ้นภายในเซลล์เพื่อใช้ในการต่อสู้กับการติดเชื้อไวรัส

สารพอลิแซคคาไรด์เหล่านี้ยังเป็นตัวต่อต้านเนื้องอกอีกด้วยในขณะเดียวกันก็ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรค

2.6.1.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็ดหลินจือ

Chung *et al.* (2001) พบว่าสารสกัด 2 ชนิดที่แยกได้มาจากอาหารเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหลินจือ คือสาร A (เป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ มีมวลโมเลกุลขนาด 1.2 X 10^6 ดาลตัน และสาร C (เป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำ มีมวลโมเลกุลขนาด 1.0 X 10^6 ดอลตัน) พบว่าสารทั้งสองชนิดที่แยกมาได้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด Hep3B AGS และ A549 ในร่างกายของคนได้ร้อยละ 93-85 และสามารถยับยั้งการเกิดพิษของเซลล์ปอด (WRL68) ของคนได้ร้อยละ 25 โดยใช้สารทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุด 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

Lin *et al.* (1995) ศึกษาเห็ดสายพันธุ์ *G. formosanum* ว่าสามารถลดการทำงานของสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ที่พยายามจะเข้าทำลายเซลล์ตับของมนุษย์ โดยใช้ความเข้มข้น 10 30 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ตับได้ร้อยละ 48.06 49.22 และ 63.40 ตามลำดับ นอกจากนั้นถ้าใช้สารสกัดจากเห็ด *G.lucidum* ที่ความเข้มข้น 30 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะสามารถป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ตับได้ร้อยละ 45.85 และ 65.89 ถ้าใช้สารสกัดจากเห็ดสายพันธุ์ *G. neo-japonicum* ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีผลการป้องกันการถูกทำลายเซลล์ตับได้ร้อยละ 37.02

2.7 เห็ดนางรม

เห็ดนางรมมีต้นกำเนิดเดิมมาจากทางยุโรป ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับเห็ดมะม่วง หรือเห็ดขอนขาว ที่เกิดขึ้นมาตามธรรมชาติในฤดูฝน แต่แตกต่างกันที่เห็ดนางรม สามาถนำมาเพาะให้เกิดดอกได้ตลอดทั้งปีทั้งยังเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูงคือประกอบไปด้วยธาตุอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน รวมทั้งแร่ธาตุต่างๆ และวิตามินที่อยู่ในเห็ดนางรมหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม

2.7.1.1 การจำแนก (Taxonomy) (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538; Alexopoulos and Mims. 1996)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Pleurotus ostreatus* (Fr) Kummer
ชื่อสามัญ	เห็ดนางรม Oyster mushroom
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae
Series	Hymenomycetes
Order	Agaricales
Family	Tricholomataceae
Genus	*Pleurotus*
Species	*ostreatus*

2.7.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมมีชื่อตรงกับภาษาอังกฤษว่า Oyster Mushroom มีสารที่ใช้ย่อยสารประกอบเชิงซ้อน จำพวกเซลลูโลส และลิกนินได้เป็นอย่างดี บางครั้งจะพบว่าเป็นปรสิตอย่างอ่อน (weak parasite) คือกินต้นไม้ที่ยังมีชีวิตและต้นไม้ที่ตายแล้ว ส่วนประกอบของเห็ดนางรมมีดังนี้

1. หมวกดอก (Cap) หรือ Pileus หมวกดอกมีลักษณะคล้ายหอยนางรม หมวกดอกมีลักษณะแบนราบไม่เหมือนเห็ดนางฟ้า กลางหมวกตอกมีลักษณะเว้าเป็นแอ่ง หมวกดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-15 เซนติเมตร หมวกดอกอาจมีสีขาวหรือสีเทาก็ได้ และลักษณะของหมวกดอกจะรวมเป็นเนื้อเดียวกับก้านดอก

2 ก้านดอก (Stalk) เป็นส่วนที่ใช้ชูก้านดอกขึ้นไปในอากาศ ก้านดอกค่อนข้างสั้นและเจริญเข้าหาแสงสว่าง

3 ครีบดอก (Gills) มีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ สีขาวหรือสีเทาที่บริเวณครีบดอกเป็นแหล่งสร้างสปอร์ สปอร์ของเห็ดนางรมมีขนาด 8-12 X 3-4 ไมโครเมตร

2.7.1.3 วงจรชีวิตของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบ Heterothallic ซึ่งเกิดจากดอกเห็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างเบซิติโอสสปอร์ (basidiospore) เมื่อสปอร์พวกนี้ปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยขั้นที่ 1 (primary mycelium) ออกมา เส้นใยขั้นที่ 1 จะมีนิวเคลียสเพียงอันเดียว (haploid) จากนั้นเส้นใยขั้นที่ 1 ที่เจริญมาจากสปอร์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกัน จะรวมตัวกันแล้วพัฒนาไปเป็นเส้นใยขั้นที่ 2 (secondary mycelium) ซึ่งมีนิวเคลียส 2 อัน เส้นใยขั้นที่ 2 นี้ อาจจะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Dikaryotic mycelium เส้นใยขั้นที่ 2 จะรวมตัวกันเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มก้อน พร้อมที่จะสร้างดอกเรียกเส้นใยในระยะนี้ว่า เส้นใยขั้นที่ 3 (tertiary mycelium) จากนั้นเส้นใยจะค่อยๆ พัฒนาไปเป็น Fuiting body และเจริญไปเป็นดอกเห็ดต่อไป

2.7.1.4 ธรรมชาติของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีการดำรงชีพแบบ Saprophytic fungi แต่ในบางครั้งก็จัดเป็นพวกปาราสิต (Parasite) โดยเจริญเติบโตบนต้นไม้ที่มีชีวิตและเมื่อต้นไม้ตาย เห็ดนางรมก็ยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อีก การดำรงชีพตามธรรมชาติของเห็ดนางรมมีดังนี้

1. เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีความสามารถย่อยสารประกอบ ที่มีโมเลกุลซับ ซ้อนได้ดีกว่าเห็ดฟาง โดยเฉพาะพวกเซลลูโลส ลิกนิน ฯลฯ จึงทำให้วัสดุที่ใช้ในการเพาะ โดยเฉพาะขี้เลื่อยไม้ยางพาราไม่จำเป็นต้องผ่านการหมักก็ได้

2 ความสามารถในการดำรงชีวิต ในกรณีที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เห็ดนางรมสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยการสร้างแคลมัยโดสปอร์ (Clamydospore) อยู่ตามตอไม้ เมื่ออากาศชุ่มชื้นและสภาพแวดล้อมเหมาะสมเห็ดนางรมก็จะงอกเส้นใยออกมา จากนั้นเส้นใยก็จะพัฒนาไปเป็นดอก และมีการสร้างสปอร์แพร่พันธุ์ต่อไป และเห็ดนางรมยังสามารถเจริญเติบโตบนท่อนไม้ได้อย่างดี

3 เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดเล็ก น้อย หรือมี พีเอช 5.0-5.2 การผสมขี้เลื่อยหรือวัสดุที่ใช้เพาะไม่จำเป็นต้องใส่ปูนขาวลงไป

4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด ควรอยู่ประมาณ 30-32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะต่อการออกดอก หรือสร้างดอกประมาณ 25 องศาเซลเซียส

5 เส้นใยของเห็ดนางรมมีความสามารถในการเจริญเติบโตและมีการเชื่อม ต่อของเส้นใยได้เร็วมาก จึงทำให้เส้นใยเดินเต็มก้อนเชื้อได้เร็วกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ และยังมีความสามารถในการใช้น้ำตาลที่อยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรทได้อย่างดี

2.8 เห็ดตีนแรด

2.8.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด

2.8.1.1 การจำแนก (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Trichloloma crassum* (Berk.) Sacc.
ชื่อสามัญ	**เห็ดตีนแรด เห็ดฉั่น เห็ดตับเต่าขาว**
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae
Order	Agricales
Family	Trichlolomataceae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genus *Trichloloma*

Species *crassum*

2.8.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดในสกุล *Trichloloma* เกือบทั้งหมดพบว่าอยู่ในเขตอบอุ่น มีเพียง 2-3 สปีชีส์เท่านั้นที่พบในเขตร้อนและมีหลายชนิดที่สามารถนำมารับประทานได้ เช่น เขตยุโรป ได้แก่ *T. albobrunneum* และ *T. flavovirens* และ อเมริกาใต้ ได้แก่ *T. mutsukake* (วสันณ์ เพชรรันต์ และ วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2530) ญี่ปุ่นและฮ่องกง ได้แก่ *T.mutsukake* และ *T. mongolicum* ส่วนในประเทศไทย ได้แก่ *T. crassum* (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538) ซึ่งเห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ เจริญเติบโตได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย สำหรับการเรียกชื่อนั้นภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่าเห็ดตีนแรด ภาคกลางเรียกเห็ดตับเต่าขาวหรือเห็ดยักษ์ ภาคเหนือเรียกว่าเห็ดจั่น ภาคใต้เรียกว่าเห็ดหัวสุม (ชาญยุทธ์ ภานุทัต และคณะ. 2543)

ลักษณะของดอกเห็ดประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1 หมวกดอก (Cap) หมวกดอกขณะที่ยังไม่บานเต็มที่มีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลมคว่ำ ขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน และค่อยๆ แผ่ขยายออกเมื่อเจริญเต็มที่ ดอกจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 3.1-12.5 เซนติเมตร ผิวดอกเห็ดด้านบนเรียบสีขาว หรือขาวปนเทา เมื่อแก่จัดอาจเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน หมวกดอกมีความหนา 1-3 เซนติเมตร เนื้อด้านในสีขาว

2 ครีบดอก (Gills) ขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกดอก จำนวนครีบถ้านับจากขอบดอกประมาณ 20-25 ครีบต่อความยาวดอก 1 เซนติเมตร ครีบดอกจะเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก ครีบดอกจะเปราะและขาดง่าย ครีบดอกเป็นอิสระจากก้านดอก

3 ก้านดอก (Stalk) มีสีขาว ปลายด้านบนติดอยู่กึ่งกลางของหมวกดอก ตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีความยาวตั้งแต่ 7-27 เซนติเมตร โคนก้านจะใหญ่กว่าส่วนที่ติดอยู่กับหมวกดอกเล็กน้อย เมื่อดอกแก่ขึ้นโคนก้านดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเนื้อหรือสีชมพูอ่อน เนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะมีลักษณะสารกันโปร่งๆ ส่วนเนื้อเยื่อตรงกลางของก้านดอกจะมีลักษณะเป็นเส้นและมีรูเล็กๆ คล้ายเห็ดนางฟ้า

4 สปอร์ (Spore) เมื่อเห็ดตีนแรดเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์ที่บริเวณครีบดอก สปอร์มีสีขาว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ขนาด 5-5.6 X 6.5-7.6 ไมโครเมตร (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538)

2.8.2 การเพาะเห็ดตีนแรด (พันทวี ภักดีดินแดน. 2519)

เห็ดตีนแรด หรือ เห็ดตับเต่าขาวจัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย เห็ดชนิดนี้สามารถนำมารับประทานเป็นอาหารได้ หมวกเห็ดมีขนาดใหญ่เมื่อกางออกเต็มที่จะมีลักษณะคล้ายร่ม ผิวของหมวกดอกเรียบ ก้านดอกมีขนาดใหญ่ เห็ดชนิดนี้มีรสชาดดี เนื้อเหนียว ถ้านำมาเปรียบเทียบกับเห็ดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติแล้ว คุณภาพของเห็ดตีนแรดจะเป็นรองเฉพาะเห็ดโคนเท่านั้น ถ้านำเห็ดตีนแรดมาประกอบอาหารจะมีกลิ่นหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รสหวาน เนื้อกรุบ กินอร่อย เห็ดชนิดนี้ในแต่ละท้องถิ่นมีชื่อเรียกแตกต่างกัน โดยภาคเหนือเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า เห็ดจั่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่า เห็ดตีนแรด (เพราะมีขนาดใหญ่) ส่วนภาคกลาง เรียกว่า เห็ดตับเต่าขาว เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีบนพื้นดินที่มีใบไม้ผุพังทับถมอยู่และในพื้นดินที่มีการระบายน้ำดี บริเวณทุ่งหญ้าหรือป่าโปร่งก็ได้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีต้นไม้ใหญ่ ๆ ถูกโค่นและทิ้งส่วนของรากไว้ในดิน เมื่อตอไม้เริ่มผุเห็ดตีนแรดก็จะเจริญเติบโตตามรากไม้ หรือตามพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุ หลังจากที่ฝนตกและมีสภาพความชื้นเหมาะสมที่เห็ดตีนแรดจะเจริญเติบโตและสร้างดอกเห็ดโผล่พ้นพื้นดินขึ้นมาเป็นกลุ่ม ๆ บางครั้งมีความสูงถึง 2 ฟุต

เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่น่าสนใจและน่าจะมีความสำคัญมากขึ้นในอนาคต เพราะเห็ดชนิดนี้มีขนาดใหญ่ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานโดยไม่เน่าเสียแต่คุณภาพจะด้อยลงเล็กน้อย ประกอบกับเห็ดตีนแรดสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารแทบทุกชนิดคล้ายเห็ดในสกุลเห็ดนางรมจึงเหมาะที่จะนำมาเพาะในช่วงฤดูฝน เห็ดตีนแรดเป็นเห็ดที่มีเนื้อดอกดี กรอบ อร่อย และมีคุณสมบัติไม่ย่อยสลายตัวเอง (autolysis) จึงทำให้เห็ดชนิดนี้จัดเป็นเห็ดที่น่าสนใจและน่าจะเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญในอนาคต ปัจจุบันได้มีฟาร์มเห็ดหลายแห่งได้ผลิตก้อนเชื้อเพื่อเก็บผลผลิตจำหน่ายทั้งในรูปของก้อนเชื้อและดอกเห็ด แต่เนื่องจากยังขาดการประชาสัมพันธ์ที่ดี จึงทำให้ประชาชนรู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่มากนักประกอบกับเห็ดชนิดนี้มีขนาดใหญ่มากจนทำให้ประชาชนที่ไม่รู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่กล้ารับประทาน แต่ถ้ามีการประชาสัมพันธ์ที่ดีแล้ว เห็ดตีนแรดน่าจะเป็นเห็ดที่สามารถเข้ามาทดแทนเห็ดชนิดอื่นได้เป็นอย่างดี

2.9 เห็ดนางฟ้า

2.9.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางฟ้า

2.9.1.1 การจำแนก (Taxonomy) (ปัญญา โพธิ์จิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing
ชื่อสามัญ	เห็ดนางฟ้า หรือ Sajor-caju
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae
Order	Agricales
Family	Tricholomataceae
Genus	*Pleurotus*
Species	*sajor-caju*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดนางฟ้าจัดเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป๋าฮื้อ แต่เห็ดนางฟ้าจะมีหมวกดอกหนาและเนื้อแน่นกว่าเห็ดนางรม ลักษณะของดอกทั่วๆ ไป ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1 หมวกดอก (Cap) หมวกดอกจะมีเนื้อแน่น และมีสีคล้ำคล้ายเห็ดเป๋าฮื้อ แต่สีของดอกจะจางกว่า หมวกดอกจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-6 นิ้ว ดอกอาจจะออกมาเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือเป็นกระจุกก็ได้

2 ก้านดอก (Stipe) ก้านดอกของเห็ดนางฟ้าจะเป็นเนื้อเดียวกับหมวกดอก คล้ายเห็ดนางรม แต่มีเนื้อแน่นสีขาว และไม่มีวงแหวนรอบก้านดอกถ้าเห็ดนางฟ้าเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติตามขอนไม้ ดอกเห็ดจะมีลักษณะเรียงรายลดหลั่นกันเป็นชั้นๆ ก้านดอกจะสั้นมาก

3 ครีบดอก (Gills) ครีบดอกของเห็ดนางฟ้าจะมีสีขาว ยาวตลอด และบริเวณครีบดอกจะเป็นแหล่งสร้างสปอร์ของเห็ดนางฟ้า

4 เส้นใยของเห็ดนางฟ้า (Mycelium) เส้นใยจะมีลักษณะค่อนข้างละเอียด และมีสีขาวมากกว่าเห็ดนางรมเล็กน้อย การเจริญเติบโตของเส้นใยจะมีลักษณะคล้ายเห็ดนางรม

2.9.1.3 คุณค่าทางอาหารของเห็ดนางฟ้า (ราชบัณฑิตยสถาน. 2539)

จากการที่เห็ดนางฟ้าเป็นเห็ดที่มีกลิ่นหอม เนื้อแน่น เจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูฝน ต่อต้นฤดูหนาว ประมาณเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน เป็นช่วงที่เหมาะต่อการเพาะเห็ดนางฟ้ามาก จึงทำให้เห็ดนางฟ้าจัดเป็นเห็ดที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง นอกจากนี้เห็ดนางฟ้ายังจัดเป็นเห็ดที่มีปริมาณวิตามินและแร่ธาตุค่อนข้างสูง เห็ดนางฟ้าประกอบด้วยคุณค่าทางอาหาร ดังต่อไปนี้

1) ปริมาณของธาตุอาหาร (Nutrient) เห็ดนางฟ้ามีประมาณธาตุ อาหารหลายอย่าง ดังนี้

แคลเซียม	(Ca)	20	มิลลิกรัม/100 กรัม
ฟอสฟอรัส	(P)	760	มิลลิกรัม/100 กรัม
โปแทสเซียม	(K)	3260	มิลลิกรัม/100 กรัม
เหล็ก	(Fe)	124	ส่วนต่อล้านส่วน
แคสเมี่ยม	(Cd)	0.3	ส่วนต่อล้านส่วน
สังกะสี	(Zn)	12.0	ส่วนต่อล้านส่วน
ทองแดง	(Cu)	12.2	ส่วนต่อล้านส่วน
ตะกั่ว	(Pb)	3.2	ส่วนต่อล้านส่วน

2) ปริมาณของกรดอะมิโน (amimo acid) ปริมาณของกรดอะมิโน คำนวณในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม ของ Crude protein nitrogen

Isoleucine	78.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Leucine	68.1
Lysine	73.5
Methionine + Cystine	62.7
Phenylalanine + Tyrosine	137.8
Threonine	88.0
Tryptophan	91.6
Valine	76.1

2.10 งานวิจัยเกี่ยวกับเห็ดที่ใช้ในการรักษาโรค

Moss (2002) ได้พบเอกสารของประเทศแลตเวีย ที่กล่าวว่าเห็ดเขาเหม็น (stinkhorn) สามารถใช้ในการป้องกันโรคมะเร็งในแถบประเทศในยุโรปตะวันออก โดยนำมาทำเป็นน้ำเห็ด ซึ่งในน้ำเห็ดจะอุดมไปด้วย Polysaccharide Phenol-Carbolic Acid และสารอาหารอื่นอีกหลายชนิด มีการทดลองโดยให้หนูที่มีอาการของเนื้องอกได้ดื่มน้ำเห็ดเหล่านี้พบว่ามีการยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนเนื้องอกในหนูได้ร้อยละ 68-82 และรายงานของศูนย์มะเร็งแห่งชาติญี่ปุ่นพบว่าเนื้องอกหรือมะเร็งสามารถลดลงได้เมื่อมีการใช้สาร Krestin (PSK) ซึ่งเป็นสารที่สกัดจากเห็ดของประเทศญี่ปุ่น คือเห็ดไมตาเกะ และเห็ดหลินจือซึ่งจะมีคุณสมบัติในการเพิ่มความสามารถของ Killer cell ในส่วนของภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความสามารถของแอนติบอดี้ (antibody)

มหาวิทยาลัยเมซซาชูเซสในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ทดลองใช้สารสกัดจากเห็ดสายพันธ์ *Grifola frondosa* (เห็ดไมตาเกะ) รักษาโรคมะเร็งปากมดลูกและโรคลูคิเมีย (Mushroom and Health. 1998) มีเห็ดหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคชนิดต่างๆได้ แสดงดังตารางที่ 2.2

มาลี จิรวงศ์ศรี (2000) รายงานว่าสารพอลิแซคคาไรด์เช่น อินูลิน เป็นสาร ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหาร พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น หัวชิโครี เห็ด หัวหอม หัวกระเทียม กล้วย อินูลินย่อยไม่ได้โดยน้ำย่อยในลำไส้ แต่สามารถย่อยได้โดยอาศัยจุลินทรีย์ใน ลำไส้ใหญ่ จากการย่อย อินูลินจะได้น้ำตาลฟรุกโตส ปี 1905 มีการแนะนำให้ผู้ป่วยเบาหวานบริโภคอินูลินและพบว่าปริมาณ อินูลิน 40-100 กรัม/วัน มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลง

ตามขนาดของโครงสร้างอินูลินมีค่า DP (Degree of Polymerization) ประมาณ 10 และตามโครงสร้างจะมีโอลิโกฟรุกโตส (oligofructose) ประกอบอยู่เป็นโครงสร้างกลุ่มย่อย ในพืชต่างชนิดกันจะมีปริมาณอินูลิน และโอลิโกฟรุกโตสที่แตกต่างกัน ดังแสดงตามตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงสรรพคุณของเห็ดหลายชนิดที่ใช้ในการรักษาโรคชนิดต่างๆ

ตัวอย่างเห็ดและการรักษาโรค						
Mushroom/ Uses	***Cordyceps sinensis***	*Lentinula edodes* **Shiitake**	*Ganoderma lucidium* **Reishi**	*Grifola frondosa* **Maitake**	*Tremella fuciformis* **Silver-Ear**	*Poria cocos* **Hoelen**
Anti-Viral	+	+	+			+
Anti-Tumor	+	+	+	+	+	+
Immune Enhancer	+	+	+	+	+	+
Anti-inflammatory			+		+	
Blood Pressure	+	+	+	+	+	
Cardio-Vascular	+	+	+		+	
Lower Cholesterol	+	+	+		+	
Increase Libido	+	+				
Kidney Tonic	+		+			
Asthma / Bronchial	+		+		+	
Stress Reduction	+		+			
Diabetes				+	+	
Liver / Hepatitis	+	+	+	+	+	+
Chitin	+	+	+	+	+	+

+ แสดงความสามารถของเห็ดที่นำมาทำยารักษาโรคต่างๆ

ที่มา : Mushroom and Health (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ปริมาณอินูลิน และโอลิโกฟรุกโตสในอาหารชนิดต่างๆ

อาหารชนิดต่างๆ	ปริมาณ Inulin (%)	ปริมาณ Oligofructose (%)
Onion (หัวหอม)	2-6	2-6
Jerusalem artichoke	16 – 20	16 - 20
Chicory (ชิโครี)	15 – 20	5-10
Asparagus (แอสปารากัส)	1 – 30	1.-20
Leek (ต้นกะเทียม)	3-10	2-5
Garlic (กระเทียม)	9.-16	3-6
Artichoke	3 – 10	< 1
Banana (กล้วย)	0.3 - 0.7	0.3 - 0.7
Wheat (ข้าวสาลี)	1 – 4	I-4
Rye (ข้าวไรย์)	0.5 – 1	0.5 - 1
Barley (ข้าวบาเลย์)	0.5 - 1.5	0.5 - 1.5
Dandelion	12 – 15	NA
Burdock	3.5 – 4	NA

ที่มา : มาลี จิรวงศ์ศรี (2000)

อินูลินและโอลิโกฟรุกโตสจัดเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) หมายความว่าเป็นส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารตอนบนและสามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียชนิดเฉพาะเจาะจงที่มีอยู่ตามปกติใน ลำไส้ใหญ่ เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli ส่งผลดีต่อสุขภาพ มีการทดลองบริโภคอินูลิน และโอลิโกฟรุกโตส 5-20 กรัม/วัน เป็นเวลา 15 วัน สามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียชนิด Bifidobacteria และ Lactobacilli ในลำไส้ได้ (มาลี จิรวงศ์ศรี. 2000) ในกรณีที่มีการรับประทานอินูลิน และโอลิโกฟรุกโตส ในปริมาณที่มากกว่า 30 กรัม/วัน จะมีอาการท้องอืด มีแก๊สในกระเพาะมาก แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของอินูลิน และโอลิโกฟรุกโตสให้ผลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะของแต่ละบุคคลอินูลินและโอลิโกฟรุกโตสยังมีผลช่วยในการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียมของร่างกาย (มาลี จิรวงศ์ศรี. 2000) จากคุณสมบัติที่อินูลิน และโอลิโกฟรุกโตสละลายน้ำได้และมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง ไม่มีผลข้างเคียงกับระบบประสาทสัมผัสรสชาดหวานเล็กน้อย จึงมีการพัฒนานำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะต่าง ๆ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) สารทดแทนไขมันในครีม สลัดครีม มูส(Mousses) เนยแข็ง ไอศกรีม

2) สารทดแทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ช็อกโกแลต

3) เพิ่มใยอาหารในผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ขนมอบ

4) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

2.11 งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เห็ดเพื่อหมักแอลกอฮอล์ทดแทนเชื้อยีสต์

Okamura *et al.* (2001) ทำการศึกษาพบว่าเห็ดบางชนิดสามารถผลิตแอลกอฮอล์และสามารถนำมาใช้ในการหมักไวน์แทนการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งในการทดลองใช้เห็ด 3 สายพันธุ์คือ *Pleurotus ostreatus* *Agaricus blazie* และ *Flammulina velutipes* ซึ่งเป็นเห็ดที่รับประทานได้และยังอุดมไปด้วยไฟเบอร์ โปรตีน และวิตามินหลายชนิด เช่น thiamine riboflavin และมีคุณสมบัติป้องกันโรคมะเร็งและเลือดจับตัวเป็นลิ่ม ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* จะมีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 12.2 ความเข้มข้น 2.6 โมลาร์ ถือว่าเป็นปริมาณที่มาก ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากเห็ดสายพันธุ์ *Agaricus blazie* จะมีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 8 ความเข้มข้น 1.7 โมลาร์ มีปริมาณแอลกอกฮอล์ที่ค่อนข้างน้อย ไวน์ที่ได้จาก *Agaricus blazie* จะมีปริมาณของ เบต้า-ดี-กลูแคน (β-D-glucan) ร้อยละ 0.68 ซึ่ง β-D-glucan มีคุณสมบัติป้องกันการเกิดมะเร็งได้ ส่วนแอลกอฮอล์ที่ผลิตจากเห็ดสายพันธุ์ *Flammulina velutipes* สามารถป้องกันการจับตัวของเลือดช่วยให้มีการยืดระยะเวลาการเกาะตัวเป็นก้อนของเลือดได้มากกว่าไวน์ธรรมดาทั่วไปถึง 2.2 เท่า ดังนั้นไวน์ที่ผลิตจากเห็ดสามารถที่จะนำมาใช้เป็นอาหารของคนที่ต้องการการดูแลเรื่องของสุขภาพเพราะสามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็งและโรคเส้นเลือดอุดตัน

อิศรา เจียนิวัตต์ และเอกชนก เทียนทอง (2546) นำเส้นใยเห็ดนางฟ้ามาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่ผสม Malt Extract ร้อยละ 10 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน นำสารละลายออกมาวัดปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Ebulliometer พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 2 เส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เลี้ยงในสารละลายละลาย Malt Extract ร้อยละ 10 และเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เลี้ยวในน้ำกลั่นวัดปริมาณแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 0

ด้วยเหตุนี้จึงมีการผลิตไวน์จากเห็ด คาดว่าจะเป็นเครื่องดื่มอีกชนิดหนึ่งที่สามารถป้องกันโรคมะเร็งได้ดีเหมือนกับเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพชนิดอื่นๆได้

2.12 เทคนิคอิเล็คโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะครีลาไมด์-เจล (Polyacrylamide-gel electrophoresis) (อาภัสสรา ชมิดท์. 2538)

อิเล็คโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักว่าชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน โปรตีนมีประจุได้ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อื่นๆ ใน side-chain ที่ค่าพีเอชหนึ่งๆ ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

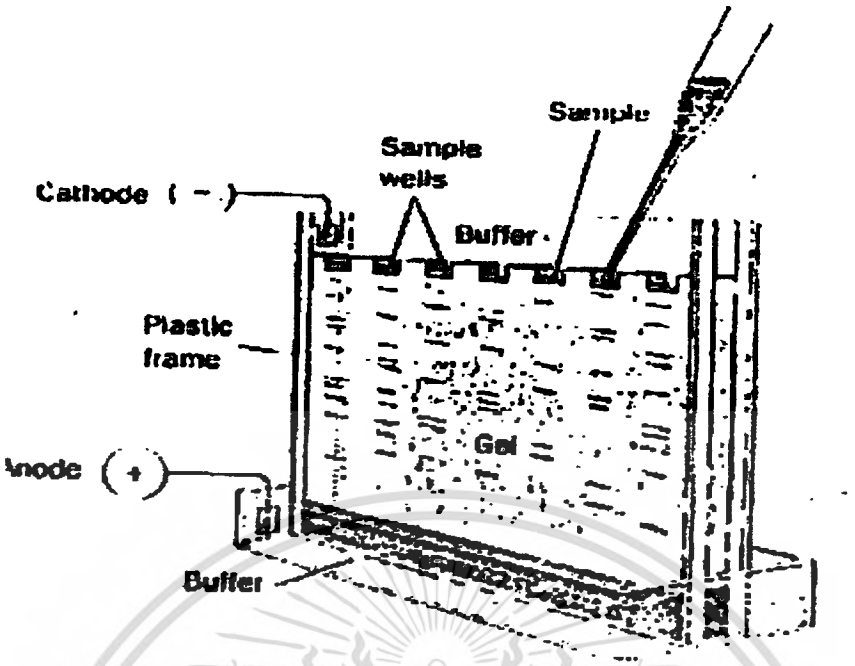
สารละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจเป็น บวก ลบ หรือเป็นกลางก็ได้

การแยกโดยอิเล็คโทรโฟรีซิสนั้น จะมีตัวกลางเป็นสื่อให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านไป ซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีคุณสมบัติเฉื่อย ตัวกลางที่ใช้กันสำหรับโปรตีน อาจเป็น Strach gel Polyacrylamide Agar และ Agarose ที่ใช้กันมากสำหรับอิเล็คโทรโฟรีซิสเกือบทุกวิธีในปัจจุบัน คือ Polyacrylamide แต่สำหรับ Immunoelectrophoresis จะใช้ Agar และ Agarose

ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะ Polyacrylamide ซึ่งใช้กันมากสำหรับอิเล็คโทรโฟรีซิสของโปรตีน Polyacrylamide เตรียมได้จากการ Polymerization ของ Acrylamide monomer โดยมี N,N'-methylene-bis-acrylamide เป็นตัวเชื่อมให้เป็นโพลีเมอร์ ปฏิกิริยาการเกิดเป็นเจลนี้เร่งโดย Ammonium persulfate และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine) เจลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นตาข่ายสามมิติที่มีรูพรุนความพรุนของเจลขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ Acrylamide monomer และตัวเชื่อม คือ BIS (Bisacrylamide) คือ แสดงเป็น %T และ %C กล่าวคือ %T เป็น %โดยน้ำหนักของ Monomer ทั้งหมด (Acrylamide + Bisacrylamide) และ %C เป็นปริมาณของ Bisacrylamide จาก Monomer ทั้งหมด ขนาดของรูพรุนจะลดลงเมื่อ %T เพิ่มขึ้น โดยทั่วไป %T จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3-30% ขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนที่ต้องการ

หลักการโดยสังเขปของการแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส คือ โปรตีนที่มีประจุจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่นี้จะถูกต้านโดยปฏิกิริยาระหว่างสารกับร่างแหของเจล ซึ่งทำหน้าที่เป็น Monomer sieve ดังนั้น การเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน ดังนั้น ในระบบอิเล็คโทรโฟรีซิสการแยกโปรตีนในสภาพธรรมชาติ (Non-denaturing gel electrophoresis) จะไม่สามารถแยกความแตกต่างทางรูปร่างขนาดหรือประจุของโปรตีนชนิดต่างๆ คือ โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากันในระบบนี้ วิธีอิเล็คโทรโฟรีซิส โปรตีนในสภาพธรรมชาติจึงเหมาะสำหรับใช้แยกหรือจำแนกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน แต่ไม่เหมาะสำหรับใช้ตรวจหรือยืนยันความบริสุทธิ์หรือหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนซึ่งกรณีนี้จะใช้อีกระบบหนึ่งคือ SDS electrophoresis นอกจากนี้ยังสามารถแยกโปรตีนออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของค่า pI โดยใช้เทคนิคของ Isoelectricfocusing ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็น One - dimensional electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 การแยกสารโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซิสแบบ acrylamide-gel (ตัวกลางเจลถูกพอริเมอร์ไรซ์เป็นแผ่นบางๆ ที่เรียกว่าสแลบเจล)

ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์. 2538

อย่างไรก็ดี เพื่อให้การแยกโปรตีนมีประสิทธิภาพสูงขึ้น จึงได้มีการนำเทคนิค 2 ชนิดของอิเล็คโทรโฟรีซิสมาใช้ร่วมกันเกิดเป็น Two - dimensional electrophoresis

การทำอิเล็คโทรโฟรีซิสแบบ One –dimension นั้นทำได้ 2 แบบ คือ แบบเจลในแท่งแก้ว (Disc gel หรือ Tube gel) และแบบเจลแผ่นหรือสแลบเจล (Slab gel) ปัจจุบันมีการใช้สแลบเจลมากขึ้น เพราะสามารถเปรียบเทียบแถบของโปรตีนกับ Marker หรือโปรตีนอื่นๆ ได้สะดวกกว่า

2.12.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล

ตัวกลางค้ำจุนเจลมีหลายชนิด เช่น แป้ง (starch) พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) อะกาโรส (agarose) และอะกาโรส-อะคริลาไมด์ (agarose-acrylamude) เจลพวกนี้ถูกเคลือบเป็นแผ่นพลาสติกหรือแผ่นกระจก การใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นเจลเหล่านี้จะให้ผลการแยกสารดีขึ้นโดยเฉพาะเมื่อใช้แยกโปรตีนและกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทั้งนี้เนื่องจากตาข่ายร่างแหของเจลจะลดการแพร่ และการแยกเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุล (molecular sieving)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.2 อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอิอะคริลาไมด์เจลหรือที่เรียกย่อๆ ว่า PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสม ถือว่าเป็นเทคนิคการแยกแบบ 2 มิติจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการแยกโปรตีนแต่อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล 1 มิติก็ยังคงเป็นที่นิยมใช้และให้ผลที่ดี

ไอออนที่มีประจุหรือหมู่ที่มีประจุเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ได้ โปรตีนก็เช่นเดียวกันเป็นแมโครโมเลกุลที่มีประจุที่ พีเอช ต่างๆ เพราะฉะนั้นจึงสามารถเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้าและอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ (charge density) ของโปรตีน ความหนาแน่นของประจุหมายถึงอัตราส่วนของประจุต่อมวล (charge/mass) ถ้าอัตราส่วนนี้สูงโมเลกุลจะเคลื่อนที่ได้เร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลายโปรตีนผสม โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ทำให้แยกออกจากกันได้

PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสที่มีตัวกลางค้ำจุนเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีในระหว่างเกิดกระบวนการแยก ตัวกลางค้ำจุนพวกกระดาษเซลลูโลสอะซีเตตสามารถลดการพา (convection) ได้การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางค้ำจุน 2 อย่างนี้ จะขึ้นกับความหนาแน่นของประจุของโปรตีนที่ค่า พีเอช หนึ่งๆ ที่เลือกส่วนตัวกลางค้ำจุนพวกเจลสามารถลดการแพร่และป้องกันการเกิดการนำพา ทำให้การแยกได้แถบที่คมชัด รวมทั้งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลได้เมื่อปรับขนาดของรูพรุนให้เหมาะสม เพราะฉะนั้น การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นเจลจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาดของสารที่ต้องการแยก ด้วยเหตุนี้โปรตีน 2 ชนิดที่มีขนาดต่างกัน แต่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากันจึงไม่ถูกแยกออกจากกันเมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบกระดาษ ในขณะที่ถ้าใช้เทคนิค PAGE ขนาดรูพรุนของเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่า ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้

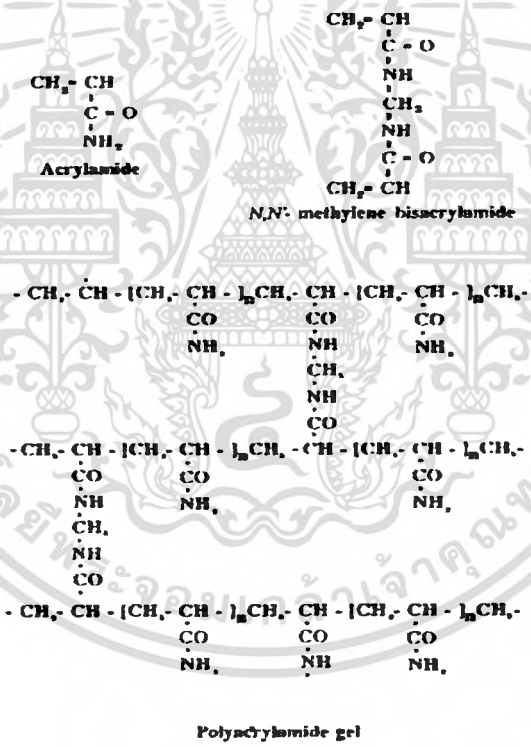
ความสามารถในการเป็นตะแรงร่อนโมเลกุลของเจลนี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเจลว่ามีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของอนุภาคที่เคลื่อนที่หรือไม่ ขนาดรูพรุนของอะกาโรสเจลค่อนข้างใหญ่ทำให้ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลของโปรตีนส่วนใหญ่ลดลง การแยกจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุอย่างเดียว ในขณะที่แป้งเจลและพอลิอะคริลาไมด์เจลมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับขนาดของโมเลกุลโปรตีนทำให้การแยกขึ้นกับขนาดและความหนาแน่นประจุ อย่างไรก็ตามผลการแยกโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีวิสแบบแป้งจะขึ้นกับคุณภาพของแป้งเจลด้วย ทั้งนี้เนื่องจากแป้งเจลเตรียมมาจากผลผลิตทางชีวภาพจึงอาจมีสารปนเปื้อนซึ่งมีผลต่อการแยกสารได้ในขณะที่พอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) ของอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ (acrylamide monomer) ซึ่งเตรียมจากสารที่มีความบริสุทธิ์สูง และยังเป็นสารที่เฉื่อยต่อสารเคมี เสถียร (stable) ที่ช่วง พีเอช อุณหภูมิและไอออนิกสเตรนจ์ กว้าง และยังโปร่งใส

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของพอลิอะคริลาไมด์เจลอีกข้อคือสามารถเตรียมเจลที่มีขนาดรูพรุนได้ขนาดต่างๆกัน ซึ่งต่างจากแป้งเจลที่มีขนาดรูพรุนค่อนข้างจำกัด ด้วยเหตุนี้พอลละอะคริลาไมด์เจลจึงเป็นตัวกลางค้ำจุนที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซน ถึงแม้ว่าแป้งเจลจะนิยมใช้เป็นตัวกลางค้ำจุนในการวิเคราะห์ไอโซเอนไซม์ และอะกาโรสเจลเป็นตัวกลางค้ำจุนในการแยกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะพวกกรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) ก็ตาม

2.12.3 โครงสร้างของพอลิอะคริลาไมด์เจล

พอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization reaction) ของอะคริลาไมด์มอดนเมอร์ ไปเป็นสายโซ่ยาวของพอลิอะคริลาไมด์ โดยมีมอโนเมอร์อีกชนิดหนึ่งซึ่งส่วนใหญ่ใช้ N,N'-เมธีลีนบิสอะคริลาไมด์หรือบิส (N,N'-Metylene-bisacrylamide, Bis) ทำหน้าที่เชื่อมโยงสายโซ่พอลิอะคริลาไมด์ เป็นตาข่ายร่างแห



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของอะคริลาไมด์ บิส และพอลิอะคริลาไมด์
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์. 2538

ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เป็นตัวกำหนดความยาวของสายโซ่พอลิเมอร์ ในขณะที่ความเข้มข้นของบิส เป็นตัวกำหนดขนาดของการเชื่อมโยงเป็นตาข่ายร่างแห ด้วยเหตุนี้ความเข้มข้นของมอโนเมอร์ทั้ง 2 จึงเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของพอลิอะคริลาไมล์เจล เช่น ความหนาแน่น ความยืดหยุ่น ความแข็ง ความเปราะ ขนาดรูพรุนและความโปร่งใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลมีตัวแปรเสริม (parameter) อยู่ 2 ชนิด คือ %T และ %C ค่า %T หมายถึงความเข้มข้นของมอโนเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างเจล (อะคริลาไมด์และบิส) มีหน่วยเป็นกรัมต่อ100 มิลลิลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร)

$$\%T = \frac{a+b}{m} \times 100$$

a = น้ำหนักเป็นกรัมของอะคริลาไมด์

b = น้ำหนักเป็นกรัมของบิส

m = ปริมาตรเป็น มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์

ค่า %C หมายถึง น้ำหนักเป็นกรัมของบิสเมื่อเทียบเป็น เปอร์เซ็นต์ กับน้ำหนักเป็นกรัมของอะคริลาไมด์และบิส

$$\%C = \frac{b}{a+b} \times 100$$

โดยทั่วไปเจลที่เตรียมมีค่า %T ระหว่าง 3-25 การเตรียมเจลจะไม่เกิดขึ้นถ้า %T ต่ำ คือต่ำกว่า 2.5 ถึงแม้ว่าจะเพิ่มค่า %C ถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ก็ตาม ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์และบิสเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของเจล เช่น ถ้า %C มากกว่า 10-เจลเริ่มเปราะหักง่ายและขุ่น และเมื่อ %C น้อยกว่า 1 เจลจะมีลักษณะคล้ายกาวและจับยากมาก เมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของบิสควรจะลดลงเพื่อให้สามารถจับเจลได้ เมื่อ %T มีค่าระหว่าง 5-20 สามารถคำนวณค่า %C จากสูตรดังนี้

$$C = 6.5 - 0.3T$$

อย่างไรก็ตามถ้าใช้ %T ในช่วง 4-15 แล้วมักใช้ %C คงที่ ประมาณ 5 เจลที่มีความยืดหยุ่นและโปร่งใสมีอัตราส่วนของอะคริลาไมด์และบิสประมาณ 30:1 โดยมีความเข้มข้นของบิส 3เปอร์เซ็นต์ (%C=3)

2.12.4 กลไกการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเริ่มต้นด้วยการเติมแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamide) TEMED ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) จากเพอร์ซัลเฟต ดังปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$S_2O_8^{2-} \longrightarrow 2SO_4^{2-}$$

อนุมูลอิสระเพอร์ซัลเฟลนี้จะเปลี่ยนอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ไปเป็นอนุมูลอิสระดังปฏิกิริยา

$$SO_4^{2-} + nCH_2{=}CH \longrightarrow X\text{-}CH_2\text{-}\underset{\displaystyle CONH_2}{\underset{|}{CH}}\text{-}CH_2\text{-}\underset{\displaystyle CONH_2}{\underset{|}{CH}}$$

แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิริริยากับมอโนเมอร์ที่ยังไม่ถูกแอกติเวต (unactivated monomer) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาการสร้างสายโซ่พอลิอะคริลาไมด์ สายโซ่พอลิเมอร์ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นนั้น แต่ละสายโซ่จะถูกเชื่อมโยงซึ่งกันและกันเป็นตาข่ายร่างแหอย่างสุ่ม (random) ด้วยบิส

2.12.5 ระบบของตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst System)

ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของอะคริลาไมด์เริ่มต้นด้วยระบบตัวเร่งปฏิกิริยา-รีดอกซ์ (catalyst-redox system) ดังนี้คือ

1. แอมโมเนียเพอร์ซัลเฟต (0.07เปอร์เซ็นต์) –TEMED (0.03เปอร์เซ็นต์)

2. ไรโบฟลาวิน (riboflavin) หรือไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต(riboflavin-5'-phosphate) (1 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)-TEMED (0.03เปอร์เซ็นต์)

ความเข้มข้นของสารในทั้ง 2 ระบบนี้ ใช้สำหรับปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของพอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มขันของมอโนเมอร์ทั้งหมด 7.5เปอร์เซ็นต์ (%T=7.5)

ในระบบของไรโบฟลาวิน-TEMED ต้องการแสงเป็นตัวเริ่มต้นให้เกิดปฏิกิริยา แสงทำให้เกิดการสลาย (photodecomposition) ของไรโบฟลาวินและเมื่อมี ออกซิเจนจะเกิดอนุมูลอิสระขึ้น บางครั้งใช้ไรโบฟลาวินร่วมกับแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เมื่อมีแสงและ ออกซิเจนไรโบฟลาวินจะถูกสลายไปเป็นลิวโคฟลาวิน (leucoflavin) ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ต่อไปและเกิดอนุมูลอิสระที่แอกตีฟในการเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน เป็นลักษณะของปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันทางแสงและเคมี (photo-chemical polymerisation)

ระบบแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต-TEMED เป็นวิธีที่ใช้ที่สุดในการเตรียมเจลในช่วงความเข้มข้น (%T) 3-40 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจนในอากาศและที่ละลายอยู่ในสารละลายสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้ จึงต้องไล่ ออกซิเจน (degas) ออกจากส่วนผสมเจลก่อนที่จะใช้เตรียมเจล ระบบของไรโบฟลาวิน-TEMED ใช้เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นต่ำในช่วง (%T) 2.5-4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าเป็นปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันทางเคมีจะเกิดลักษณะเจลที่เห็นได้ใน 15-20 นาที และปฏิกิริยาพอเมอไรเซชันทางแสงและเคมีจะเกิดลักษณะเจลที่เห็นได้ใน 30-60 นาที และปฏิกิริยาจะเกิดอย่างสมบูรณ์ใน 8 ชั่วโมง

2.12.6 ผลของขนาดรูพรุน (Pore Effects)

ในตัวกลางค้ำจุนที่เป็นเจล การเคลื่อนที่ของอนุภาคจะถูกขัดขวางโดยโครงสร้างของเจล การขัดขวางการเคลื่อนที่จะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาค และขนาดรูพรุนของตาข่ายร่างแหเจล ฉะนั้น ทั้งขนาดของโมเลกุลและประจุจึงทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการแยกด้วยวิธี PAGE ขนาดรูพรุนของเจลสามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยการเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ และ/หรือสัดส่วนของบิส ถ้าใช้สัดส่วนของบิสคงที่ขนาดรูพรุนจะเปลี่ยนแปลงกลับกับ %T หรือรูพรุนมีขนาดเล็กลงเมื่อความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น เจลที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์น้อยกว่า 2.5เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมสำหรับแยกสารที่มีมวลโมเลกุลสูงว่า 10^6 จะมีลักษณะเหลวต้องเติมอะกาโรสลงไป 0.5เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่สารหรือพอลิเพปไทด์ที่ต้องการแยกมีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 2,000 สามารถใช้เจลที่มีคามเข้มข้นของอะคริลาไมด์สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ได้

เมื่อสัดส่วนของบิสเพิ่มขึ้น ขนาดรูพรุนจะเล็กลง ขนาดรูพรุนจะเล็กที่สุดหรือรูพรุนมีเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำสุดเมื่อ %C = 5 ไม่ว่า %T มีค่าเท่าใดก็ตาม แต่ที่ %T สูงคือประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ค่า %C ที่ทำให้ได้ขนาดรูพรุนเล็กที่สุดจะขึ้นกับค่า %T

โดยทั่วไปตัวกลางค้ำจุนเจลที่เหมาะสมสำหรับการแยกโปรตีนมี %T ประมาณ 5-15 และ%C ประมาณ 2-4

2.12.7 สารเคมีในปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Chemicals in Polymerisation Reaction)

2.12.7.1 อะคริลาไมด์

สารที่ทำให้เกิดเจล ได้แก่มอโนเมอร์พวกอะคริลาไมด์ และ บิส รวมทั้งตัวเริ่มต้น เช่น แอโมเนียมเพอร์ซัลเฟต และ TEMED ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเกิดขึ้นได้ต้องมีแสง ดังนั้นทั้งอะคริลาไมด์และบิสจึงควรเก็บไว้ในขวดสีชาไม่ให้ถูกแสง และเก็บที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเช่นนี้มอโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่เป็นของแข็งจะเสถียร แต่ถ้าเป็นสารละลายจะเสถียรน้อยกว่าและไม่ควรเก็บไว้นานเกินกว่า 1-2 เดือน (ที่ 4 องศาเซลเซียส) ทั้งอะคริลาไมด์และบิสมีความเป็นพิษสูงต่อระบบประสาทกลาง (central nervous system) สามารถถูกดูดซึมเข้าทางผิวหนังหรือเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดเอาผงของสารเหล่านี้เข้าไป เมื่อมอโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันขึ้นเป็นเจล แล้วจะไม่เป็นพิษและสามารถจับต้องได้อย่างปลอดภัย แต่อย่างไรก็ตามควรสวมถุงมือเป็นการป้องกันการสัมผัสมากเกินไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากอะคริลาไมด์เป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดในสารละลายมอโนเมอร์ ฉะนั้นอะคริลาไมด์จึงเป็นแหล่งที่สำคัญของสารปนเปื้อน (contaminant) ที่อาจไปรบกวนปฏิกิริยาได้

อะคริลาไมด์คุณภาพต่ำประกอบด้วยสารปนเปื้อนดังต่อไปนี้คือ

1) กรดอะคริลิก (acrylic acid) เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) ของอะคริลาไมด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างเก็บสารละลายอะคริลาไมด์ มีผลทำให้ พีเอช ลดลงและอาจเป็นสาเหตุให้การเคลื่อนที่ในการะบวนการอิเล็กโทรโฟรีซิสผิดปกติได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกบางชนิดตกตะกอนได้ดังนั้นสารละลายอะคริลาไมด์จึงควรมีปริมาณของกรดอะคริลิกน้อยกว่า 0.001 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ซึ่งหาได้จากการไทเทรต (titrate) โดยตรงและการหาค่าการนำไฟฟ้า รวมทั้งการวัดค่า พีเอช เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาจากการมีกรดอะคริลิกควรเก็บสารละลายอะคริลาไมด์โดยมีตัวแลกเปลี่ยนแอนไอออน (anion-exchangeer) อยู่เล็กน้อย เช่น Dowex 1 หรือ 2 Amberlite IRA-400 เป็นต้น เพื่อไปจับกับกรดอะคริลิกที่เกิดขึ้น

2) พอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้น (linear polyacrylamide) ในระหว่างการผลิตและการเก็บอะคริลาไมด์บริสุทธิ์สิ่งปนเปื้อนที่มีคุณสมบัติของการเป็นตัวเร่งสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันด้วยตนเอง (autopolymerisation) ได้ มีผลทำให้เกิดพอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นในมอโนเมอร์แห้ง พอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นนี้มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเพราะมันทำหน้าที่เป็นนิวเคลียส (nucleus) สำหรับปฏิกิริยาผลที่เกิดขึ้นคือขนาดรูพรุนของเจลไม่สม่ำเสมอและการเคลื่อนที่ของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกผิดปกติไป พอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นไม่ละลายน้ำหรือแอลกอฮอล์ (alcohol) จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการตรวจสอบสารชนิดนี้ และปริมาณของพอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นควรมีน้อยกว่า 0.005เปอร์เซ็นต์(น้ำหนัก/น้ำหนัก)

3) สารปนเปื้อนไอออนิก (ionic contaminant) สารปนเปื้อนไอออนิกทั้งตัวยับยั้งและตัวเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน เช่น โลหะ (metal) พวกคอปเปอร์ (copper) สามารถยับยั้งเจลพอลิเมอไรเซชันได้ นอกจากนี้โลหะบางชนิดยังสารมารถเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่จับโลหะ (metal binding protein) เช่น แคลโมดูลิน (calmodulin) และสามารถยับยั้งการย่อยสลายของกรดนิวคลีอิกที่ถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิกอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) การตรวจพบสารปนเปื้อนไอออนิกทำได้ทางอ้อมโดยตรวจผลของมันต่อปฏิกิริยาพอลิมอไรเซชัน (ทั้ง chemical และ photo-chemical polymerisation) และโดยการวัดการนำไฟฟ้าของสารละลายมอโนเมอร์

2.12.7.2 บิส (bis)

ในสารละลายมอโนเมอร์มีบิสในปริมาณที่น้อยกว่าอะคริลาไมด์ อย่างไรก็ตามถ้าบิสไม่บริสุทธิ์จะมีสิ่งปนเปื้อนเหมือนอะคริลาไมด์ซึ่งรวมทั้งผลผลิตของการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันด้วยตนเองและสิ่งปนเปื้อนไอออนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อต้องเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเองมีข้อควรระมัดระวังดังต่อไปนี้ คือ

1) สวมถุงมือทุกครั้งที่ต้องเตรียมสารละลายอะคริลาไมด์และบิส

2) ถ้าสารละลายอะคริลาไมด์และบิสถูกผิวหนังให้รีบล้างด้วยสบู่และล้างด้วยน้ำปริมาณมากๆ ทันที

3) ควรทำในตู้ควัน หลีกเลี่ยงการกวนสารละลายอย่างรุนแรงและพยายามอย่าทำให้ฝุ่นผงของอะคริลาไมด์และ บิสฟุ้งกระจาย

4) เมื่อต้องการทิ้งสารละลายอะคริลาไมด์และบิส ต้องเปลี่ยนสภาพจากสารละลายให้กลายเป็นเจลก่อน โดยเติมตัวเร่งปฏิริริยาอย่างมากเกินพอเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเป็นเจล แล้วจึงทิ้งเจลไป

5) ที่ผ่านมามีรายงานน้อยมาก ที่กล่าวถึงความเป็นพิษของสารเคมีชนิดอื่นนอกเหนือจากอะคริลาไมด์และบิส ดังนั้นจึงควรระมัดระวังเช่นกัน

2.12.7.3 ตัวเริ่มปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันทางเคมีเกิดขึ้นได้เมื่อเติมแอมโอเนียมเพอร์ลัลเฟตและ TEMED ในขณะที่เกิดปฏิกิริยากับพอลิเมอไรเซชันทางแสงและเคมีเกิดขึ้นได้เมื่อมีไรโบฟลาวิน (หรือไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต) และ TEMED หรือโดยการรวมกันระหว่างไรโบฟลาวิน TEMED และแอโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ตัวเริ่มต้นเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาได้ง่ายโดยเฉพาะแอมเนียมเพอร์ซัลเฟต เช่น เดออกซิเดชัน (oxidation) หรือเกิดการสลายตัว (decomposition) ได้ง่าย สารปนเปื้อนของตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาก็คือ ผลผลิตของการสลายตัวมันนั่นเอง

ตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาได้แก่

1) TEMED เมื่อถูกออกซิไดส์ จะสูญเสียแอกติวีตีไปทีละน้อย กระบวนการนี้ถูกเร่งโดยสารปนเปื้อนที่เป็นตัวออกซิไดส์ (oxidizing agent) สารละลาย TEMED ที่มีผลผลิตจากปฏิกิริยาออกซิเดชันจะมีสีเหลือง TEMED ที่ใช้ต้องเป็นของเหลวใสไม่มีสี ที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาดมีความบริสุทธิ์อย่างน้อย 99เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ TEMED ยังไวต่อแสงเล็กน้อยด้วย จึงควรเก็บในที่มืดหรือเก็บในขวดสีชา TEMED เก็บได้ทั้งที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส ในขวดสีชาจะมีอายุการใช้งานนาน 6 เดือน หลังจาก 10-12 เดือน จะมีแอกติวีตีลดลงจึงต้องเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาของพอลิเมไรเซชัน

2) แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เมื่ออยู่ในสภาพเป็นของแข็งจะเสถียรและเก็บไว้ได้นาน 1 ปี แต่จะเริ่มสลายตัวเกือบทันทีเมื่อละลายน้ำ เพราะฉะนั้นจึงทำให้สูญเสียแอกติวีตีอย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นต้องเตรียมสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตใหม่ทุกครั้งที่เตรียมเจล ปริมาณของแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตที่มากเกินพอสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีน และกรดนิวคลีอิก และกรดนิวคลีอิก เมื่อต้องการทิ้งสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ต้องเจือจางด้วยน้ำปริมาณมากๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ไรโบฟลาวินและไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต ในสภาพเป็นของแข็ง สารทั้ง 2 ชนิด นี้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 ปี ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายเสถียรได้นาน 1 เดือน และต้องเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดสีชาเพื่อไม่ให้ถูกแสง เนื่องจากไรโบฟลาวิน- 5'-ฟอสเฟต ละลายน้ำได้ดีกว่า จึงนิยมใช้มากกว่าไรโบฟลาวิน ข้อดีของไรโบฟลาวินคือ มันแอกตีฟที่ความเข้มข้นต่ำมาก (ประมาณ 5-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ด้วยเหตุนี้ถ้าใช้ไรโบฟลาวินร่วมกับ TEMED และแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ปริมาณของตัวเริ่มต้นทั้ง 3 ที่ต้องการต้องน้อยลง

สารเชื่อมโยงชนิดอื่น (Altrenative Crosslinker)

PDA (pipreazine di-acrylamide) เป็นสารเชื่อมโยงที่ใช้แทนบิสในพอลิอะคริลาไมด์เจล มีข้อดีคือ หลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วย้อมด้วยซิลเวอร์ (silver staining) จะลดพื้นหลัง นอกจากนี้ยังเพิ่มความแข็งให้กับเจลและทำให้แยกสารได้ดี เมื่อใช้ PDA แทนบิสสามารถทำการทดลองได้ทันทีเลยโดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลงใดๆ ทั้งสิ้น

สารเชื่อมโยงนอกเหนือจากบิสและ PDA แล้วเป็นชนิดที่ใช้สำหรับงานที่มีจุดประสงค์เฉพาะได้แก่ DATD (N,N'-diallyltartardiamide) DHEBA (N,N'—(1,2-dihydroyethlene) bisacrylamide) และ BAC (N,N'-bis-acrylylcystamine)

2.12.7.4 สารเติมแต่งในเจล (Gel Additive)

สารเติมแต่งในเจลที่นิยมใช้คือ สารซักฟอกชนิดโซเดียมโดดีซิวัลเฟต (sodium dodecyl sulfate หรือ SDS) สารซักฟอกชนิด Triton®X-100 ยูเรีย (urea) และฟอร์มาไมด์ (formamid) สารซักฟอกสามารถถูกเติมเข้าไปในระบบบัฟเฟอร์ได้โดยไม่มีผลรบกวนปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน อย่างไรก็ตามยูเรียและฟอร์มาไมด์เมื่อถูกเติมเข้าไปจะทำให้เจลที่ถูกเตรียมขึ้นมีขนาดเล็กลงกว่าเจลที่ไม่มีสารเหล่านี้ (ยูเรียนิยมใช้เป็นส่วนประกอบของระบบเจลที่ใช้แยกโปรตีนขนาดเล็กและเพปไทด์)

SDS ต้องสารละลายในสารที่ไม่มีสี ถ้าใช้น้ำที่อุณหภูมิต่ำเกินไป SDS จะละลายน้ำได้ไม่หมด จึงต้องใช้ความร้อนช่วยให้ SDS ละลายอย่างสมบูรณ์ สารละลาย SDS เสถียรที่อุณหภูมิห้องนานหลายสัปดาห์ แต่ถ้าถูกความเย็นจะตกตะกอน

2.12.7.5 สารปนเปื้อนในบัฟเฟอร์

สารปนเปื้อนในสารละลายบัฟเฟอร์ได้แก่ ทริส (Tris) บอเรต (borate) อะซีเตต (acetate) และไกลซีน (glycine) และสารปนเปื้อนในสารเติมแต่งของเจลได้แก่ SDS และยูเรีย รวมทั้งน้ำที่ใช้มีผลต่อปฏิกิริยาการสลายสารปนเปื้อนเหล่านี้มีผลยับยั้งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน และเกิดดารยับยั้งปฏิกิริยานี้บางส่วนทำให้เจลที่เตรียมขึ้นมีขนาดรูพรุนใหญ่กว่าที่ต้องการ มีผลทำให้โมเลกุลเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.8 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาปล่อยความร้อนหรือพลังงานออกมา (exothermic reaction) เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นจะปล่อยความร้อนออกมาซึ่งมีผลทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น อุณหภูมิมีผลต่อคุณสมบัติของเจลด้วย ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เจลขุ่น เป็นรูพรุน ไม่ยืดหยุ่น เจลมีความไม่สม่ำเสมอทำให้การแยกสารได้ผลไม่ดี ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เจลมีความโปร่งใสมากกว่า มีรูพรุนน้อยกว่าและมีความยืดหยุ่นมากกว่า ถ้าอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาสูงเกินไปจะเกิดสายโ.พลิเมอร์สั้นๆและเจลไม่ยืดหยุ่น

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเจลคือที่ 25-30 องศาเซลเซียส สารละลายมอโนเมอร์แผ่นกระจกหรือหลอดแก้วควรมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเมื่อเทเจล เนื่องจากสารละลายมอโนเมอร์และสารละลายบัฟเฟอร์เก็บได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงควรปล่อยให้อุณหภูมิของสารละลายที่เก็บไว้นี้เท่ากับ อุณหภูมิห้องเสียก่อน แล้วค่อยเตรียมเจล

2.12.8.1 ออกซิเจน

การเตรียมเจลโดยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันซึ่งใช้อนุมูลอิสระถูกยับยั้งได้โดยธาตุหรือสารประกอบที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ ออกซิเจนก็เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) ตัวหนึ่งออกซิเจนในอากาศและ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายเจล สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องไล่อากาศออกจากสารละลายเจลก่อนที่จะให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายมอโนเมอร์ที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีความสามารถละลายเก็บออกซิเจนได้ดีกว่าการไล่อากาศออกหรือ ออกซิเจนออกจากสารละลายใช้เวลารวดเร็วกว่าและสมบูรณ์มากกว่าถ้าสารละลายมีอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปไล่อากาศออก นอกจากนี้ถ้านำสารละลายเจลที่เย็นมาไล่อากาศออกภายใต้สุญญากาศจะทำให้สารละลายยังคงเย็นอยู่ และการไล่อากาศออกเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำสารละลายที่เย็นมาเตรียมเจล จะทำให้มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาและคุณภาพของเจลที่เตรียมขึ้นด้วย ด้วยเหตุดังกล่าวการเตรียมที่มีคุณภาพดีทำให้การแยกสารได้ผลดี จึงจำเป็นต้องทำให้สารละลายเจลมีอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงนำมาไล่อากาศออก การไล่อากาศควรใช้เวลาอย่างน้อย 15 นาที ที่ 23-25 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ 125 torr ถ้าเขย่าหรือกวนสารละลายด้วยจะใช้เวลาน้อยลง ประมาณ 8-10 นาที

2.12.8.2 พีเอช

การใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสมีระบบบัฟเฟอร์ที่ พีเอช เป็นกลางหรือ พีเอชเป็นด่างซึ่งเหมาะสมสำหรับตัวเริ่มต้นที่ใช้คือ TEMED แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต และไรโฟลาวิน ที่ พีเอช เป็นกลางหรือ พีเอช เป็นด่าง การทำงานของตังเริ่มต้นเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพ แต่ที่ พีเอช เป็นกรด TEMED จะกลายเป็นรูปกรด (protonated form)ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันช้าลง เนื่องจาก TEMED รูปเบสอิสระ (free base form) เป็นรูปที่ทำให้เกิดการเริ่มต้นของปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.9 การเลือกระบบของเจลและบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

การวิเคราะห์สารผสมของโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกโดยใช้เทคนิค PAGE อาศัยความแตกต่างของโมเลกุลทั้งขนาดและประจุสุทธิ ผลที่ได้จากการทำ PAGE จะปรากฏเป็นแถบที่แยกออกจากกัน มีปัจจัยปลายชนิดที่มีบทบาทสำคัญต่อการแยกสารผสมนี้ เช่น พีเอช ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์และบิส ค่าไอออนิกสเตรนจ์ ของระบบบัฟเฟอร์เกรเดียนต์ของความต่างศักย์ไฟฟ้า และเวลาที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส จึงควรเลือกสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการแยกเพื่อให้ผลของการแยกดีที่สุด

คุณสมบัติของสารตัวอย่างจะเป็นตัวบ่งบอกถึงสภาวะที่ใช้เพื่อให้การแยกได้ผลดีเช่น ถ้าต้องการวิเคราะห์สารผสมชองโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกของไวรัสที่มีมวลโมเลกุลสูงจะต้องเลือกเจลที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ โดยใช้ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์และบิสต่ำ คือ T น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหลีกเลี่ยงผลของตะแกรงร่อนโมเลกุล และถ้าใช้ T = 15-20เปอร์เซ็นต์ หรือมากว่านี้จะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพอลิเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น ฮีสโทน (histone) เนื่องจากความแตกต่างของประจุ เจลที่มีขนาดรูพรุนใหญ่จะใช้ได้แม้แต่สำหรับโมเลกุลเล็กๆ

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลมีข้อสังเกตดังนี้คือ

1) เมื่อต้องการแยกสารผสมของโปรตีน ต้องไม่เลือกความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลการแยกสารชนิดใดชนิดหนึ่งออกจากสารที่เหลือทั้งหมด แต่จะต้องเลือกความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลการแยกของสารทุกชนิดดี

2) ถ้าได้แถบการแยกแถบเดี่ยวจะไม่สามารถสรุปได้เลยว่าประกอบด้วยส่วนประกอบชนิดเดียว ต้องทำการทดลองซ้ำอีก 2 หรือ 3 การทดลอง เพื่อพิสูจน์ โดยใช้เจลที่มีขนาดรูพรุนแตกต่างกัน เพื่อให้ผลของตะแกรงร่อนโมเลกุลต่างกัน หรือใช้ระบบของเจลที่มี พีเอช แตกต่างกันซึ่งมีผลเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิของโมเลกุล

ถ้าส่วนประกอบบางชนิดของสารผสมไม่เสถียรหรือตกตะกอนที่ค่า พีเอช หนึ่งๆ ต้องหลีกเลี่ยงการเกิดปัญหานี้ในระหว่างการแยก ในสารละลายอิสระ (free solution) การเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อ พีเอช ของบัฟเฟอร์มีค่าต่างจากค่า pI ของโปรตีนมากขึ้น เพราะฉะนั้นจึงควรเลือกค่า พีเอช ที่ทำให้ส่วนประกอบของสารผสมมีความแตกต่างกันมากที่สุด ในการวิเคราะห์สารผสมโดย PAGE บางครั้งต้องเริ่มด้วยค่า พีเอช ที่ทำให้สารประกอบทุกชนิดในสารผสมเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกัน และจึงควรปรับค่า พีเอช ที่ทำให้การแยกได้ผลดีที่สุด โดยทั่วไปสามารถทำ PAGE ได้ที่ พีเอช ช่วง 3.0-10.0 แต่ถ้าที่ พีเอช ต่ำกว่า 3 หรือสูงกว่า 10 จะทำให้เกิดปฏิกิริยาดีอะมิเดชั่น (de-amidation) ของโปรตีน หรือเกิดปฏิกิริยาการสลายได้

โดยทั่วไปพวกโปรตีนด่าง (basic protein) เช่น ฮีสโทน ให้ผลการแยกดีที่สุดที่ พีเอช เป็นกรด เนื่องจากการเคลื่อนที่จะค่าสูงสุด ในขณะที่โปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ในช่วง พีเอช 4-7.5 จึงเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนกรดอ่อนๆ (weakly acidic protein) ที่ถูกแยกได้ดีที่สุดในเจลที่มี พีเอช เป็นด่าง โปรตีน 2 ชนิดที่มีขนาดเท่ากัน แต่มีค่า pI ต่างกันสามารถแยกออกจากกันได้ที่ค่า พีเอช ส่วนใหญ่

ค่าไอออนิกสเตรนจ์ ของระบบบัฟเฟอร์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ต้องเลือกค่าไอออนิกสเตรนจ์ ที่ทำให้บัฟเฟอร์มี "buffering capacity" ที่พอเพียง ถ้ายิ่งบัฟเฟอร์มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีความต้านทานไฟฟ้าต่ำลง ทำให้ได้กระแสไฟฟ้าที่สูงกว่าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ใช้และทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้น ถ้ามีวิธีกำจัดความร้อนที่เกิดขึ้นนี้ไปอย่างมีประสิทธิภาพ บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะให้ผลการแยกดี ได้แถบคมชัด ทั้งนี้เพราะสัมประสิทธิ์ของการแพร่ (diffusion coefficient) มีค่าต่ำกว่าที่ค่าไอออนิกสเตรนจ์ สูง อย่างไรก็ตามการใช้ ค่าไอออนิกสเตรนจ์ ที่สูงเกินไปจำเป็นต้องใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำเพื่อหลีกเลี่ยงความร้อนที่เกิดขึ้นมากเกินไป การทำเช่นนี้ต้องใช้เวลาในการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสที่นานซึ่งมีผลต่อการเกิดสารสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเพิ่มขึ้น และแถบที่ได้จะไม่คมชัดเนื่องจากเกิดการแพร่ขึ้น

ในระบบส่วนใหญ่บัฟเฟอร์มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05-0.1 โมลาร์ แต่ถ้าความเข้มข้นต่ำถึง 0.025 โมลาร์ หรือสูงถึง 1.0 โมลาร์ ก็สามารถใช้ได้ ถ้าความเข้มข้นสูงเกินกว่า 0.5 โมลาร์ นิยมใช้กับระบบบัฟเฟอร์ที่เป็นกรด ทั้งนี้เนื่องจากที่ พีเอช ต่ำกรดอ่อนหลายชนิดที่นิยมใช้จะแตกตัวได้น้อยและค่าไอออนิกสเตรนจ์ต้องสูงพอที่จะให้ "buffering capacity" ที่เพียงพอเนื่องจากบัฟเฟอร์เหล่านี้มีกรดอ่อนที่แตกตัวได้น้อย จึงทำให้ได้กระแสไฟฟ้าที่ไม่สูงเกินไป หรือไม่เกิดความร้อนมากเกินไป

2.12.10 คอลัมน์เจลหรือเจลรูปแท่งและ สแลบเจล (Column Gel or Rod Gel and Slab Gel)

การทำ PAGE มีวิธีการทำเจลได้ 3 แบบ คือ

1. สแลบเจลในแนวนอน (horizontal slap gel)
2. สแลบเจลในแนวตั้งตรง (vertical slab gel)
3. เจลรูปแท่งในแนวตั้งตรง (vertical rod gel)

ในช่วงเริ่มต้นของการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซนมักนิยมใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลมีลักษณะเป็นแท่งในหลอดแก้ว หรือเจลรูปแท่ง แต่ปัจจุบันนิยมใช้เจลเป็นแผ่นหรือ Slab gel ซึ่งมีความหนาประมาณ 0.75-1.5 มิลลิเมตร หรือเป็นเจลแผ่นบางมากซึ่งมีความหนาประมาณ 0.1-0.5 มิลลิเมตร ทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างและสารโปรตีนมีมาตรฐานจำนวนมากสามารถทำ PAGE ได้ในเจลแผ่นเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่เหมือนกันซึ่งทำให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบ แต่เมื่อใช้เจลรูปแท่งสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะถูกวิเคราะห์บนแท่งเจลที่แยกกัน ทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบที่จะให้ผลถูกต้องแน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการยากที่จะรักษาสภาวะในเจลทุกแท่งให้เหมือนกันตลอดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สแลบเจลมีข้อดีดังนี้คือ

1) ลดการผิดส่วนบิดเบี้ยวของแถบโปรตีนเนื่องจากผลของความร้อน ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ถ้าเป็นสแลบเจลความร้อนที่เกิดขึ้นจะถูกกระจายไปได้ง่ายกว่า เจลรูปแท่งที่มีความหนากว่า

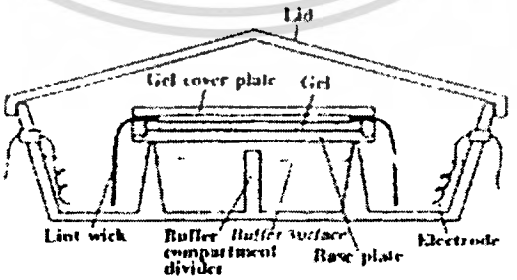
2) มีพื้นที่หน้าตัดที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าจึงทำให้ง่ายต่อการวัดความทึบแสงและการถ่ายรูป นอกจากนี้ ยังง่ายต่อการเก็บแห้ง หรือการทำภาพรังสีในตัว (autoradiography)

3) การเตรียมเจลใช้เวลาน้อยกว่า สำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้สารตัวอย่างจำนวนมากภายใต้สภาวะเดียวกัน แผ่นสแลบเจล 1 แผ่นสามารถแยกสารตัวอย่างได้ถึง 25 สาร

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเจลรูปแท่งจะมีข้อเสียเปรียบกว่าสแลบเจลแต่ก็ยังคงทำอยู่ เช่น ในงานที่ต้องการตัดเจลหลังจากเจลเพื่อนำไปหาแอกติวีตีทางชีวภาพ (biological activity)

2.12.10.1 สแลบเจลในแนวนอน

การทำ PAGE แบบสแลบเจลในแนวนอนนี้สามารถใช้เครื่องมือที่ง่ายๆ ราคาไม่แพงและสามารถใช้ร่วมกับระบบอื่นๆ ได้ เช่น อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแป้งเจล แบบกระดาษ แบบเซลลูอะซีเตต และไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelctric focusing หรือ IEF) การหยดสารตัวอย่างลงบนแผ่นเจลนิยมเจาะช่อง (slot) ในเจลแล้วจึงหยดหรือปิเปตหยอดสารตัวอย่างที่มีปริมาตรแน่นอนและพอดีกับช่องลงไปในช่องนั้น หรือโดยการวางกระดาษกรองแผ่นเล็กที่ชุ่มด้วยสารตัวอย่างที่มีปริมาตรแน่นอน เช่นเดียวกับที่ทำในอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแป้งเจล วิธีทำเช่นนี้มีข้อดีตรงที่สามารถวางสารตัวอย่างตรงบริเวณใดก็ได้บนแผ่นเจล ถ้าวางตรงกลางของแผ่นเจลก็สามารถทราบถึงการเคลื่อนที่ของสารในสารตัวอย่างว่าเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกหรือเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบในเจลแผ่นเดียวกัน

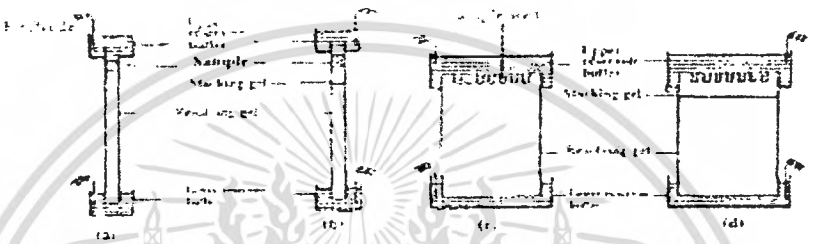


รูปที่ 2.4 เครื่องมือการทำ PAGE แบบสแลบเจลในแนวนอน
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์. 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.12.10.2 สแลบเจลและเจลรูปแท่งในแนวตั้งตรง

การทำ PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งแบบสแลบเจลและเจลรูปแท่ง สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วอิเล็กโทรดขั้วเดียวเท่านั้น เพราะฉะนั้นจึงต้องเลือก พีเอช ที่ทำให้สารทุกชนิดเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันทั้งสแลบเจลและเจลรูปแท่ง ในแนวตั้งตรงสามารถใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน (continuous buffer system) และที่ต่างกัน (discontinuous หรือ multiphasic buffer system) ได้



รูปที่ 2.5 การทำ PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งแบบสแลบเจลและเจลรูปแท่งในระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน (a) และ (c) และระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน (b) และ (d)
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์. 2538

2.12.11 คุณสมบัติของพอลิอะคริลาไมด์เจล

การทำ PAGE เพื่อแยกโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนยังคงมีโครงสร้างและรูปร่างในสภาพทางธรรมชาติ (native structure and shape) การแยกจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาด เมื่อต้องการแยก "native protein" โดยใช้เทคนิค PAGE ควรทำ "pre-electrophoresis" ก่อนที่จะหยดสารตัวอย่างลงบนเจล ใช้เวลาทำประมาณ 30-40 นาที เพื่อกำจัดสารเคมีที่ยังหลงเหลืออยู่ เช่น แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต หรือกรดอะคริลิก ซึ่งอาจไปลดแอกติวีตีทางชีวภาพของโปรตีนที่สนใจได้

2.12.12 การเลือกระบบของบัฟเฟอร์

การทำ PAGE สามารถเลือกระบบของบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันได้เกือบทั้งหมดที่มีพีเอช ระหว่าง 3-10 แต่สารละลายบัฟเฟอร์ต้องมี μ ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการนำไฟฟ้าที่ต่ำจะช่วยลดความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำ PAGE โดยทั่วไปความเข้มข้นถูกจำกัดอยู่ในช่วง 0.01 mole/l และ0.1 mole/l ตัวอย่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ศึกษาโปรตีน ได้แก่ ทริส-ไกลซีน (พีเอช 7.0-8.5) ความเข้มข้นของทริสอยู่ในช่วงระหว่าง 0.02-0.05 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบบของบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันหมายถึง ไอออนของบัฟเฟอร์เหมือนกันทั้งในสารตัวอย่าง ในเจล และในอ่างอิเล็กโทรด (electrode reservoir) และมี พีเอช คงที่เท่ากัน ส่วนระบบของบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน หมายถึง ไอออนของบัฟเฟอร์ต่างกันในส่วนของเจลและในอ่างอิเล็กโทรด และมี พีเอช ไม่เท่ากัน

2.12.13 การเลือกพีเอช

สิ่งที่ต้องพิจารณาอันดับแรกคือช่วง พีเอช ที่ทำให้โปรตีนเสถียร และทำให้การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสดำเนินไปได้เร็วและมีประสิทธิภาพในการแยก ถ้า พีเอช ของบัฟเฟอร์ห่างจากค่า pI ของโปรตีนที่ต้องการแยกมาก โปรตีนจะมีประจุสูงขึ้น ดังนั้นเวลาที่ใช้ทำจะสั้นลง และเนื่องจากการแพร่ลดลงจึงทำให้แถบคมชัดมากขึ้น ประมาณครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่ศึกษากันมีค่า pI อยู่ในช่วงพีเอช 4.0-6.5 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้จึงอยู่ในช่วง พีเอช 8.0-9.5

2.12.14 การเตรียมสารตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่างต้องให้โปรตีนละลายอย่างสมบูรณ์ และต้องหลีกเลี่ยงการใช้บัฟเฟอร์ที่มี ค่าไอออนิกสเตรนจ์ สูงปริมาณของสารตัวอย่างที่หยอดลงบนเจลขึ้นกับจุดประสงค์ของการทำ PAGE และวิธีการย้อมที่ใช้ ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างต้องใช้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนสูงประมาณ 0.1-20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตรของสารตัวอย่างต้องน้อยด้วย เนื่องจากเป็นระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันจึงไม่มีการรวมสารตัวอย่างเป็นแถบแคบๆ เหมือนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน โดยทั่วไปใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 5-25 ไมโครลิตรสำหรับเจลรูปแท่งเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ถ้าใช้ปริมาตรสูงประมาณ 20-25ไมโครลิตร ความหนาของสารตัวอย่างจะมีผลต่อความคมชัดของแถบและการแยก ถ้าการทำ PAGE เป็นแบบแนวตั้ง (ทั้งสแลบเจลและเจลรูปแท่ง) การหยดสารตัวอย่างต้องใช้ไมโครปิเปต (micropipette) หรือ “microsyringe” หยอดสารตัวอย่างผ่านบัฟเฟอร์ในอ่างอิเล็กโทรดบนลงในช่องหรือหลุม (sample well) ที่เจาะไว้ตรงส่วนบนของแผ่นสแลบเจล หรือลงบนผิวหน้าของเจลรูปแท่ง การหยอดสารตัวอย่างในลักษณะนี้ต้องเติมซูโครส (sucrose) 2-10เปอร์เซ็นต์ หรือกลีเซอรอล (gylceral) 5-10เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเล็กน้อยลงในสารตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความหนาแน่นให้สูงกว่าบัฟเฟอร์ ทำให้สารตัวอย่างไม่ฟุ้งกระจายแพร่ปะปนกับบัฟเฟอร์ในอ่างบนนอกจากนี้ยังต้องเติมสีย้อมเป็น “tracking dry” ปริมาณน้อยประมาณ 0.002เปอร์เซ็นต์ ลงในสารตัวอย่างด้วย สีย้อมที่เหมาะสมสำหรับบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างคือโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ส่วนสีย้อมชนิดเมธิลลีนกรีน (methylene green) และเมธิลลีนบลู (methylene blue) หรือไพโรนีน Y (pyronine Y) เหมาะสำหรับบัฟเฟอร์ที่เป็นกรด “tracking dry” เป็นตัวแสดงถึงการสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากมันเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่สูงกว่าส่วนประกอบที่เป็นแมโครโมเลกุลในสารตัวอย่าง ดังนั้นเมื่อสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ถึงบริเวณห่างจากปลายล่างของเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร ให้

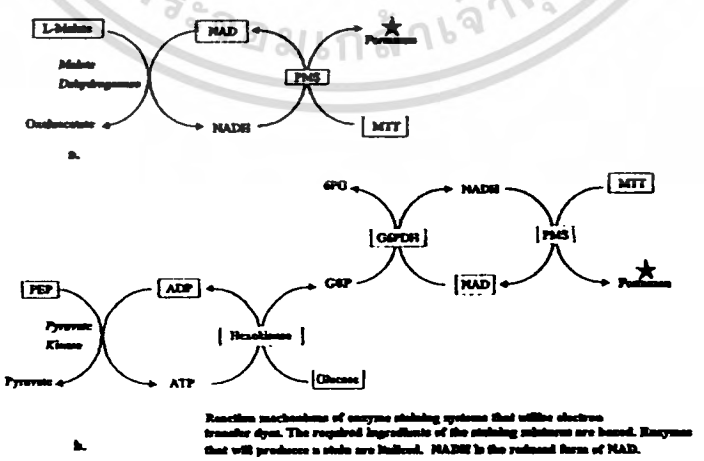
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยุดการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสได้ ตำแหน่งของสีย้อมหรือ "tracking dry" ใช้เป็นจุดอ้างอิง (reference point) ในการเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ ในสารตัวอย่าง เมื่อหยอดสารตัวอย่างแล้วให้เริ่มต้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทันทีเพื่อหลีกเลี่ยงการแพร่ของสารตัวอย่าง

2.12.15 การย้อมด้วยเอนไซม์ (Enzyme Stain)

การย้อมด้วยเอนไซม์เป็นการตรวจวัดโปรตีนที่จำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง หลังจากที่ทำการแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส ฉะนั้นต้องระวังไม่ให้สูญเสียแอกติวิตีระหว่างการทำอิเล็คโทรโฟรีซีส เช่น ใช้บัฟเฟอร์ที่เสถียรต่อเอนไซม์ หรือใช้อุณหภูมิต่ำ

การย้อมด้วยเอนไซม์ในปัจจุบันเกี่ยวข้องกับสีย้อมที่สามารถถ่ายทอดอิเล็คตรอน เช่นไนโตรบูลเททระโซเลียม (Nitroblue Tetrazolium หรือ NBT และเมธิลไธอะโซลอิล เททระโซเลียม (Methyl Thiazolyl Tetrazolium หรือ MTT) สีย้อมพวกนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้าย เมื่อถูกรีดิวซ์โดยตัวให้อิเล็คตรอนแล้ว จะเกิดเป็นฟอร์มาแซน (Formazan) ที่ไม่ละลายและมีสีน้ำเงินเข้ม ปฏิกิริยานี้มีสารฟีนาซีนเมโธซัลเฟต (Phenazine Methosulfate หรือ PMS) ทำหน้าที่เป็นพาหะของไฮโดรด์-ไอออนระหว่างโคเอนไซม์รูปรีดิวซ์หรือหมู่พรอสเธติกของเอนไซม์ และเกลือเททระโซเลียม เมื่อมีแอกติวิตีของเอนไซม์จะทำให้เกิดรูปรีดิวซ์ของโคเอนไซม์ NAD^+ หรือ $NADP^+$ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide หรือ Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) ตัวอย่างเช่น การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่ม Dehydrogenase ทำโดยการแช่เจลในสารละลายของเกลือเททระโซเลียม เนื่องจากเกลือเททระโซเลียมมีความไวต่อแสงจึงต้องทำในที่มืด วิธีนี้สามารถนำไปใช้ในการย้อมเอนไซม์อื่นๆ ได้ ซึ่งสามารถเกิดควบคู่กับปฏิกิริยา 2 ปฏิกิริยา หรือมากกว่าที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชันของ NAD^+ และ $NADP^+$ ไปเป็น $NADH+H^+$ หรือ $NADPH+H^+$



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้การย้อมด้วยเอนไซม์

ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

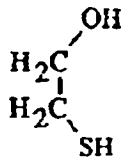
2.13 อิเล็คโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล (พิณทิพย์ รื่นวงษา. 2538)

ในปัจจุบันการทำ PAGE มักนิยมใช้สารซักฟอกที่มีชื่อว่าโซเดียมโดดิซิลซัลเฟตหรือ SDS ในระบบบัฟเฟอร์ร่วมกับสารที่สลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) การทำ PAGE ที่มี SDS เรียกว่า SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุลของมัน SDS เป็นสารซักฟอกแอนไอออนิก (anionic detergent) ที่มีประจุลบสามารถจับกับสายโซ่พอลิเพปไทด์ด้วยอัตราส่วนที่คงที่ คือ SDS 1.4 กรัม/สายโซ่พอลิเพปไทด์ 1 กรัม SDS พอลิเพปไทด์คอมเพลกซ์ (SDS-polypeptide complex) นี้มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) เนื่องจากสายโซ่พอลิเพปไทด์เมื่อถูกจับด้วย SDS จะคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาว มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 18 อังสตรอม ซึ่งคงที่ในขณะที่ความยาวของคอมเพลกซ์จะเป็นสัดส่วนกับมวลโมเลกุลของสายพอลิเพปไทด์ คอมเพลกซ์นี้มีประจุลบ (เนื่องจากประจุของ SDS ไปบดบังประจุของโปรตีน) มีอัตราส่วนของประจุต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุคงที่เท่ากัน และมีรูปร่างเหมือนกัน จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสายโซ่พอลิเพปไทด์ขึ้นกับมวลโมเลกุลของสายพอลิเพปไทด์และทุกคอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือเข้าหาขั้วบวก เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ทราบโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของสายพอลิเพปไทด์ และจากวิธีการย้อมสีทำให้ทราบถึงจำนวนหน่วยย่อยหรือจำนวนสายโซ่พอลิเพปไทด์ใน "native protein"

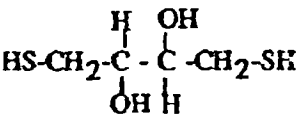
SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว ควรใช้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการจะศึกษาน้อยเป็นไมโครกรัม มีประโยชน์ในการศึกษาพวกเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วย โปรตีนที่ถูกแยกโดย SDS-PAGE สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆต่อไปได้ โดยการชะแต่ละแถบที่แยกออกจากกันจากเจลแล้วกำจัด SDS หรือสารเคมีอื่นๆ จากนั้นจึงนำไปศึกษา เช่น วิเคราะห์กรดอะมิโน แผนที่เพปไทด์ (peptide map) หาปลาย N- หรือหาปลาย C- เป็นต้น

สารผสมโปรตีนที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลต้องถูกทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติโดยให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายหรือเจือจางสารผสมโปรตีนต้องมี SDS ปริมาณมากเกินพอ และมีสาร ไธออล (thiol reagent) ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reducer) สลายพันธะไดซัลไฟด์ สารไธออลที่นิยมใช้คือ 2- เมอร์แคปโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) และไดไธโอไธรทอล (dithiothreiotol หรือ DTT) DTT มีข้อดีคือไม่มีกลิ่นและเป็นสารรีดิวซิ่ง (reducing agent) ที่ให้ผลเท่ากันกับ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2-เมอร์แคปโตเอธานอล



ไดไธโอไธรทอล

รูปที่ 2.7 แสดงสารไธออล
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

เนื่องจากยูเรียมีความสามารถในการสลายพันธะอ่อน เช่น พันธะไฮโดรเจน ที่เกิดขึ้นในโมเลกุลของโปรตีนจึงใช้ยูเรียเป็นสารทำให้แตกตัว (dissociating agent) เช่นเดียวกับ SDS แต่ต้องใช้ยูเรียความเข้มข้นสูงประมาณ 8 โมลาร์ ในการทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ และต้องมีสารสลายพันธะไดซัลไฟด์ด้วย ข้อดีของยูเรียคือจะไม่มีผลต่อประจุของโปรตีน เพราะฉะนั้นการแยกสายโซ่พอลิเพปไทด์จึงขึ้นอยู่กับขนาดและประจุซึ่งต่างจาก SDS อย่างไรก็ตามการแยกสายโซ่พอลิเพปไทด์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดและประจุทำให้การหามวลโมเลกุลได้ผลไม่ถูกต้องทีเดียว ด้วยเหตุนี้จึงนิยมใช้ SDS มากกว่ายูเรียเมื่อต้องการหามวลโมเลกุลของโปรตีน

2.13.1 คุณสมบัติของเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

2.13.1.1 การเลือกความเข้มข้นของเจล

การแยกโปรตีนหรือพอลิเพปไทด์จะได้ผลดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะคริลาไมล์และบิส ถ้าใช้ความเข้มข้นของเจลที่ผิดจะทำให้โปรตีนไม่สามารถผ่านเจลได้ หรือทำให้โปรตีนผ่านเจลไปได้อย่างรวดเร็วพร้อมๆกับ "tracking dye" เพราะฉะนั้นจึงต้องเลือกความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนที่ศึกษา ถ้าทราบช่วงมวลโมเลกุลของพอลิเพปไทด์ผสมก็สามารถเลือกความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมได้จากกราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่างมวลโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น %T = 5 เหมาะสำหรับช่วงมวลโมเลกุล 25000-200000 %T =3.3 สามารถแยกสารที่มีมวลโมเลกุลสูงถึง 1000000 และที่ %T = 15 สามารถแยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 50000

2.13.1.2 การเลือกระบบบัฟเฟอร์

ระบบบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนระบบทริส-โซเดียมอะซีเตต ได้ถูกดัดแปรโดยการลดความเข้มข้นของ SDS ในบัฟเฟอร์เป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ผลการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกดีขึ้น ระบบอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ (imidazole buffer system) มีการนำไฟฟ้าที่ต่ำกว่าระบบฟอสเฟตมาก จึงใช้เมื่อต้องการแยกสารโดยเร็วหรือเมื่อไม่สามารถใช้ฟอสเฟสได้

2.13.1.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE อาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ เช่นการสลายพันธะไดซัลไฟด์ เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์หรือมีการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic degradation) ในสารตัวอย่างโดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อผสม SDS และ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล ในสารตัวอย่างแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องดังนั้นการเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE จึงจำเป็นต้องต้มสารตัวอย่างในน้ำเดือดนานอย่างน้อย 3 นาที หลังจากเติม SDS และ 2-เมอร์แคปโตเอธานอลลงในสารตัวอย่างเพื่อทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ้ายังไม่ให้สารตัวอย่างทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บที่เย็น SDS จะตกผลึกจากสารละลาย ดังนั้นจึงต้องทำให้สารละลายอุ่นก่อนที่จะนำไปใช้ การต้มสารตัวอย่างจะทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ ทำให้โปรตีเอสไม่สามารถสลายโปรตีนที่สนใจในสารตัวอย่างได้

การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีเกลือความเข้มข้นสูงพบว่า การหามวลโมเลกุลของโปรตีนในช่วงมวลโมเลกุล 20000 – 66000 จะไม่ถูกรบกวนเมื่อมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในสารตัวอย่างสูงถึง 0.8 โมลาร์ อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมฟอสเฟต พีเอช 7.0 จาก 0.01 โมลาร์ ไปเป็น 0.1 โมลาร์ ในสารตัวอย่างจะมีผลต่อการหามวลโมเลกุล ดังนั้นมวลโมเลกุลของโปรตีนในช่วง 20000-97000 หาได้เมื่อมีเกลือความเข้มข้นสูงในสารตัวอย่างถ้าทั้งสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานมีปริมาณของเกลือและไอออนของบัฟเฟอร์เท่ากัน

ถ้าทำ SDS-PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งเจลรูปแท่งและสแลบเจลต้องใส่ซูโครสเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของสารตัวอย่าง และใช้โบรโมฟีนอลบลูเป็น “tracking dye”

2.13.2 การทำกราฟมาตรฐาน

เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ PAGE SDS-PAGE เสร็จเรียบร้อยแล้ว ต้องวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ “tracking dye” จากบริเวณเริ่มต้น (origin) ก่อนการย้อมสีด้วยวิธีต่างๆ หลังจากย้อมสีแล้วจึงวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานโดยใช้จุดกึ่งกลางของแต่ละแถบที่ปรากฏให้เห็น การวัดอาจใช้ไม้บรรทัดวัดบนเจลที่ย้อมสีแล้ว หรือรูปถ่ายของเจลหรือใช้เครื่องวัดการทึบแสง นำระยะทางการเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration) หรือค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เป็นค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของ “tracking dye”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ค่า } R_f = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ "tracking dye" จากจุดเริ่มต้น}}$$

นำค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานและค่า $\log_{10}$ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐาน จากกราฟนี้สามารถหาตำแหน่งที่ตรงกับค่า R_f ของโปรตีนที่ไม่ทราบค่ามวลโมเลกุล ทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนที่สนใจบนแผ่นเจลเดียวกัน เพื่อให้สภาวะเหมือนกันทุกอย่าง

กราฟมาตรฐานนี้จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงมวลโมเลกุลที่จำกัดที่ความเข้มข้นของเจลค่าหนึ่ง เช่น เมื่อใช้ระบบ SDS- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กราฟมาตรฐานจะเป็นเส้นตรงในช่วงดังนี้คือ

ที่ %T = 15 กราฟเป็นเส้นตรงในช่วง 12,000-45,000

ที่ %T = 10 กราฟเป็นเส้นตรงในช่วง 15,000-70,000

ที่ %T = 5 กราฟเป็นเส้นตรงในช่วง 25,000-200,000

2.13.3 คุณสมบัติที่ผิดปกติของพอลิเพปไทด์

ความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลและระยะทางการเคลื่อนที่สำหรับ SDS-PAGE จะเกิดขึ้นเมื่อทุกพอลิเพปไทด์จับกับ SDS ด้วยอัตราส่วนของมวลที่คงที่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติม SDS ปริมาณมากเกินพอคือย่างน้อยต้องมีในอัตราส่วน 3:1 นอกจากนี้ยังต้องมีสารไธออลในปริมาณมากเกินพอด้วย เพื่อให้แน่ใจว่าพันธะไดซัลไฟด์ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ ไม่เช่นนั้นจะทำให้พอลิเพปไทด์จับกับ SDS อย่างไม่อิ่มตัว และไม่เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ

ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) จำนวนมากมีคุณสมบัติที่ผิดปกติถึงแม้ว่าจะเติม SDS และสารไธออลในปริมาณที่มากเกินพอ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะมันจับตัวกับ SDS เฉพาะตรงส่วนที่เป็นโปรตีนเท่านั้น ทำให้มีผลต่อประจุสุทธิของโปรตีน ดังนั้นเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วนำผลมาคำนวณหามวลโมเลกุลจะได้ค่าที่สูงเกินความเป็นจริง

ในกรณีกราฟมาตรฐานของการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเกรเดียนต์เจล ถ้าเป็นเกรเดียนต์ของความเข้มข้นแบบ "linear" สามารถเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลและ $\log_{\%T}$ ได้ เพื่อนำมาใช้ในการหาค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนที่สนใจ เนื่องจากค่า %T เป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน จึงสามารถเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุล และค่า R_f เพื่อใช้คำนวณหาค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนในสารตัวอย่าง เช่นเดียวกับกราฟมาตรฐานของอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้ความเข้มข้นของเจลคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.14 การย้อมเจล (อาภัสสรา ชมิดท์. 2538)

2.14.1 วิธีการย้อมสีเจล (Gel Staining Method)

เมื่อ "tracking dye" เคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่ต้องการบนเจลแล้วให้สิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ดับเครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้า (power supply) นำเจลออกจากเครื่องเพื่อนำมาหาตำแหน่งของสารที่แยกออกจากกัน ถ้าเป็นสแลบเจลต้องนำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกแล้วจึงทำการย้อม ถ้าเป็นเจลแท่งต้องนำเจลออกจากหลอดแก้วเสียก่อนที่จะนำไปย้อม เมื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ "tracking dye" บนเจลเรียบร้อยแล้ว จึงดำเนินการย้อมเจลโดยใช้สีย้อมที่ต้องการตามเวลาที่กำหนด แล้วจึงนำเจลมาล้างสีย้อมจนกระทั่งเห็นแถบของสารที่แยกออกจากกันอย่างชัดเจน

2.14.2 การตรึง (Fixing)

การตรึงสามารถเป็นขั้นตอนก่อนการย้อมหรือทำการตรึงพร้อมกับการย้อมสีก็ได้ โดยใช้สารละลายตรึง (fixing solution) เช่น กรดไตรคลอโรอะซีติก (trich loroacetic acid หรือ TAC) ผสมในสารละลายสีย้อมเลย

การตรึงมีหน้าที่ดังนี้คือ

1) ตรึงสารที่ถึงแยกออกจากกันเช่นโปรตีนในเจลเพื่อขัดขวางการแพร่หรือการสูญเสียสารออกจากเจลไปในระหว่างการย้อมและการล้างสีย้อม

2) กำจัดสารเคมีที่อาจรบกวนวิธีการย้อมได้แก่ สารซักฟอก สารรีดิวซิง หรือส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ เช่น ไกลซีน

สารที่ใช้ตรึงมีหลายชนิด เช่น ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เอธานอล (ethanol) หรือเมธานอล (methanol) กรดอะซิติก กรดไตรคลอโรอะซิติก และกรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) ฟอร์มัลดีไฮด์ เหมาะสมที่จะตรึงพวกเพฟไทด์ ไกลโคเพปไทด์และโปรตีนด่าง ถ้าตรึงด้วยสารละลายกรดจะได้ผลไม่ดี การตรึงสารละลายตรึงเหล่านี้จะทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ จึงตกตะกอนอาจเห็นเป็นแถบขาว

ตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสีย้อมเป็นสารที่สามารถทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติได้อย่างอ่อน จึงเท่ากับเป็นการตรึงโปรตีนในขณะย้อมสีเจล แต่ปัญหาจะเกิดขึ้นเมื่อโปรตีนที่แยกออกจากกันเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ทำให้ตรึงโปรตีนไม่เพียงพอ จึงต้องมีขั้นตอนการตรึง เพิ่มขึ้นอีก 1 ขั้นตอน

2.14.3 การย้อมโดยใช้โคแมสซีบลู

การย้อมสำหรับการตรวจวิเคราะห์การแยกโปรตีนโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลที่นิยมมากที่สุด คือ การย้อมด้วยโคแมสซีบลู หรือ "Coomassie Brilliant Blue R 250" (R มาจากคำว่า reddish hue และ 250 เป็นตัวเลขแสดงความเข้มของสี) สีย้อมโคแมสซีบลูสามารถเก็บและใช้ได้หลายครั้ง และสามารถตรวจพบแถบของโปรตีนที่มีความเข้มข้นจำกัดประมาณ 1 ไมโครกรัม/แถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ ถ้าโปรตีนมีความเข้มข้นสูงการจับระหว่างสีย้อมและโปรตีนจะเริ่มไม่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการหาปริมาณของโปรตีนในเจล การย้อมด้วยวิธีนี้จะได้แถบที่สม่ำเสมอ เสถียรและเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องวัดความทึบแสง

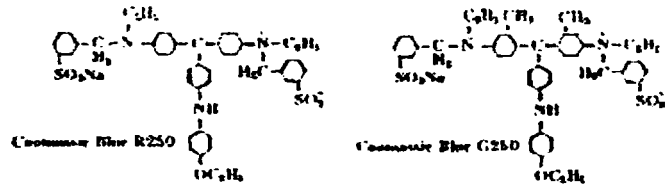
หลังจากเสร็จสิ้นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์แล้ว ต้องตรึงโปรตีนในเจลโดยใช้ 12.5เปอร์เซ็นต์ TCA นาน 30 นาที แล้วจึงย้อมเจลโดยแช่ในสารละลายเจือจาง 1 : 20 ของสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ โคแมสซีบลู R 250 ใน 12.5 เปอร์เซ็นต์ TCA นาน 1 ชม. สีย้อมจะซึมผ่านเข้าไปในเจลทำให้จับกับโปรตีนได้ดีขึ้น เพราะฉะนั้นแถบของโปรตีนจะมีมีเข้มขึ้น เมื่อย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงล้างสีย้อมด้วยสารละลายล้างสีย้อมจนกระทั่งพื้นหลังปราศจากสีย้อมและเห็นแถบโปรตีนเด่นชัดขึ้น แถบโปรตีนจะคงสีเข้มอยู่ระหว่าง 1-2 วัน ถ้าแถบมีสีจางมาก อาจเพิ่มความเข้มของสีได้โดยเติมสีย้อม 2-3 หยด ใน 7 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซีติก แล้วแช่เจลค้างคืน

2.14.4 กลไกการย้อมด้วยโคแมสซีบลู

การย้อมด้วยโคแมสซีบลูต้องการตัวกลางที่เป็นกรดเพื่อให้เกิดแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) ระหว่างโมเลกุลของสีย้อมกับหมู่อะมิโน (NH_3^+) ของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีแรง van der Waal (van der Waal's force) ที่ทำให้เกิดคอมเพลกซ์ระหว่างสีย้อมและโปรตีนทั้งพันธะนอน-โควาเลนท์ (non-covalent bond) ระหว่างสีย้อมกับบริเวณไม่โพลาร์ (non-polar region) บนโมเลกุลของโปรตีน การที่โคแมสซีบลูให้สีที่เข้มกว่าการย้อมด้วยสีอินทรีย์อื่นๆ เนื่องจากมีพันธะเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของสีย้อม โดยโมเลกุลสีย้อมจะใช้พันธะนี้ไปจับกับโมเลกุลสีย้อมในคอมเพลกซ์ซึ่งจับกับโปรตีนด้วย พันธะไอออนิก (ionic bond) และพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bond)

วิธีการย้อมโดยใช้โคแมสซีบลู R 250 มีหลายวิธีซึ่งแตกต่างกันที่สารละลายตรึงและสารละลายสีย้อม โดยทั่วไปใช้ TCA กรดซัลโฟซาลิไซลิก เมธานอลหรือเอธานอล การย้อมโดยใช้โคแมสซีบลูอีกวิธีหนึ่งคือใช้ "Coomassie Briliant Blue G 250" (G มาจากคำว่า greenish hue) หรือ "Xylene Cyanine Briliant G" โคแมสซีบลู G 250 นี้เป็น "dimethylated form" ของโคแมสซีบลู R 250 โคแมสซีบลู G 250 นี้ละลายได้เพียงเล็กน้อยใน 12เปอร์เซ็นต์ TCA ทำให้สารละลายมีลักษณะของสารแขวนลอย เมื่อตรึงเจลด้วย 12.5เปอร์เซ็นต์ TCA นาน 5 นาที แล้วย้อมด้วย 0.25 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โคแมสซีบลู G 250 นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลใน 5เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก แถบโปรตีนจะปรากฏให้เห็นชัดใน 5เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก เนื่องจากสีย้อมที่ไปจับกับโปรตีนจะละลายและแพร่เข้าไปในเจลไปจับกับโปรตีนที่บริเวณภายในได้ ลักษณะของสารแขวนลอยของสีย้อมชนิดนี้จะไม่สามารแพร่ผ่านเข้าไปในเจลได้ ทำให้ย้อมโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว โดยที่ไม่มีพื้นหลังที่มีสีเข้ามารบกวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 สีย้อมโคแมสซีบลูที่ใช้ตรวจสอบการแยกโปรตีนโดยเทคนิค PAGE
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

2.15 การเตรียมสแลบเจลในแนวตั้งตรง

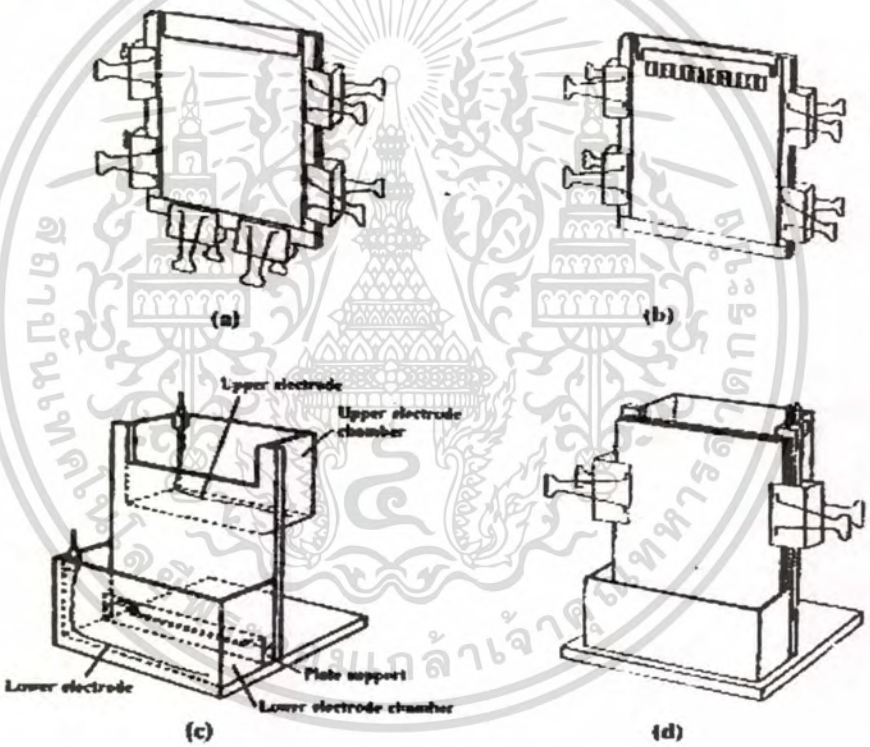
เจลถูกเตรียมขึ้นระหว่างแว่นกระจกหรือแผ่นพลาสติก 2 แผ่นที่สะอาด โดยแช่ในกรดโครมิกค้างคืน ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วตามด้วยเอธานอล วางแผ่นกระจกบนกระดาษที่สะอาด โดยให้ด้านที่สัมผัสเจลหงายขึ้นแล้วเช็ดด้วยอะซีโตน (acetone) หลังจากนั้นล้างด้วยเอธานอลแล้วปล่อยให้แห้ง แผ่นกระจกอาจมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าหรือสี่เหลี่ยมจัตุรัสแต่ต้องมีขนาดเท่ากัน แผ่นกระจกแผ่นหนึ่งที่ขอบด้านบนถูกเจาะให้เป็นช่องลึกประมาณ 20 มิลลิเมตร ประกบแผ่นกระจกทั้ง 2 เข้าด้วยกันโดยมี "spacer" รูปตัว U คั่นระหว่างแผ่นกระจก "spacer" เป็นตัวกำหนดความหนาของเจล เพราะฉะนั้น "spacer" จึงมีความหนาหลายขนาดขึ้นกับความต้องการว่าจะใช้เจลที่มีความหนาหรือเจลที่มีความบางมาก ยึดแผ่นกระจกด้วยที่หนีบกระดาษแล้ววางให้ตั้งตรง ใช้ปิเปตดูดสารละลายอะคริลาไมด์แล้วปล่อยลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกทั้ง 2 หวีพลาสติกมีหลายขนาดขึ้นกับจำนวนสารตัวอย่างและปริมาณสารตัวอย่างที่จะหยอด หลังจากเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันอย่างสมบูรณ์ ประมาณ 30-60 นาที (ในกรณีของ "disc gel" ต้องเตรียมเจลส่วนเซเปเรติงเจลก่อน แล้วจึงเตรียมสแตคกิงเจล ในส่วนสแตคกิงเจลต้องเสียบหวีลงไปเพื่อให้เกิดช่องหรือหลุมสำหรับหยอดสารตัวอย่างในเจลส่วนนี้) ให้เอาหวีออกจะเกิดเป็นลักษณะเป็นช่องหรือหลุมสำหรับหยอดสารตัวอย่าง ถ้าใช้เจลทันทีให้ล้างหลุมหรือช่องเหล่านี้ด้วยบัฟเฟอร์สำหรับอ่างอิเล็กโทรดโดยใช้ "syrige" หรือพลาสเจอร์ปิเปต แต่ถ้ายังไม่ใช้เจล ให้เก็บเจลโดยล้างหลุมด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้เตรียมเจล แล้วเติมทุกหลุมด้วยบัฟเฟอร์ให้เต็มเก็บไว้ในตู้เย็นจนกระทั่งใช้ เอาที่หนีบกระดาษออกแล้วจึงเอา "spacer" ออกจากแผ่นกระจกทั้ง 2 นำแผ่นกระจกที่มีเจลอยู่มาใส่ในอ่างอิเล็กโทรด โดยหันหน้าด้านแผ่นกระจกที่มีช่องหรือหลุมสำหรับหยอดสารตัวอย่างเข้าด้านในตรงอ่างอิเล็กโทรดบน ยึดแผ่นกระจกเข้ากับอ่างอิเล็กโทรดด้วยที่หนีบกระดาษ ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ในอ่าง อิเล็กโทรดทั้งบนและล่าง สารละลายบัฟเฟอร์ในอ่างบนต้องท่วมส่วนบนของเจล และในอ่างล่างปลายสุดของเจลต้องสัมผัสกับสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายตัวอย่างต้องเติมซูโครส หรือกลีเซอรอลเพื่อเพิ่มความหนาแน่นให้กับสารตัวอย่าง เวลาหยอดลงในหลุมหรือช่องจะได้ไม่ฟุ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจายในสารละลายบัฟเฟอร์ รวมทั้งต้องมี "tracking dye" ด้วย ใช้ "syrige" ดูดสารตัวอย่างแล้วค่อยๆ ปล่อยลงในช่องหรือหลุมอย่างช้าๆ

เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำเอาแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกทั้ง 2 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ "tracking dye" แล้วจึงนำแผ่นเจลมาตรึงและย้อมสี เมื่อได้แถบของโปรตีนที่แยกออกจากกันแล้วถ่ายรูปเก็บไว้แล้วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละแถบเพื่อนำไปคำนวณหาค่า R_f

การเก็บแผ่นสแลบเจลให้แช่ลงใน 3 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลเพื่อไม่ให้เจลแตก แล้วแช่แผ่นเซลโลเฟน (cellophane) 2 แผ่นในสารละลายกลีเซอรอล วางแผ่นเจลระหว่างเซลโลเฟน 2 แผ่นที่เปียก อย่าให้มีฟองอากาศระหว่างเจลกับเซลโลเฟน และรอบๆ ขอบเจลไม่เช่นนั้นเจลจะแตก ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งค้างคืน จะได้แผ่นเจลที่แห้ง การทำให้เจลแห้งถ้าเจลหนาเกินไป คือเกิน 1.5 มิลลิเมตร เจลจะแตกได้ในระหว่างทำให้แห้ง



รูปที่ 2.9 การเตรียมสแลบเจลในแนวตั้งตรง
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

2.16 เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ปฏิกริยาในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวทนั้นเกิดขึ้นเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและเกิดขึ้นในทุกเซลล์ แต่ไพรูเวทที่เกิดขึ้นนั้นสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้มากมาย ปฏิกริยาที่สำคัญ คือ การเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทธานอลซึ่งเกิดขึ้นในยีสต์และจุลินทรีย์หลายชนิด การเปลี่ยนแปลงขั้นตอนแรก คือ เกิดการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากไพรูเวท (decarboxylation) ได้

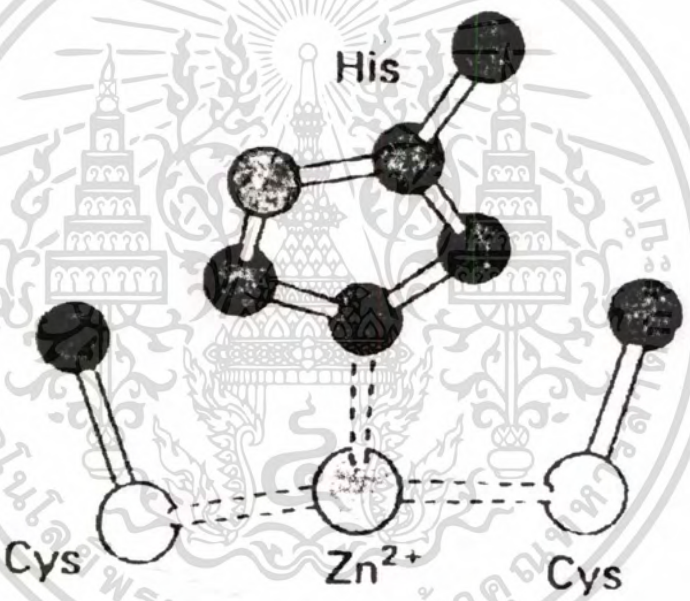
เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นอะซีตอลดีไฮด์ ซึ่งปฏิกริยานี้เร่งด้วยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase โดยมี Thiamine pyrophosphate เป็นโคเอนไซม์

ขั้นที่ 2 จะเกิดปฏิกริยารีดักชันของอะซีตอลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอลโดยใช้ NADH ซึ่งปฏิกริยานี้เร่งด้วยเอนไซม์ Alcohol Dehydrogenase (ADH) ดังนี้

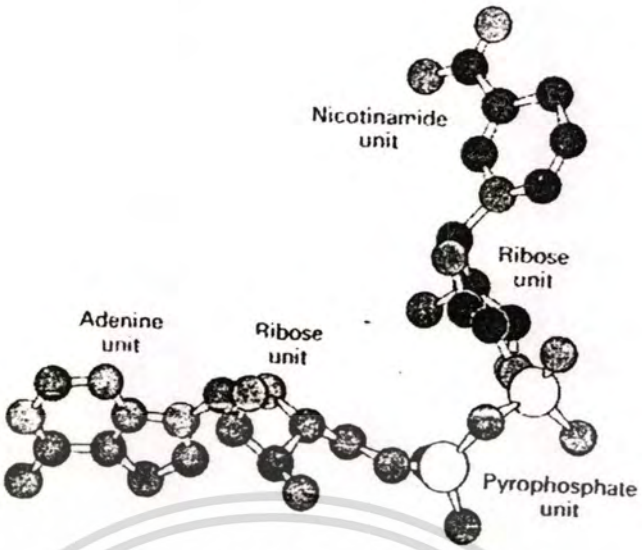
$$\text{acetaldehyde} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{ethanal} + \text{NAD}^+$$

ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสนั้นมีโมเลกุลของ Zinc ion ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับอะตอมซัลเฟอร์ของซีสทีอีน (cysteine) 2 โมเลกุล และอะตอมไนโตรเจนของฮีสทีดีน (histidine) อีก 1 โมเลกุล



รูปที่ 2.10 แบบจำลองบริเวณเร่งของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 แบบจำลองโครงสร้างของ NAD^+
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

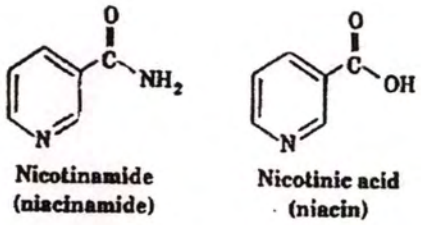
เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ และเร่งปฏิกิริยารีดักชันของอัลดีไฮด์(อะซีตัลดีไฮด์) เอนไซม์นี้พบในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดและพบมากในตับและไต โมเลกุลของเอนไซม์มีสังกะสี (Zinc) เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นโดย glutathione และ EDTA และถูกยับยั้งด้วยโลหะหนัก แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่สกัดได้จากตับของม้ามีมวลโมเลกุล 80,000 ขณะที่ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากยีสต์มีมวลโมเลกุล 141,000 ดาลตัน

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสใช้มากในการวิเคราะห์เอทานอลในของเหลวทางชีวภาพ ซึ่งจะนำไปใช้ในปฏิกิริยาคู่ควบในการวิเคราะห์ของเหลวทางชีวภาพ โดยพีเอชที่เหมาะสมของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสคือ 8.6 – 9.0 แต่สามารถขยายได้ถึงพีเอช 12.6 และ isoelectric point ของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสคือ 5.4 เอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นด้วย sulfhydryl reagent เช่น mercaptoethanol และ dithiotreitol

2.17 นิโคตินาไมด์ (nicotinamide) หรือไนอาซินาไมด์ (niacinamide) (อาภัสสรา ชมิดท์. 2538)

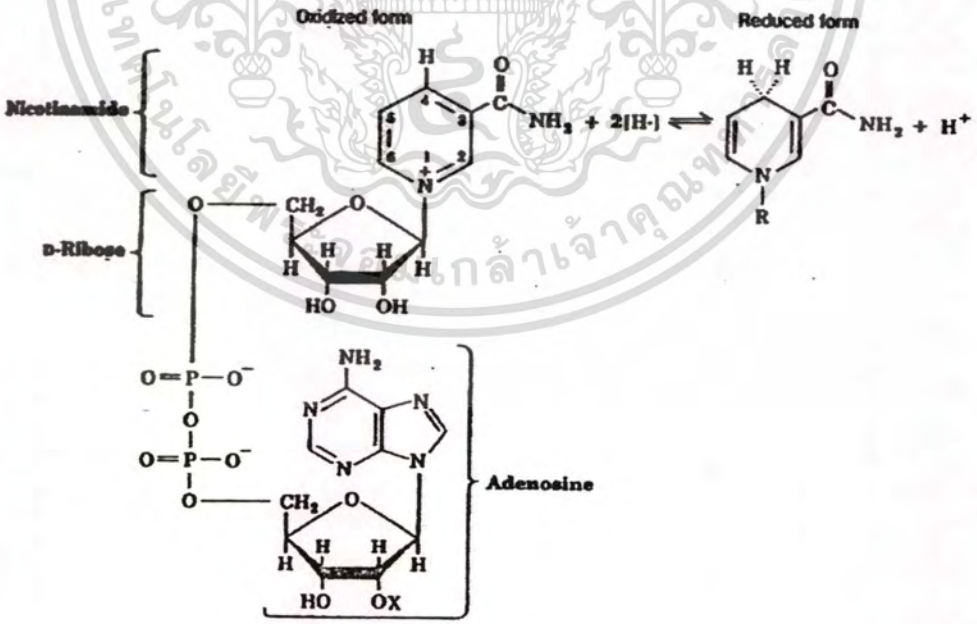
รูปกรดคาร์บอกซิลิก คือ กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) หรือไนอาซิน (niacin) เป็นอนุพันธ์ของไพริดีน (pyridine) มีโครงสร้างดังรูปที่ 7 พบทั่วไปในพืชและเนื้อเยื่อของสัตว์ เนื่องจากพืชและสัตว์ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิโคตินาไมด์ จากกรดอะมิโนทริปโตเฟน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของกรดนิโคตินิก (ไนอาซิน) และนิโคตินาไมด์
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

รูปโคเอนไซม์ของวิตามินชนิดนี้คือ นิโคตินาไมด์นิวคลีโอไทด์โคเอนไซม์ (nicotinamide nucleotide coenzyme) ซึ่งมี 2 ชนิดคือ นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (nicotinamide adenine dinucleotide , NAD^+) และ นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $NADP^+$) ดังรูปที่ 8 โคเอนไซม์นี้พบทั้งในรูปออกซิไดส์ (oxidized form NAD^+, $NADP^+$) และรูปรีดิวซ์ (reduce form NADH, NADPH)



รูปที่ 2.13 นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NAD^+) และนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ($NADP^+$)
ที่มา : อาภัสสรา ชมิดท์ (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุและอุปกรณ์ในการวิจัย

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Shimasu รุ่น UV1610)
- เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (ยี่ห้อ Dujardin-Sallerom)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (ยี่ห้อ Dever instrument รุ่น 215)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (ยี่ห้อ Hermle รุ่น Z383K)
- กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman)
- ขวดหมักไวน์
- หม้อนึ่งความดันไอ(Autoclave) (ยี่ห้อ Harrey รุ่น Hydroclave MC10)
- ชุดสำหรับทำอิเล็คโทรโฟรีซิสแบบสแลบเจล (ยี่ห้อ Scie-plas รุ่น V10-set)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Shimazu รุ่น EB-4000H)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Sartorius รุ่น A200S)
- อุปกรณ์บรรจุไวน์
- เครื่องแก้วต่างๆ
- วัสดุอุปกรณ์สำนักงาน

3.1.2 สารเคมีที่ใช้

- อาหารวุ้น PDA (Potato-Dextrose-Agar)	Scharlau
-โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	Merck
-โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck
-โพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$)	Fluca
-คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	Merck
-Folin-Ciocalteu reagent	J.T. Baker
- bovine serum albumin	Merck
- Acrylamide	Amersham
- Bisacrylamide	Amersham
- Tris-HCl	Amersham

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Glyceral	Amersham
- Bromphenol blue	Sigma
- Sodium dodecylsulfate (SDS)	J.T. Baker
- Ammonium persulfate	Fluca
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine)	Amersham
- ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล	Amersham
-โพแทสเซียมไดโครเมต	Fluca
- เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต	Merck
- O- phenanthroline H_2O	J.T. Baker
- แมกนีเซียมคลอไรด์	J.T. Baker
- Nicotinamide Adenicinw Dinucleotide (NAD)	Sigma
- Nitrobluetetrasolium (NBT)	Sigma
- Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT)	Amersham
- น้ำกลั่นสองครั้ง	
- ไนโตรเจนเหลว	

3.2 วิธีดำเนินการ

3.2.1 เห็ดที่ใช้ในการศึกษา

การทดลอง ใช้เห็ด 4 สายพันธุ์คือ เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดตีนแรด (*Trichloloma crassum*) และ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*)

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น

นำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดเจริญเติบโตอยู่จากขวดหัวเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อลงบนจานอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน เพื่อให้เส้นใยเจริญเติบโตฟูเต็มจานเพาะเชื้อ

3.2.3 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ด (Okamura *et al.* 2000)

นำเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในข้อ 3.2.1 มาเจาะบริเวณปลายโคโลนีโดยใช้คอร์ก บอยเลอร์ เบอร์ 3 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นวุ้นจำนวน 6 ชิ้นเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มี ให้ชิ้นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลว นำไปเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 8 11 14 17 และ 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การเตรียมสารสกัดจากเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยง

ทำการเก็บเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในข้อ 3.2.2 ที่อายุ 5 8 11 14 17 และ 21 วัน ล้างเส้นใย 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Saline Solution) ที่แช่เย็น 10 องศาเซลเซียส เทน้ำเกลือทิ้งแล้วใช้ปากคีบคีบแผ่นเส้นใยเห็ดวางลงบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ นำไปวางบนกรวยกรองลดความดัน ฉีดล้างเส้นใยเห็ดด้วยน้ำเกลือในกระบอกฉีด พร้อมทั้งเปิดเครื่องดูดอากาศ ใช้ปากคีบ คีบแผ่นเส้นใยเห็ดที่สะเด็ดน้ำ บดเส้นใยเห็ดในโกร่งที่แช่เย็นเติมไนโตรเจนเหลวระหว่างบดเพื่อป้องกันเอนไซม์เสียสภาพจากความร้อน ใช้ช้อนตักเศษเซลล์ที่ได้จากการบดเก็บลงใน eppendorf เติม Extraction Buffer (0.06 M Tris-HCl, พีเอช 6.8, กลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 10) 100ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสที่แยกออกจากเศษเซลล์ใส่ลงใน eppendorf อันใหม่ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

3.2.5 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี (Okamura *et al.* 2000)

ทำโดยการใส่ Control Solution (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 950 ไมโครลิตร ในคิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร เป็นคิวเวตที่ 1 ใส่ Sample Solution (ภาคผนวก ก) ปริมาณ 950 ไมโครลิตร ในคิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตรอันที่ 2 เติมสารสกัดเซลล์เห็ดจากข้อ 3.2.4 ลงไปคิวเวตละ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำคิวเวตที่ 1 ใส่ลงในเครื่องสเปกโตรโฟรโตมิเตอร์ที่ตำแหน่ง blank และใส่คิวเวตที่ 2 ลงที่ตำแหน่ง sample วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที ติดต่อกันเป็นเวลา 5 นาที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของเห็ดแต่ละชนิดที่อายุต่างๆ นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

3.2.6 การเลี้ยงและเตรียมเส้นใยเห็ดเพื่อทำการหมัก

ให้นำเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในข้อ 3.2.1 มาเจาะบริเวณปลายโคโลนีโดยใช้คอร์กบอยเลอร์ เบอร์ 3 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแทงชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ด้วยคอร์กบอยเลอร์ จำนวน 5, 10, 15 ชิ้น เลี้ยงเชื้อเห็ดในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารในการเพาะเลี้ยง PDB ที่มีการเพิ่ม malt extract ลงไปด้วยที่ความเข้มข้นร้อยละ2 (พีเอช 5.6) 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส เวลา ตามระยะเวลาต่างๆ คือ เห็ดนางรมใช้เวลา 17 วัน เห็ดหลินจือใช้เวลา 21 วัน เห็ดนางฟ้าใช้เวลา 8 วัน เห็ดตีนแรดใช้เวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะแบบมีออกซิเจนเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เก็บเกี่ยวเส้นใยเห็ดด้วยวิธีการกรอง แล้วล้างด้วยสารละลายน้ำเกลือที่แช่เย็น 2 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (พิณทิพย์ รื่นวงษา. 2538)

นำสารสกัดเซลล์เห็ด 10 ไมโครลิตร ต่อการทำอิเล็คโทรโฟรรีซีส 1 ตัวอย่างโดยผสมสารสกัดเซลล์เห็ดกับ Sample buffer (ภาคผนวก ก) 5 ไมโครลิตรก่อนใส่ในช่องบนเจล หยอดตัวอย่างลงบนเจลแต่ละช่องๆ ละ 1 ตัวอย่าง จำนวน 15 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย ผ่านกระแสไฟฟ้า 70 มิลลิแอมแปร์ โดยควบคุมความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 1 ชั่งโมง รอจนตัวอย่างเคลื่อนที่มาจนห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้าแล้วนำตัวอย่างออกจากอิเล็คโทรโฟรรีซีส เติมสีย้อมเอนไซม์ (ภาคผนวก ก)

3.2.8 การย้อมสีเพื่อวิเคราะห์ Alcohol Dehydrogenase (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539)

เติมสีย้อม (ภาคผนวก ก) ให้ท่วมเจลตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อเกิดแถบสีน้ำเงินแล้วเทสีย้อมทิ้งแล้วเติมสารละลาย Destrain (ภาคผนวก ก) ให้ท่วมเจลเพื่อล้างสีที่ส่วนเกินออกตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วเท Destrain ออก ทำซ้ำอีก 2 ครั้งโดยครั้งสุดท้ายไม่ต้องเท Destrain ออก ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงเท Destrain ทิ้ง จากนั้นเติม Glycerol ความเข้มข้นร้อยละ10 แช่ไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำกระดาษแก้วแช่ใน Glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 10 นาน 10 นาที นำเจลมาห่อด้วยกระดาษแก้วรีดเอาฟองอากาศออกให้หมด ขึงไว้กับกระจกให้ตึงโดยใช้คริปหนีบขอบไว้ ทิ้งไว้จนเจลแห้ง

3.2.9 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543)

โดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสชนิดโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต พอลิอะคริลาไมด์เจล (ภาคผนวก ข) เปรียเทียบกับโปรตีนมาตารฐาน (SDS-PAGE Low Molecular Weight Calibration Kit) ของบริษัท Amercham Biosciences ซึ่งมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนคือ 14,400 ถึง 97,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 6 ชนิด คือ แอลฟา-แลคตอลบูมิน (α-Lactalbumin), ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (Trypsin Inhibitor), คาร์บอนิก แอนไฮเดรส (Carbonic Anhydrase), โอวอลบูมิน (Ovalbumin), โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovin Serum Albumin) และ ฟอสโฟรีเลส บี (phoaphorylase b) น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,4000 20,100 30,000 45,000 66,000 97,000 ดาลตัน ตามลำดับ

3.2.10 การผลิตไวน์ (วันชัย สุทธินุ่น. 2541)

เตรียมองุ่นเพื่อทำไวน์องุ่น โดยล้างองุ่นและเด็ดองุ่นออกจากขั้ว คั้นเอาน้ำองุ่นออกมาให้ได้มากที่สุดให้ได้ปริมาณ 4,000 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือด เติมน้ำตาลปรับความหวานเท่ากับ 11 องศาบริกซ์ ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.8 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ต้มจนเดือดเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (1 กรัมต่อน้ำองุ่น 1 ลิตร) เติมเส้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใยของเห็ดที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.4 ลงไป 5 10 15 เพลเลท ต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร แล้วหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ดูดไวน์ส่วนที่ใสมาทำการพาสเจอไรส์ ที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที บรรจุไวน์ในขวดปิดฝาให้แน่น

3.2.11 การหาปริมาณแอลกอฮอล์ (A.O.A.C. 1990)

ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในชุดหลอดกลั่น เติมน้ำกลั่นลงไปจำนวนหนึ่งกลั่นจนสารละลายในขวดรองรับที่ใส่สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต(ภาคผนวก ข) ไว้ 25 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตรในขวดรองรับ 40 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นล้างปลายหลอดควบแน่นลงขวดรองรับแล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายสารละลายทั้งหมดลงใน ฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร หยดสารละลาย 1, 10- ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต (ภาคผนวก ข) 7-10 หยด จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ข) จนได้จุดยุติเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเขียวเป็นเขียวเทาหรือสีน้ำตาล การทำแบลงก์ ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

3.2.12 การหาปริมาณโพลิแซคคาไรด์โดยวิธี Anthrone test (สิริลักษณ์ ชัยจำรัส. 2536)

เตรียมสารละลายแอนโทรนโดยชั่งสารแอนโทรน 0.2 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาใช้ทดสอบหาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์โดยผสมสารละลายที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตร ให้เข้ากันดีกับสารละลายแอนโทรน 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 3-5 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ชุดควบคุมคือน้ำองุ่นที่ยังไม่ได้เติมเส้นใยเห็ด

3.2.13 การหาปริมาณสารอินูลิน

วิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography โดยศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

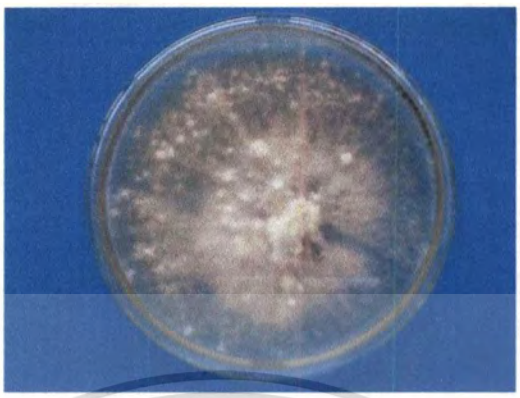
4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น

เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเห็ดทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองสามารถเจริญเติบโตได้เต็มจานเพาะเชื้อ โดยใช้อาหาร PDA เป็นอาหารเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 4.1 ถึง 4.4

รูปที่ 4.1 แสดงเส้นใยเห็ดตีนแรดบนอาหารวุ้น PDA อายุ 25 วัน

รูปที่ 4.2 แสดงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



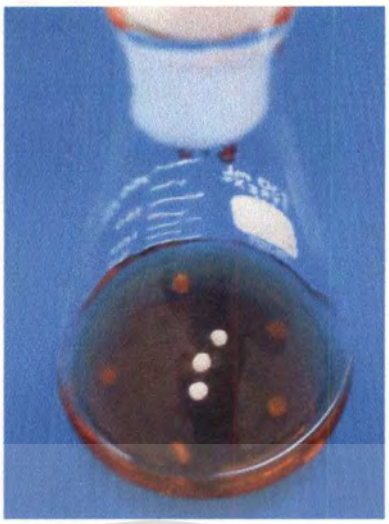
รูปที่ 4.3 แสดงเส้นใยเห็ดนางรมบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน

รูปที่ 4.4 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน

4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสารสกัดเส้นใยเห็ด

เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารเหลว PDB ที่ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 พบว่าเห็ดทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองสามารถเจริญเติบโตเป็นแผ่นเส้นใยบริเวณด้านบนของผิวหน้าอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 4.5 ถึง 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว PDB อายุ 0 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

รูปที่ 4.6 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว อายุ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.3 ผลการเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ดจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยง

เมื่อนำเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB มาเตรียมสารสกัดเซลล์พบว่าสารสกัดเซลล์ของเห็ดแต่ละชนิด มีสีแตกต่างกันตามสีของเส้นใยเห็ดชนิดนั้นดังรูปที่ 4.7 เรียงจากซ้ายไปขวาคือ เห็ดนางรม เห็ดหลินจือ เห็ดตีนแรด และ เห็ดนางฟ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.7 แสดงสารสกัดจากเห็ดที่ใช้ในการทดสอบเอนไซม์ ADH จากซ้ายไปขวา 1, 2 เห็ดนางรม 3, 4 เห็ดหลินจือ 5, 6 เห็ดตีนแรด 7, 8 เห็ดนางฟ้า

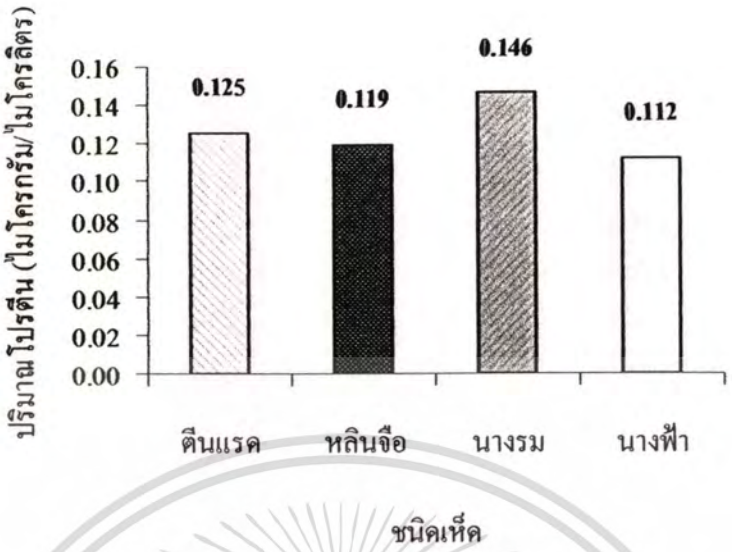
4.4 ผลของการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.* 1951)

นำเซลล์สกัดของเห็ดแต่ละชนิดมาหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA (ภาคผนวก ข) ที่ใช้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเห็ดตีนแรดมีปริมาณโปรตีน 0.152 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เห็ดหลินจือมีปริมาณโปรตีน 0.119 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เห็ดนางรมมีปริมาณโปรตีน 0.146 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เห็ดนางฟ้ามีปริมาณโปรตีน 0.112 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ดังรูปที่ 4.8

4.5 ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีการทางเคมี

เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารเหลว PDB ที่ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน และนำสารสกัดเซลล์เห็ดที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีทางเคมี พบว่าเห็ดชนิดต่างๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันดังนี้ เห็ดนางรมมีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 17 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ 0.0226 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เห็ดหลินจือมีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 21 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ 0.0218 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เห็ดนางฟ้ามีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 8 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ 0.0114 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เห็ดตีนแรดมีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 14 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่0.164 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.9

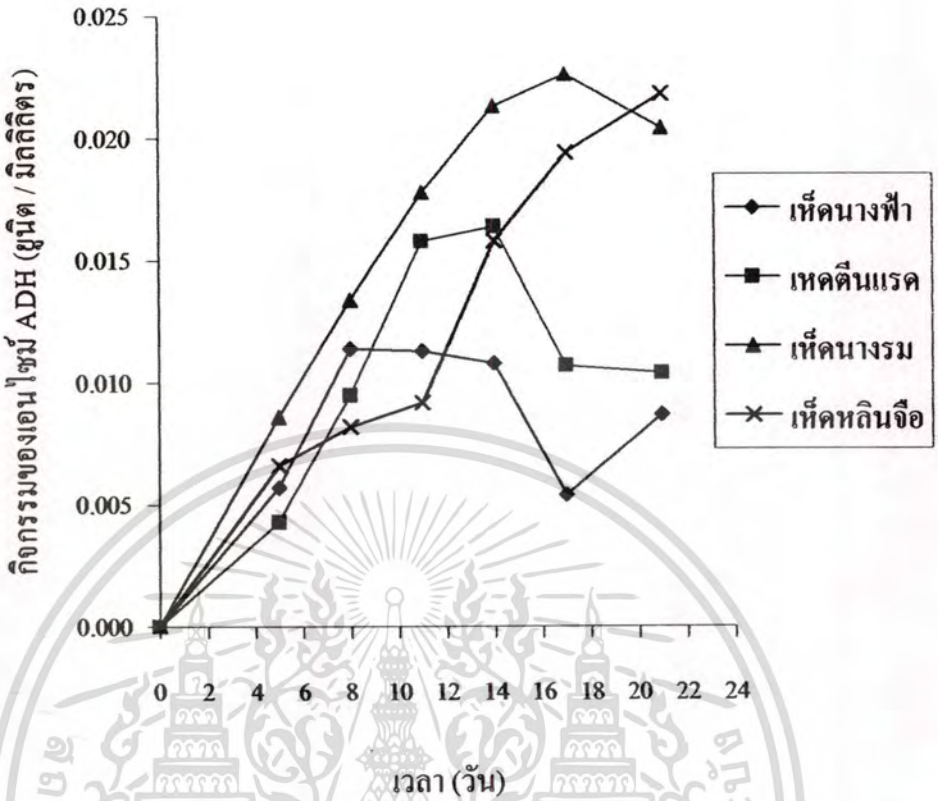
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณโปรตีนที่วัดโดยนำเซลล์สกัดของเห็ดแต่ละชนิดมาหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA (ภาคผนวก ค)

ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Okamura *et al.* (2001) ที่ทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) โดยใช้วิธีการทำปฏิกิริยากับสารมาตรฐานซึ่งสารผสมที่ใช้ประกอบด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล NAD+ ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล และ เซลล์สกัดของเห็ด 4 ชนิด คือ *Agaricus blazei Flammulina velutipes Pleurotus ostreatus* และ *Tricholoma matsutake* ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในส่วนผสมที่ใช้เป็นแบลงค์จะใช้น้ำกลั่นแทนการเติมสารตั้งต้น บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในคิวเวทขนาด 1 เซนติเมตร วัดค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ซึ่ง ผลการทดลองจะได้กิจกรรมของเอนไซม์ออกมาคือเห็ดสายพันธุ์ *Agaricus blazei Flammulina velutipes Pleurotus ostreatus* และ *Tricholoma matsutake* ได้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ออกมาเป็นยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน คือ 98.0 15.6 4.6 และ 2.5 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase โดยแสดงออกมาในหน่วยของยูนิตต่อมิลลิลิตร

4.6 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

เมื่อนำสารสกัดเซลล์เห็ดชนิดต่างๆ ตามวันที่ได้ทำการทดลองหากิจกรรมของเอนไซม์ ADH มาวิเคราะห์หาเอนไซม์คือ เห็ดนางรมใช้สารสกัดของวันที่ 17 เห็ดหลินจือใช้สารสกัดของวันที่ 21 เห็ดนางฟ้าใช้สารสกัดของวันที่ 8 เห็ดตีนแรดใช้สารสกัดของวันที่ 14 ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ 100 โวลต์ 70 มิลลิแอมแปร์ แล้วนำเจลที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับสารละลายที่ประกอบด้วย NAD ความเข้มข้นร้อยละ 1 PMS ความเข้มข้นร้อยละ 1 NBT ความเข้มข้นร้อยละ 1 MTT ความเข้มข้นร้อยละ 1 เอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 $MgCl_2$ 0.5 โมล พบว่าเห็ดทุกชนิดมีแถบสีน้ำเงินของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังรูปที่ 4.10 และ 4.11

จากการทดลองของ Okamura *et al.* (2001) ทำการวิเคราะห์เอนไซม์ ADH โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ชนิดพอลิอะคริลาไมด์เจลร้อยละ 75 (Polyacrylamide gel 7.5%) ใช้เอนไซม์ 2 ไมโครกรัมกระแสไฟฟ้า 2.5 มิลลิแอมแปร์ แล้วยอมดูกิจกรรมของเอนไซม์ ADH ในสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย Tris-HCl buffer พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ NAD+ ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ Phenazine methosalphate (PMS) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ Nitroblue tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองเมื่อวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟเรซิส (Polyacrylamide gel electrophoresis ;PAGE) ของเอนไซม์ ADH ที่มีการย้อมสีดูกิจกรรมของเอนไซม์จะแสดงลักษณะแถบสีน้ำเงินของแถบเอนไซม์ ADH ของเห็ดสายพันธุ์ *P. ostreatus*

รูปที่ 4.10 แสดงแถบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีเอนไซม์ โดยช่องที่ 1 และ2 เป็นเห็ดตีนแรด ช่องที่ 4 และ 5 เป็นเห็ดนางรม ช่องที่ 6 และ 7 เป็นเห็ดหลินจือ ช่องที่ 8 และ 9 เป็นเห็ดนางฟ้า

4.7 ผลการวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

เมื่อนำสารสกัดเซลล์เห็ดมาหาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยใช้สารสกัดเซลล์เห็ดที่อายุต่างๆกันคือ เห็ดนางรมใช้สารสกัดของวันที่ 17 เห็ดหลินจือใช้สารสกัดของวันที่ 21 เห็ดนางฟ้าใช้สารสกัดของวันที่ 8 เห็ดตีนแรดใช้สารสกัดของวันที่ 14 มาหามวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 70 มิลลิแอมแปร ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดยใช้ชุดทดสอบ LMW marker kit เป็น marker แล้วนำเจลที่ได้แช่ในสีย้อมโปรตีน (ภาคผนวก ก) พบว่าจะเกิดแถบสีน้ำเงินเกิดขึ้นเป็นช่วงๆแสดงถึงมวลโมเลกุลของโปรตีนของเห็ดแต่ละชนิดคือเห็ดนางรมจะมีมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสอยู่ในช่วง ประมาณ 50 กิโลดาลตัน เห็ดนางฟ้ามีมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสอยู่ในช่วงประมาณ 47 กิโลดาลตัน เห็ดตีนแรดมีมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสอยู่ในช่วงประมาณ 47 กิโลดาลตัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

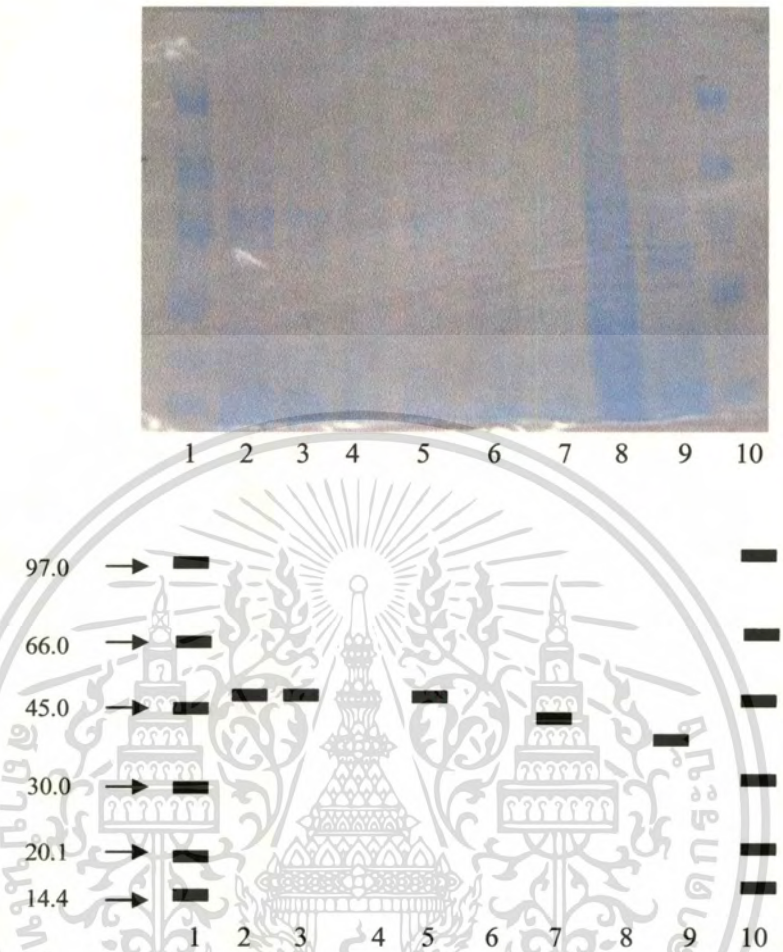
เห็ดหลินจือมีมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสอยู่ในช่วงประมาณ 37 กิโลดาลตัน ดังรูปที่ 4.11

จากการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ADH โดยวิธีของ Okamura *et al.* (2001) ด้วยวิธีการกรองผ่านเจล (gel filtration) ในคอลัมน์ TSK gel G3000 SW ขนาด 0.75 X 30 เซนติเมตร อัตราการไหล 700 ไมโครลิตรต่อนาที สภาวะที่ใช้คือ เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol) ร้อยละ 0.01 เป็นเฟสเคลื่อนที และ กรีเซอรอล (glycerol) ร้อยละ 10 เป็นเฟสหยุดนิ่ง จากนั้นเปรียบเทียบกราฟกับโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิดที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแน่นอนคือ กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส (glutamate dehydrogenase) 290 กิโลดาลตัน แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) 142 กิโลดาลตัน อีโนเลส (enolase) 67 กิโลดาลตัน อะดีนิลเลทไคเนส (adenylate kinase) 32 กิโลดาลตัน และ ไซโตรโครม ซี (cytochrome c) 12.4 กิโลดาลตัน ได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของเห็ดสายพันธุ์ *Agaricus blazei* *Flammulina velutipes* *Pleurotus ostreatus* และ *Tricholoma matsutake* เป็น 59 90 70 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

4.8 ผลของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากการใช้เส้นใยของเห็ดหมัก

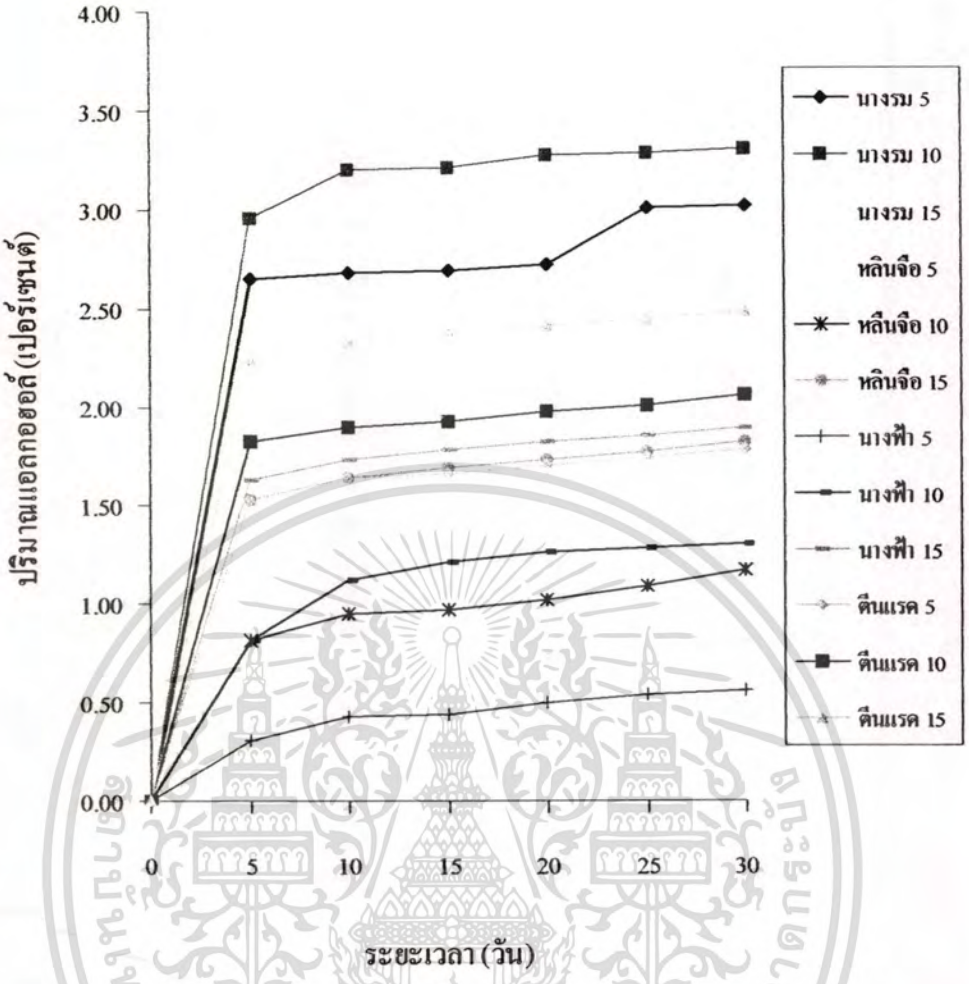
หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดให้เป็นลักษณะก้อนใยเห็ด ตามอายุเส้นใยต่างๆกันคือ เห็ดนางรมใช้เส้นใยของวันที่ 17 เห็ดหลินจือใช้เส้นใยของวันที่ 21 เห็ดนางฟ้าใช้เส้นใยของวันที่ 8 เห็ดตีนแรดใช้เส้นใยของวันที่ 14 แล้วนำไปหมักในน้ำผลไม้โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณเส้นใยเห็ดที่เติมลงไป 5 10 15 เพลตเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร แล้วหมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นดูดไวน์ส่วนที่ใสมาทำการพาสเจอไรส์ที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที บรรจุไวน์ในขวดปิดฝาให้แน่น แล้วทำการหาปริมาณแอลกอฮอล์พบว่าเห็ดนางรมที่ใช้เส้นใย 15 เพลเลทให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุดในวันที่ 30 ของการหมักคือ 3.65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเห็ดที่ให้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยที่สุดคือเห็ดนางฟ้าที่ใช้ปริมาณเส้นใย 5 เพลเลทให้ปริมาณแอลกอฮอล์ 0.031 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงแถบสีที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีโปรตีนช่องที่ 1, 10 Marker 2, 3 เห็ดนางรม 4, 5 เห็ดนางฟ้า 6, 7 เห็ดตีนแรด 8, 9 เห็ดหลินจือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ที่ในไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยเห็ดปริมาณต่างๆ การหมักเป็นเวลา 30 วัน

Okamura *et al.* (2001) ได้ทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol concentration) ในไวน์ที่หมักได้จากเห็ดสายพันธุ์ *Agaricus blazei* *Flammulina velutipes* *Pleurotus ostreatus* และ *Tricholoma matsutake* ด้วยเครื่อง HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด TSK gel oapak-A ขนาด 0.73 X 30 เซนติเมตร ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์แบบ RI ได้ผลออกมาคือ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในไวน์ที่ไดสูงสุดได้จากไวน์ที่ผลิตจากเส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* มีปริมาณร้อยละ 12.2 มีความเข้มข้น 2648 มิลลิโมลาร์ และไวน์ที่ผลิตจากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ *Flammulina velutipes* มีความเข้มข้นแอลกอฮอล์น้อยที่สุดโดยมีปริมาณร้อยละ 3.0 มีความเข้มข้นแอลกอฮอล์เท่ากับ 651 มิลลิโมลาร์ ส่วนไวน์ที่ผลิตจากเส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ *Agaricus blazei* มีปริมาณแอลกอฮอล์ ร้อยละ 8.0 มีความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 1736 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Okamura *et al.* (2002) ทำการทดลองหมักเบียร์จากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ *Agaricus blazei* *Flammulina velutipes* *Pleurotus ostreatus* และ *Tricholoma matsutake* พบว่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในเบียร์สูงสุดได้จากเบียร์ที่ผลิตได้จากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma matsutake* มีปริมาณร้อยละ 4.6 มีความเข้มข้น 1069 มิลลิโมลาร์ ส่วนใน *Flammulina velutipes* มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่ำสุดมีปริมาณร้อยละ 3.0 มีความเข้มข้น 651 มิลลิโมลาร์ กลิ่นรสของเบียร์ที่ผลิตได้จากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma matsutake* มีกลิ่นคล้ายเส้นใยเห็ด *Tricholoma matsutake*

ในการทดลองหมักสาเก Okamura *et al.* (2002) พบว่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในสาเกสูงสุดได้จากสาเกที่ผลิตจากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ *Agaricus blazei* มีปริมาณร้อยละ 8.0 มีความเข้มข้น 1736 มิลลิโมลาร์ ส่วนในสาเกที่ผลิตจากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma matsutake* มีปริมาณร้อยละ 3.0 มีความเข้มข้น 651 มิลลิโมลาร์ และสาเกที่ผลิตจากเส้นใยเห็ดสายพันธุ์ *Flammulina velutipes* มีความเข้มข้นแอลกอฮอล์ต่ำสุด มีปริมาณร้อยละ 2.9 มีความเข้มข้น 629 มิลลิโมลาร์

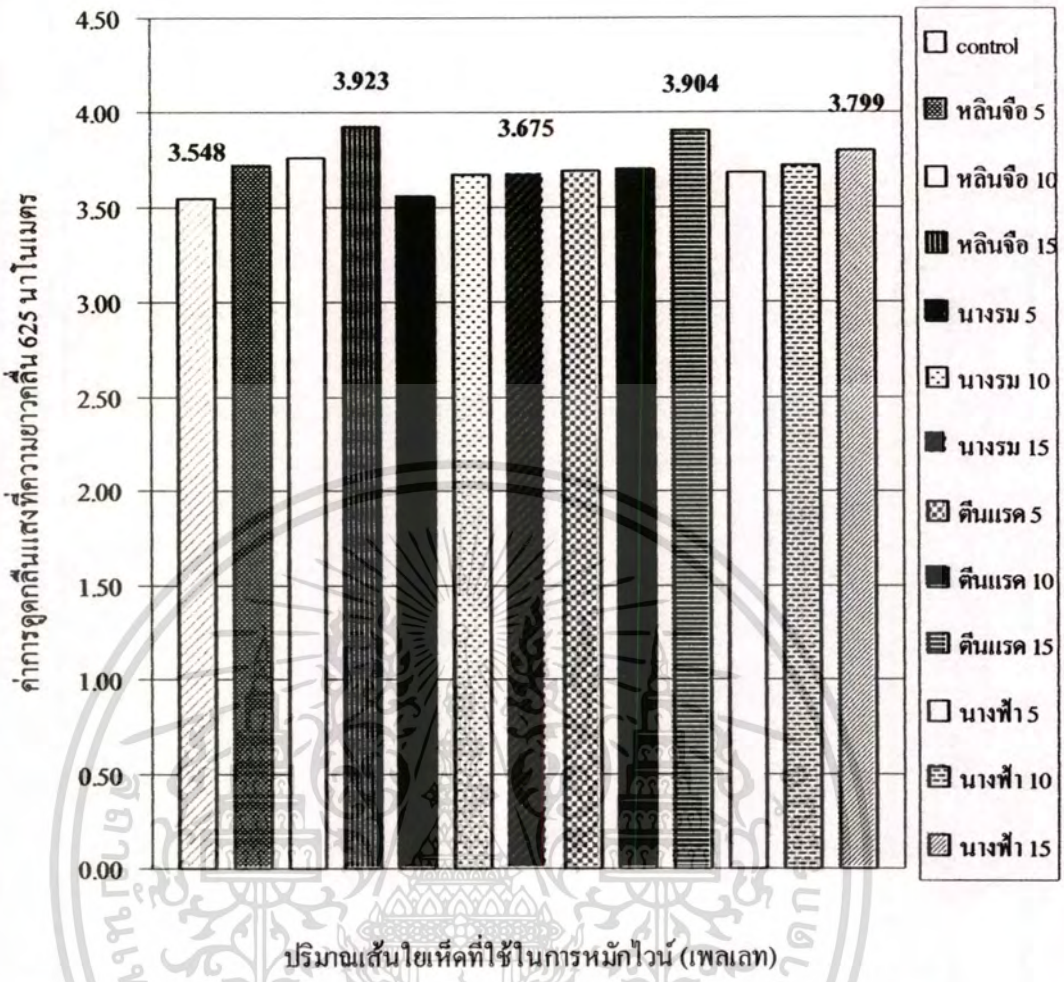
4.9 ผลการหาปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในน้ำไวน์ที่ผ่านการหมักด้วยเส้นใยเห็ด

ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในน้ำไวน์ที่ผ่านการหมักด้วยเส้นใยเห็ดจนครบ 30 วันแล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี Antrone test พบว่าเห็ดทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยของเห็ดหลินจือหมักมีปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์มากที่สุด โดยได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.923 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร รองลงมาคือไวน์จากเส้นใยของเห็ดตีนแรดที่ได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.904 เห็ดนางฟ้าได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.799 และเห็ดนางรมตามลำดับได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.675 ส่วนชุดควบคุมได้ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ 3.548 ดังรูปที่ 4.13

4.10 ผลการหาปริมาณสารอินูลินในน้ำไวน์ที่ผ่านการหมักด้วยเส้นใยเห็ด

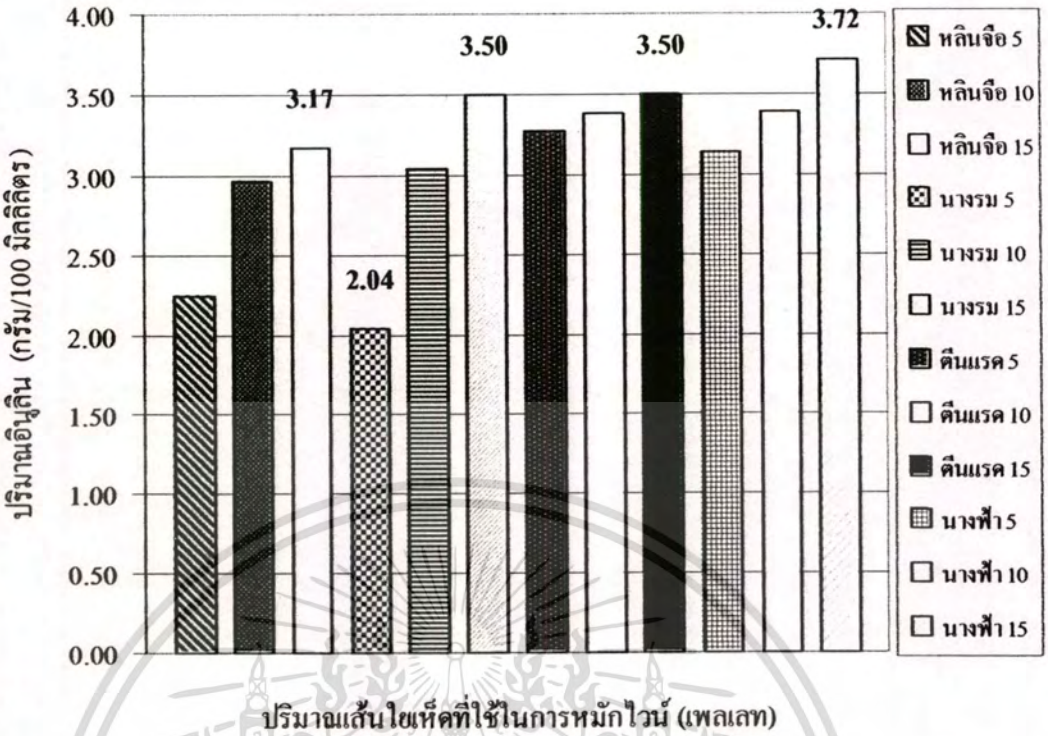
ปริมาณสารอินูลินในน้ำไวน์ที่ได้จากหมักด้วยเส้นใยเมื่อครบ 30 วันแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography โดยศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) จะได้ว่า ไวน์ที่หมักด้วยเส้นใยของเห็ดนางฟ้า 15 เพลตเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร ให้ปริมาณอินูลินสูงที่สุดคือ 37.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไวน์ที่หมักด้วยเส้นใยเห็ดนางรมที่ปริมาณ 5 เพลตเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร ให้ปริมาณอินูลิน 20.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยเห็ดในการหมักเพื่อทำการค่าปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ที่ปริมาณเส้นใยต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 แสดงผลการวิเคราะห์สารพอลิแซคคาไรด์ชนิดอินูลินในไวน์ที่ใช้เส้นใยเห็ดในการหมักที่ปริมาณเส้นใยต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารเหลว PDB ที่ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ นำสารสกัดเซลล์เห็ดที่ได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ADH ด้วยวิธีทางเคมี พบว่าเห็ดชนิดต่างๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันดังนี้ เห็ดนางรมมีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 17 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่0.0226 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เห็ดหลินจือมีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 21 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ 0.0218 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เห็ดนางฟ้ามีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 8 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ 0.0114 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เห็ดตีนแรดมีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุดวันที่ 14 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่0.164 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการวิเคราะห์หาเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (ADH) ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซีสพบว่า เมื่อนำสารสกัดเซลล์เห็ดชนิดต่างๆ ตามวันที่ได้ทำการทดลองหากิจกรรมของเอนไซม์ ADH มาวิเคราะห์หาเอนไซม์มาวิเคราะห์ที่ 100 โวลต์ 70 มิลลิแอมแปร แล้วนำเจลที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับสารละลายที่ประกอบด้วย NAD เข้มข้นร้อยละ 1 PMS เข้มข้นร้อยละ 1 NBT เข้มข้นร้อยละ 1 MTT ความเข้มข้นร้อยละ 1 เอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 $MgCl_2$ 0.5 โมล พบว่าเห็ดทั้งสี่ชนิดคือ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดหลินจือ และ เห็ดตีนแรด มีแถบสีน้ำเงินของเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (ADH)

ผลการศึกษาหาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH โดยใช้สารสกัดเซลล์เห็ดที่อายุต่างกันตามวันที่ได้ทำการทดลองหากิจกรรมของเอนไซม์ ADH มาวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 70 มิลลิแอมแปร์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดยใช้ LMW marker kit เป็น marker พบว่าจะเกิดแถบสีน้ำเงินเกิดขึ้นเป็นช่วงๆแสดงถึงมวลโมเลกุลของโปรตีนของเห็ดแต่ละชนิดคือเห็ดนางรมจะมีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH อยู่ในช่วง ประมาณ 50 กิโลดาลตัน เห็ดนางฟ้ามีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH อยู่ในช่วงประมาณ 47 กิโลดาลตัน เห็ดตีนแรดมีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH อยู่ในช่วงประมาณ 47 กิโลดาลตัน เห็ดหลินจือมีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ ADH อยู่ในช่วงประมาณ 37 กิโลดาลตัน

จากการศึกษาหาปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จากหมักไวน์ด้วยเส้นใยเห็ดทั้งสี่ชนิดเมื่อใช้เส้นใยเห็ดตามอายุต่างๆกันตามวันที่ได้ทำการทดลองหากิจกรรมของเอนไซม์ ADH มาหมักในน้ำผลไม้โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณเส้นใยเห็ดที่เติมลงไป 5 10 15 เพลเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร หมักที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน พบว่าไวน์จากเห็ดนางรมที่ใช้เส้นใย 15 เพลเลทมีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอลกอฮอล์สูงที่สุดในวันที่ 30 ของการหมักคือ 3.65 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไวน์จากเห็ดที่มีให้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยที่สุดคือเห็ดฟางที่ใช้ปริมาณเส้นใย 5 เพลเลทมีปริมาณแอลกอฮอล์ 0.031 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาหาปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในน้ำไวน์ที่ผ่านการหมักด้วยเส้นใยเห็ดจนครบ 30 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี Antrone test พบว่าไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยของเห็ดหลินจือหมักมีปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์มากที่สุด โดยได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.923 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร รองลงมาคือไวน์จากเส้นใยของ เห็ดตีนแรดที่ได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.904 เห็ดนางฟ้าได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.799 และเห็ดนางรม ได้ค่าการดูดกลืนแสง 3.675 ตามลำดับ

จากการศึกษาหาปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ชนิดอินูลินในน้ำไวน์ที่ได้จากหมักด้วยเส้นใยเมื่อครบ 30 วันแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี High Performance Liquid Cromatography โดยศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) พบว่า ไวน์ที่หมักด้วยเส้นใยของเห็ดนางฟ้า 15 เพลเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร ให้ปริมาณอินูลินมากที่สุดคือ 37.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไวน์ที่หมักด้วยเส้นใยเห็ดนางรมที่ปริมาณ 5 เพลเลทต่อน้ำผลไม้ 30 มิลลิลิตร ให้ปริมาณอินูลินน้อยที่สุด 20.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สุดท้ายนี้มีข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยนี้ว่าในขั้นตอนการหาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซีส เอนไซม์อาจสูญเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการสกัด หรือการผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่อุปกรณ์การทำเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส เราสามารถจะแก้ไขได้โดยไม่ใช้ความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าที่มีค่าสูงเกินไป หรือเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม หรือทำอิเล็คโทรโฟรีซีสในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และทำการเก็บรักษาสารสกัดเซลล์เห็ดเป็นอย่างดีที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์อาจสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ ระหว่างที่นำออกมาทำการทดลอง ซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองผิดพลาดไม่ปรากฏแถบสีเกิดขึ้น ทั้งๆ ที่อาจมีเอนไซม์อยู่

ในขั้นตอนการหมักปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นยังมีน้อย ดังนั้นจึงจะต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเช่น ความข้มข้นน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ เพื่อให้ได้เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น หรืออาจทำการผสมเห็ด 2 สายพันธุ์ (mixed culture) ช่วยในการหมัก ซึ่งเห็ดชนิดหนึ่งมีความสามารถในการสร้างแอลกอฮอล์ได้มาก และอีกสายพันธุ์หนึ่งมีสรรพคุณทางยาที่ดีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเส้นใยไมซีเลียมเห็ดในการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2522. **พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522.** กรุงเทพ: ม.ป.ท.

กระทรวงสาธารณสุข. 2541. **ฉลากโภชนาการ.** กรุงเทพ: ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 182.

กำเนิด สุภัณวงษ์. 2532. **จุลชีวอุตสาหกรรม.** เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า215-224.

ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543. **การปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางฟ้าโดยการผสมพันธุ์.** เชียงใหม่: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ชาญยุทธ์ ภานุทัต , นงนุช แตงทรัพย์ และสวัสดิ์ เชียงแข็ง. 2543. **การศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดร่วมกับการปลูกผัก.** กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520. **การเพาะเห็ดบางชนิดในประเทศไทย.** กรุงเทพ: อักษรสยามการพิมพ์.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. **ปฏิบัติการเอนไซม์.** กรุงเทพ: ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. 2544. **"การผลิตไวน์จากพืชสมุนไพร". บทความวิชาการ วารสาร Food อาหาร. ฉบับที่ 3 ปีที่ 31.** กรุงเทพ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. **การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ลักษณะทางสันฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมสีเทา.** กรุงเทพ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2518. **การทำไวน์เป็นงานอดิเรก.** กรุงเทพ: หจก. เสรีภัณฑ์.

ปริญญา รัตนพิมาน. 2535. **การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งของเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*).** กรุงเทพ: วิทยานิพนธ์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปรีชา กลิ่นเกษร. 2530. **"เห็ดสกุล *Ganoderma lucidum* ในประเทศไทย". บทคัดย่อการะประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่13.** สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. **เทคโนโลยีการเพาะเห็ด.** กรุงเทพ: สำนักพิมพ์ รั้วเขียว.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พรทิพย์ ภูมิแกดำ. 2546. การศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดด้วยเทคนิคไอโซไซม์. กรุงเทพ: วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พัชรา วีระกะลัส. 2541. เอนไซม์. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พันทวี ภักดีดินแดน. 2519. "การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเห็ดตีนแรด". หน้า 35-43. วารสารเห็ดสยาม. กรุงเทพ: ม.ป.ท.

พิณทิพย์ รื่นวงษา. 2538. การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลกโตรโฟเรซิส. หน้า 4.1-4.12. กรุงเทพ: ม.ป.ท.

มาลี จิรวงศ์ศรี. 2000. **Carbohydrate : Inulin, Oligofructose Ingredient ปี 2000.** กรุงเทพ: บ ริษัท จาร์พา เท็คเซ็นเตอร์ จำกัด.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. **เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

วสันณ์ เพชรรันต์ และวิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2530. "การงอก basidiospore ของเห็ดตีนแรด". หน้า 14-29. วารสารโรคพืช. ฉบับที่ 7. กรุงเทพ: ม.ป.ท.

วันชัย สุทธินุ่น. 2541. **เอกสารผลิตไวน์.** กรุงเทพ: ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และไมตรี สุทธจิตต์. 2546. "เห็ดสมุนไพร: จากอดีต สู่ปัจจุบัน และ อนาคต". เอกสารอัดสำเนา. กรุงเทพ: ศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก.

สามารถ พรหมศิริ. 2539. **การทำไวน์.** กรุงเทพฯ: โครงการหนังสือเกษตรชุมชน.

สิริลักษณ์ ชัยจำรัส. 2536. **การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารโพลิแซคคาไรด์.** กรุงเทพ: วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์, รศ.. 2533. "เห็ดหมื่นปี". หน้า 69-74. วารสารวิทยาศาสตร์. ฉบับ 42(2). กรุงเทพ: ม.ป.ท.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535. จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 203-206. กรุงเทพ: คณะวิทยาศาสตร์ มศว. ประสานมิตร ..

อาภัสสรา ชมิดท์. 2538. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส.** กรุงเทพ: คณะสัตวแพทย์ศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

อิศรา เจียนิวัตต์ และเอกชนก เทียนทอง. 2546. **การวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากเห็ดที่กินได้.** กรุงเทพ: โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2530. **เห็ดเมืองไทย.** กรุงเทพ: ไทยวัฒนาพานิช.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A. Blandino, I. Caro, D. Cantero. 1997. "Comparative Study of Alcohol Dehydrogenase Activity in Flor Yeast Extracts". 651-654. **Biotechnology Letters,** 19(7). n. p.

A.O.A.C. 1990. "Office Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed". **The Association of Official Analytical Chemists.** Virginia: Arlington,

Alexopulos, C. J. 1962. **Introductory Mycology,** Tokyo: Toppen Printing Company..

Alexopoulos, C.J. & Mims , C.W. 1996. **Introductory Mycology.** 4th ed. New York : John Wiley & Sons.

Astrup, T. and Mullertz, S. 1952. "The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity". 346-351. **Arch. Biochem. Biophy** , 40.

Ayres, C. J., Mundit, O. J., and Sandine, E. W. 1980. **Microbiology of Foods.** 147-179. W. H. Freeman, San Francisco. n. p.

Bakalinsky, T.A. and Penner, H.M. 1993. **Encyclopeadia of Food Science,Food Technology and Nutrition.** 89-101. London. Macrae, R., Robinson, K. R., and Sadler, J. M., Academic Press,

Chung, W. T., Lee, S. H., Kim, J. D., Park, Y. S., Hwang, B., Lee, S. Y. and Lee, H. Y. 2001. "Effect of Mycelium Culture Broth of *Ganoderma lucidum* on the Growth Characteristics of Human Cell Lines". , 550-555. **Journal of Bioscience and Bioengineerimg.** Vol 92. No. 6.

Davis, J. B., Disc electrophoresis-II; 1964. "Method and application to human serum protein". 404-427.**Ann. NY Acad. Sci.** 121.

Glenn R. Gibson, Carroline L. Wills and Ian Van Loo. 1994 . "Non Digestible Oligosaccharide and Bifidobateria Implications for Health". **Int Sugar J.** Vol. 96 No. 1150. n. p.

Glenn R. Gibson & Marcel B. Robertfroid . 1995. "Critical rewiew, Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics". 1401-1412. **J. Nutr.** 125.

Hirasawa, R., Goto, I., Okamura, T., Horie, N., Kiyohara, T., and Ohusugi, M. 1997. "Screening of fibrinolytic enzymes derived from basidiomycetes". 13-17. **Mushroom Sci. and Biotech.**, 5.

Kinnoshita, A. and Horie, N. 1993. "Inhibitory activity of green tea chatechins on thrombin". 417-422. **Jpn. J. Thromb. Hemost.,** 4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin, J. M., Lin, C. C., Chen, M. F., Ujiie, T., and Takada, A. 1995. "Radical scavanger and antiheptotoxic activity of *Ganoderma formosanum Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neo-japonicum*". 33-41. **Jounal of Ethno-Phamacology.** Vol 47.

Leon, P. 1999. "Inulin and Oligofructose are Part of the Dietary Fiber Complex". **J. AOAC Int**. Vol. 82 No. 2.

Lowry , H.O., Rosebrough, J. N., Farr, L. A., and Randall, J. R. 1951. "Protein measurement with the folin phenol reasgent". 193, 265-275. **J. Biol. Chem.**.

Marcel B. Robertfroid, Jan A.E. Van Loo and Glenn R. Gibson . 1998. "The Bifodogenic Nature of Chicory Inukine and Its Hydrolysis Products", 128 : 11-19. **Crt. Rev. J. Nutr.**

Mizuno T., Kato N., Totsuka A., Takenaka K., Shinkai K. and Shimizu M. Fractiona. 1984. **Structural Features and Antitumor Activity of Water Soluble Polysaccharide from "Reish", the fruiting Body of *Ganoderma lucidum*.** Nippon Nogeikagaku Kaishi. n. p.

Mukkawy, S. E., Messelhy, M. R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotonho, K., Kawahata, T., and Otake. T.1998. **Anti-HIV and Anti-HIV-1-Peotease Substances from *Ganoderma lucidum*** . pp 1651-1657. Phatochemistry. Vol 49, No. 6.

Mushroom and Health. [Online]. Available :hyyp://www.health.pon.net/healthref.html1 , 1998.

Moss, R. 2002. **Stinkhorn Mushroom Juice:Latvian Folk Remedy Shows Promise Against Cancer.** Expert guidance for smart decisions, July 11. n. p.

Nelson, David L., Cox, Michael M. Lehninger. 2000. "Principles of Biochemistry 3rd Edition". **Worth Publishers.** New York. n. p.

Ninfa, Alexander J., Ballou, David P. 1998. **Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology.** Maryland: Fitzgerald Science Press, Inc.

Okamura, T., Horie, N., Miyuzaki, Y., and Ohsugi, M. 1997. "Fumaric acid , anti-thrombin substance from *Rhizopus javanicus*". 241-247. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**., 43.

Okamura, T., Okata, T., Minamimoto, N., Takeno, T., Noda, H., Fukuda, S., and Ohsuki, M. 2001. "Characteristics of Wine Produced by Mushroom Fermentation. Biosci, Biotechnol". 1596-1600. **Biochem.**,65(7).

Okamura, T., Takeno, T., Dohi, M., Yasumasa, I., Hayashu, T., Toyoda, M., Noda, H., Fukuda, S., Horie, N. and Ohsugi, M. 2002. "Development of Mushroom for Thrombosis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prevention by Protoplast Fusion. Biosci". **Bioengineering.** Vol.89.

Paul A.A. Coussement. 1999. "Nutritional and Health Benefits of Inuline and Oligofructose". 1412 s – 1417 s. **J.Nurt.** 129.

Pirjo Mattila, Karoiiina Suonaa, and Vieno Piironen. **Functional Properties of Eible Mushroom.** 694-696. Nutrition, Chemistry, Microbiology, Vol.16.

Pongsamat S, Assawamunkong S, Markman N, et al. 1986. **Biochemical and Biological Evaluation of Nutritional Quality of Mushrooms.** Bangkok: Faculty of Pharmacology, Chulalongkorn University.

Skoog, Douglas A., Holler, E., James, Nieman, Timothy, A. 1998. **Principles of Instrumental Analysis 5th Edition.** Philadelphia: Harcourt Brace & Company.

Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E., and Misaki, A., 1985. "Structures and Antitumor Activity of the Polysaccharide Isolated from Fruiting body and the Growing Culture of Mycelium of *Ganoderma lucidum*". pp. 2641-2653. **Agric. Biol. Chem.,** 49(9).

Whistler, L. S., Bushway, A. A., Singh , P. P. ,Nakahara, W., and Tokuzen, R. 1976. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.** pp. 235-275. New York: Academic Press. 32.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายเคมี

1. สูตรอาหารวุ้น PDA

สูตรอาหารวุ้น PDA (Potato-Dextrose-Agar) ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200-300	กรัม
น้ำตาลเดร็กโตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำ	1	ลิตร

2. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.* 1951)

1) สารละลาย ก ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 2 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

2) สารละลาย ข ละลายโพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 2.7 กรัม ในน้ำ กลั่น 100.0 มิลลิลิตร

3) สารละลาย ค ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 1 กรัมในน้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

4) สารละลาย ง นำสารละลาย ก 100.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ข 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (สารละลายนี้เตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

5) Folin-Ciocalteu reagent 1N นำ Folin-Ciocalteu reagent (2N) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (สารนี้ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

6) สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin ละลาย bovine serum albumin 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาทำให้เจือจางโดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 25-250 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

2.2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry *et al.* 1951)

1) นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง (ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ)

2) เติมสารละลาย ง 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) เติม Folin-Ciocalteu reagent 1N 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในข้อ 2 ผสมให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สีเกิดอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่า OD ที่ได้หาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4) ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 1-3 เขียนกราฟระหว่าง OD และความเข้มข้นของ bovine serum albumin

5) ถ้าในตัวอย่างมีโปรตีนสูงหว่าช่วงกราฟมาตรฐาน ต้องเจือจางตัวอย่างให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้

6) รายงานผลการทดลอง

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟเรซิส (พิณทิพย์ รื่นวงษา. 2538)

1) Stock solution

- Acrylamide
- Bisacrylamide
- Tris-HCl
- Glyceral
- Bromphenol blue
- Sodium dodecylsulfate (SDS)

2) Catalyst

- Ammonium persulfate
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine)

3) ชุดโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

2.4 การหาปริมาณโปรตีน (AOAC. 1990)

1) สารละลายโพแทสเซียมไดโครเมต

1.1 เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 325 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส

1.2 เติม $K_2Cr_2O_7$ (33.768 กรัม)

1.3 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2) สารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต

2.1 ละลาย $FeSO_4(NH_4)_2 SO_4.6H_2O$ 135.5 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2.2 เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 30 มิลลิลิตร

2.3 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) สารละลาย 1, 10- ฟีแนนโทรลีนเฟอร์รัสซัลเฟต

3.1 ละลาย $FeSO_4.7H_2O$ 0.695 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

3.2 เติม O- phenanthroline H_2O 1.485 กรัม

3.3 ปรับปริมาตรให้เป็น100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.5 การย้อมสีเพื่อวิเคราะห์ Alcohol Dehydrogenase (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539)

Staining solution: - Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมล พีเอช 7.0 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมล ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เอทธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร NAD เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร PMS เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร NBT เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ MTT เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร

2.6 น้ำยา Destain (พิณทิพย์ รื่นวงษา. 2538)

กรดอะซิติกร้อยละ 10 เอทานอลร้อยละ 25 น้ำกลั่นร้อยละ 65

2.7 สารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (Okamura *et al.* 2000)

2.7.1 สารละลาย Control Solution

-Control Solution สำหรับ 1 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Deionize H_2O	600	ไมโครลิตร
1.0M Tris-HCl pH 8.8	250	ไมโครลิตร
4.0mM NAD^+	100	ไมโครลิตร

-Stock Control Solution สำหรับ 50 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Deionize H_2O	30	มิลลิลิตร
1.0M Tris-HCl pH 8.8	12.5	มิลลิลิตร
4.0mM NAD^+	5	มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย Stock Control Solution

เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 47 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์เล็ก ชั่ง Tris-Base 1.51425 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ชั่ง NAD^+ 0.013268 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ปรับพีเอช 8.8 ด้วยกรด HCl เข้มข้น เก็บใส่ขวดสีชาและแช่ตู้เย็น

2.7.2 สารละลาย Sample Solution

-Sample Solution สำหรับ 1 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Deionize H_2O	500	ไมโครลิตร
1.0 M Tris-HCl pH 8.8	250	ไมโครลิตร
4.0 mM NAD^+	100	ไมโครลิตร
1.0 M Ethanol	100	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-Stock Sample Solution สำหรับ 50 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Deionize H_2O	25	มิลลิลิตร
1.0M Tris-HCl pH 8.8	12.5	มิลลิลิตร
4.0mM NAD^+	5	มิลลิลิตร
1.0M Ethanol	5	มิลลิลิตร

2.7.3 การเตรียมสารละลาย Stock Sample Solution

เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 42 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์เล็ก ชั่ง Tris-Base 1.51425 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ชั่ง NAD^+ 0.013268 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ชั่งร้อยละ 99 Ethanol 0.23 กรัม ในกระบอกตวงเติมน้ำเป็น 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ปรับพีเอช 8.8 ด้วยกรด HCl เข้มข้น เก็บใส่ขวดสีชาและแช่ตู้เย็น

2.8 สูตรสำหรับ PAGE revolving gel (10 ml.) (พิณทิพย์ รื่นวงษา. 2538)

ส่วนประกอบ	7.5% gel		12% gel	
น้ำ	4.85	มิลลิลิตร	3.35	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร	0.1	มิลลิลิตร
Acrylamide/bis (30% T, 2.7% C)	2.5	มิลลิลิตร	4	มิลลิลิตร
* 10% Ammonium Persulfaaate	50	ไมโครลิตร	51	ไมโครลิตร
TEMED	51	ไมโครลิตร	52	ไมโครลิตร

**เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

1. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ (Okamura *et al.* 2001)

โดยแสดงในรูปกิจกรรมของเอนไซม์ต่อปริมาตรของสารสกัดเซลล์เห็ด (Volume Activity) ซึ่งสามารถคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{Volume Activity (Unit/ml)} = \frac{V \times (\text{change in absorbance per minute})}{e \times d \times v}$$

เมื่อ V = ปริมาตรทั้งหมดของสารในคิวเวต (มิลลิลิตร)

v = ปริมาตรของสารสกัดเซลล์ในคิวเวต (มิลลิลิตร)

e = Extinction coefficient ของ $NADH^+$ (ลิตร/มิลลิโมล/เซนติเมตร)

d = ระยะทางที่แสงผ่านคิวเวต (เซนติเมตร)

จากการทดลอง

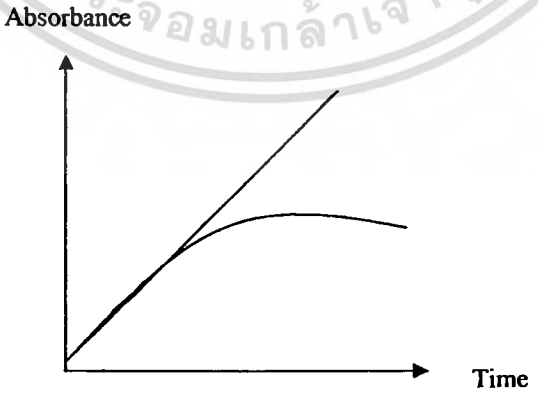
V = 1 มิลลิลิตร

v = 0.05 มิลลิลิตร

e = 6.22 ลิตร/มิลลิโมล/เซนติเมตร

d = 1 เซนติเมตร

โดยการวาดกราฟของค่าการดูดกลืนแสงต่อเวลา จะสามารถวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้จากการหาความชันของเส้นตรงเริ่มต้นที่สัมผัสกราฟ เรียกค่าที่ได้นี้ว่า "change in absorbance per minute"



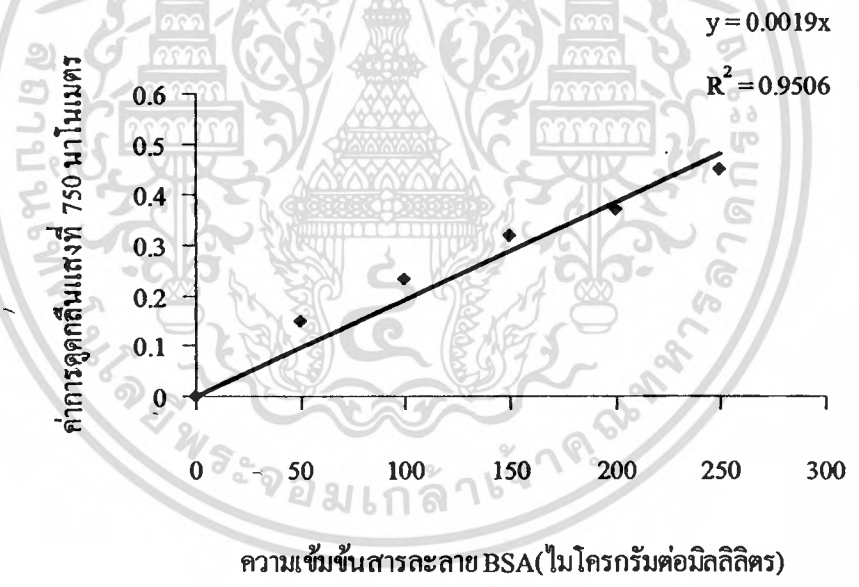
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Extinction coefficient เป็นลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของสารประกอบ ซึ่งจะช่วยบอกลักษณะทางกายภาพของสารประกอบซึ่งจะมีค่าคงที่ที่ความยาวคลื่นจำเพาะ Extinction coefficient อาจเรียกได้อีกอย่างว่า Molar Absorptivity ค่า Extinction coefficient ของ $NADH^+$ ที่ 340 นาโนเมตร คือ $6.22 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$

1.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี

เติมสารละลายเอทานอล 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร สารละลาย NAD^+ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และสารละลาย Tris - HCl 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรลงในไมโครคิวเวตต์ จากนั้นเติมเซลล์สกัดลงไปให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเห็ดแต่ละชนิดที่ 340 นาโนเมตร เนื่องจากสารละลาย NAD^+ ไม่ดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นคือปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นจากปฏิกริยา

ทำกราฟมาตรฐานสารละลาย NADH โดยใช้สารละลาย NADH ความเข้มข้น 100 200 300 400 500 600 700 800 900 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนเซลล์สกัด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลาย NADH



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานสารละลาย NADH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำค่าการดูดกลืนแสงของเห็ดแต่ละชนิดไปหาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย NADH จากนั้นนำปริมาณ NADH ที่ได้ไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากสูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์} = \frac{\text{ปริมาณ NADH x ความเจือจาง}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของ NADH x นาที x ปริมาณเซลล์สกัด}}$$

โดย 1 หน่วย (1 unit) กิจกรรมของเอนไซม์ หมายถึงจำนวนการเร่งการเกิดปฏิกิริยาของ NADP 1ไมโครโมลต่อนาที

2 การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟเรซิส (ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543)

1) Stock solution

- 30% T, 2.7% C Acrylamide (29.2 g Acrylamide และ 0.8 กรัม Bisacrylamide ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากเตรียม)
- 1.5 M Tris-HCl พีเอช 8.8 (Concentrated resolving gel buffer)
- 0.5 M Tris-HCl พีเอช 6.8 (Concentrated stacking gel buffer)
- 10 % (w/v) Sodium dodecylsulfate (SDS)
- Stock sample buffer (0.06 M Tris-HCl , พีเอช 6.8, 10% Glyceral, 0.025% Bromphenol blue)

  เตรียมโดยผสมสารต่างๆ ในอัตราส่วนดังนี้

น้ำ	4.8	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl พีเอช 6.8	1.2	มิลลิลิตร
10% SDS	2.0	มิลลิลิตร
Glyceral	1.0	มิลลิลิตร
0.5% Bromphenol blue (W/V)	0.5	มิลลิลิตร

- SDS reducing buffer เตรียมโดยใส่ 50 ไมโครลิตร ของ 2- mercaptoethanol ใน 0.95 มิลลิลิตร ของ Stock sample buffer ก่อนที่จะใช้

2) Catalyst

- 10% Ammonium persulfate (APS) เตรียมก่อนที่จะใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine) ใช้ TEMED โดยตรงโดยไม่ต้องทำให้เจือจางก่อน

3) Electrode buffer

Electrode buffer ประกอบด้วย

0.0025 M Tris	0.3	กรัม
0.192 M Glycine	1.4	กรัม
10% (w/v) SDS	1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
พีเอช 8.3		

2.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อทำอิเลคโตรโฟรีซิส

2.1.1 เตรียม SDS- reducing buffer ตามปริมาณที่ต้องการใช้ โดยใช้ 50 ไมโครลิตร ของ 2-mercaptoethanol ต่อ 0.95 มิลลิลิตร ของ Stock buffer

2.1.2 ผสมสารตัวอย่างกับ Sample buffer ในอัตราส่วน 1:4 (ปกติปริมาตรของ Sample ที่จะใส่ในเจลคือ 20-50 ไมโครลิตร) ต้มสารละลายที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ก่อนนำไปใส่ในช่องบนเจล

2.1.3 นำส่วนใสมา 30 มิลลิลิตร ต่อการทำอิเล็คโทรโฟรีซิส 1 ตัวอย่าง โดยผสมสารตัวอย่างกับสารละลาย sample buffer (0.06 M Tris-HCl พีเอช 6.8 กลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 10 Bromphenol blue เข้มข้นร้อยละ 0.025) ก่อนใส่ในช่องตัวอย่างบนเจล

2.2 การเตรียม polyacrylamide gel แบบ vertical slab gel

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล

2. ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นๆ โดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75 - 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใช้โดยใส่ stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1.0-2.0 เซนติเมตร หรือเหนือ seperating gel

3. เตรียมสารละลาย seperating gel ดังนี้คือ เติมสารละลาย acrylamide-bis 2.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 4.85 มิลลิลิตร และ seperating gel buffer 2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

4. เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 70 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร วนขวดให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่มีฟองอากาศ

5. เทสารละลายของเจลลงบนช่องว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ให้เหลือระยะห่างจากขอบบน 2-3 เซนติเมตร จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งให้แข็งตัว ใช้เวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประมาณ 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งจะเห็นเป็นรอยต่อระหว่างเจลกับสารละลายที่คลุมผิวหน้า เทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทิ้ง

6. เตรียมสารละลายของ stacking gel โดยเติมสาร acrylamide-bis 2.6 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 12.2 มิลลิลิตร และ stacking gel buffer 5.0 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7. เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต(ที่เตรียมใหม่) 100 ไมโครลิตร และ TEMED 12.2 ไมโครลิตร วนขวดให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่มีฟองอากาศ เทสารละลายของ stacking gel บน seperating gel ใส่หวี (template comb) ลงใน stacking gel ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

2.3 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล ประกอบชุดแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นโดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75 – 1 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใส่โดยใส่ Stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร เหนือ Separating gel เตรียมสารละลาย Separating gel โดยเติมสารละลาย Acrylamide-bis 2.5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 4.85 มิลลิลิตร และ Separating gel buffer 2.5 มิลลิลิตร เติม SDS เข้มข้นร้อยละ 10 (W/V) 100 ไมโครลิตร ลงในบีกเกอร์ เติม Ammonium persulfate เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร วนบีกเกอร์เบาๆให้สารละลายผสมกันเท Separating gel ระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ให้ห่างจากขอบบน 2 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทับผิวหน้าเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งเทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทิ้ง เตรียมสารละลาย Stacking gel โดยเติมสาร Acrylamide-bis 2.6 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 12.2 มิลลิลิตร และ Stacking gel buffer 5 มิลลิลิตร เติม SDS เข้มข้นร้อยละ 10 (W/V) 100 ไมโครลิตร ลงในบีกเกอร์ เติม Ammonium persulfate เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ TEMED 12.5 ไมโครลิตร วนบีกเกอร์ให้สารละลายผสมกัน เทสารละลาย Stacking gel เททับบน Separating gel พร้อมกับใส่หวีลงใน Stacking gel ทิ้งไว้จนแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปประกอบกับชุดอิเล็คโทรโฟรีซีส ใส่ Electrode buffer 300 มิลลิลิตรที่มี SDS เข้มข้นร้อยละ 10

นำสารสกัดเซลล์เห็ด 10 ไมโครลิตร ต่อการทำอิเล็คโทรโฟรรีซีส 1 ตัวอย่าง ผสมสารสกัดเซลล์เห็ดกับ Sample buffer 5 ไมโครลิตรที่มี SDS เข้มข้นร้อยละ 10 (W/V) ก่อนใส่ในช่องบนเจล นำไปหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ภาคผนวก ก)ให้มีปริมาณโปรตีนในช่วง 50-100 ไมโครกรัมต่อช่อง ถ้ามีปริมาณโปรตีนมากเกินไปให้เพิ่มปริมาณ Sample buffer ต่อปริมาณสารสกัดเซลล์เห็ด นำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที หยอดตัวอย่างลงบนเจลแต่ละช่องๆ ละ 1 ตัวอย่าง จำนวน 15 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย ผ่านกระแสไฟฟ้า 70 มิลลิแอมแปร โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่งโมง รอจนตัวอย่างเคลื่อนที่มาจนห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้าแล้วนำตัวอย่างออกจากอิเล็คโทรโฟรรีซีส วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye เติมสีย้อมโปรตีน (ภาคผนวก ก) ให้ท่วมเจลตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เมื่อเกิดแถบสีน้ำเงินแล้ว เทสีย้อมทิ้งแล้วเติมสารละลาย Destrain ให้ท่วมเจลเพื่อล้างสีที่ส่วนเกินออก ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วเท Destrain ออก ทำซ้ำอีก 2 ครั้งโดยครั้งสุดท้ายไม่ต้องเท Destrain ออก ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงเท Destrain ทิ้งแล้วเติม Glycerol เข้มข้นร้อยละ 10 แช่ไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำกระดาษแก้วแช่ใน Glycerol เข้มข้นร้อยละ 10 นาน 10 นาที นำเจลมาห่อด้วยกระดาษแก้ว รีดเอาฟองอากาศออกให้หมด ขึงไว้กับกระจกให้ตึงโดยใช้คริปหนีบขอบไว้ ทิ้งไว้จนเจลแห้ง

3. **การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์** (A.O.A.C. 1990)

$$(\text{ร้อยละโดยปริมาตร}) = 25.00 - (25 \times v/v')$$

โดย v = มิลลิลิตร ของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำปฏิกิริยาพอดีกับสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง

v' = มิลลิลิตร ของสารละลายเฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตกับแบลงก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนวก ค

ข้อมูล

ตารางที่ ค-1 แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ (เปอร์เซ็นต์) ที่วัดได้หลักจากการหมักไวน์ด้วยเส้นใยเห็ด เป็นเวลา 30 วัน

ชนิดเห็ด	ปริมาณเส้นใย (เพลตเลท)	ระยะเวลา (วัน)					
		5	10	15	20	25	30
นางรม	5	2.650	2.680	2.690	2.720	3.010	3.020
	10	2.960	3.200	3.210	3.280	3.290	3.310
	15	3.370	3.550	3.550	3.590	3.620	3.650
หลินจือ	5	0.510	0.610	0.660	0.750	0.770	0.810
	10	0.820	0.950	0.970	1.020	1.090	1.170
	15	1.530	1.640	1.690	1.730	1.780	1.830
นางฟ้า	5	0.310	0.430	0.440	0.500	0.540	0.560
	10	0.820	1.120	1.210	1.270	1.290	1.310
	15	1.630	1.730	1.790	1.830	1.860	1.900
ตีนแรด	5	1.530	1.640	1.660	1.700	1.740	1.790
	10	1.830	1.900	1.930	1.980	2.010	2.060
	15	2.240	2.340	2.390	2.420	2.450	2.490

ตารางที่ ค-2 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเห็ดชนิดต่างๆ ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/ml)

ชนิด/อายุ	5 วัน	8 วัน	11 วัน	14 วัน	17 วัน	21 วัน
นางฟ้า	0.0057	0.0114	0.0113	0.0108	0.0054	0.0087
ตีนแรด	0.0043	0.0095	0.0158	0.0164	0.0107	0.0104
นางรม	0.0086	0.0134	0.0178	0.0213	0.0226	0.0204
หลินจือ	0.0066	0.0082	0.0092	0.0158	0.0194	0.0218

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 แสดงปริมาณการดูดกลืนแสงของเส้นใยเห็ดเพื่อหาปริมาณสารพอลิแซคคาไรด์ ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

ชนิดเห็ด	ปริมาณเส้นใย (pellet)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร
ชุดควบคุม	0	3.548
หลินจือ	5	3.723
	10	3.757
	15	3.923
นางรม	5	3.559
	10	3.673
	15	3.675
ตีนแรด	5	3.695
	10	3.705
	15	3.904
นางฟ้า	5	3.681
	10	3.718
	15	3.799

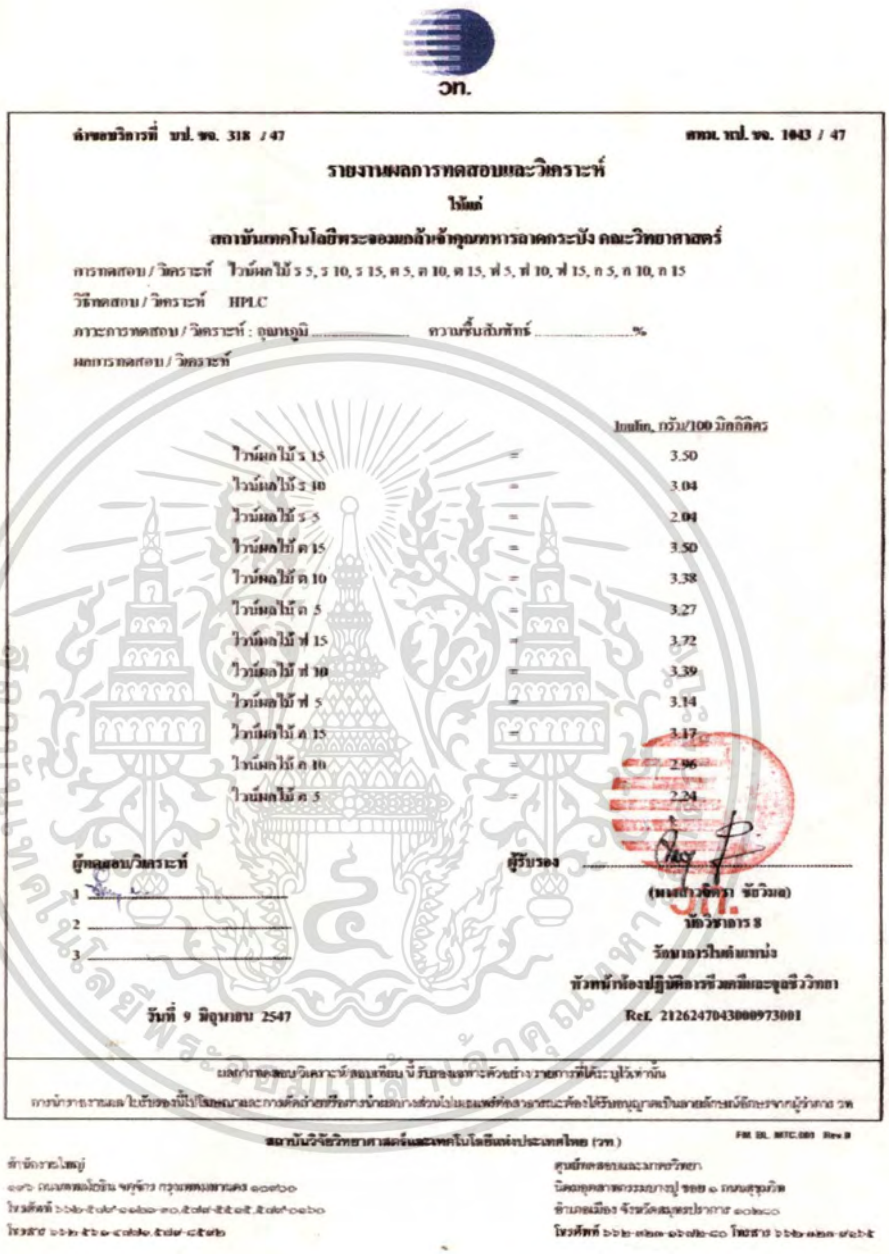
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 แสดงปริมาณสารอินูลินในน้ำไวน์ที่ได้จากการใช้เส้นใยเห็ดในการหมักหลังจากผ่านไป 30 วัน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ชนิดเห็ด	ปริมาณเส้นใย(pellet)	ปริมาณสารอินูลิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
หลินจือ	5	22.4
	10	29.6
	15	31.7
นางรม	5	20.4
	10	30.4
	15	35.0
ตีนแรด	5	32.7
	10	33.8
	15	35.0
นางฟ้า	5	31.4
	10	33.9
	15	37.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-5 แสดงรายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์ปริมาณอินูลินจากศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



ส่งของวิเคราะห์ที่ ขป. จจ. 318 / 47 ศทม. ขป. จจ. 1043 / 47

รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์

ให้แก่

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิทยาศาสตร์

การทดสอบ / วิเคราะห์ ไวน์ผลไม้ ร 5, ร 10, ร 15, ค 5, ค 10, ค 15, ฟ 5, ฟ 10, ฟ 15, ก 5, ก 10, ก 15

วิธีทดสอบ / วิเคราะห์ HPLC

ภาวะการทดสอบ / วิเคราะห์ : อุณหภูมิ ..... ความชื้นสัมพัทธ์ .....%

ผลการทดสอบ / วิเคราะห์

		Inulin, กรัม/100 มิลลิลิตร
ไวน์ผลไม้ ร 15	=	3.50
ไวน์ผลไม้ ร 10	=	3.04
ไวน์ผลไม้ ร 5	=	2.91
ไวน์ผลไม้ ค 15	=	3.50
ไวน์ผลไม้ ค 10	=	3.38
ไวน์ผลไม้ ค 5	=	3.27
ไวน์ผลไม้ ฟ 15	=	3.72
ไวน์ผลไม้ ฟ 10	=	3.39
ไวน์ผลไม้ ฟ 5	=	3.14
ไวน์ผลไม้ ก 15	=	3.17
ไวน์ผลไม้ ก 10	=	2.96
ไวน์ผลไม้ ก 5	=	2.24

ผู้ทดสอบ/วิเคราะห์

1 .....

2 .....

3 .....

วันที่ 9 มิถุนายน 2547

ผู้รับรอง .....

(นางสาวจิตรา ชัยวัฒน)

นักวิชาการ 8

รักษาการในตำแหน่ง

หัวหน้าห้องปฏิบัติการชีวเทคนิคและจุลชีววิทยา

Ref. 2126247043000973001

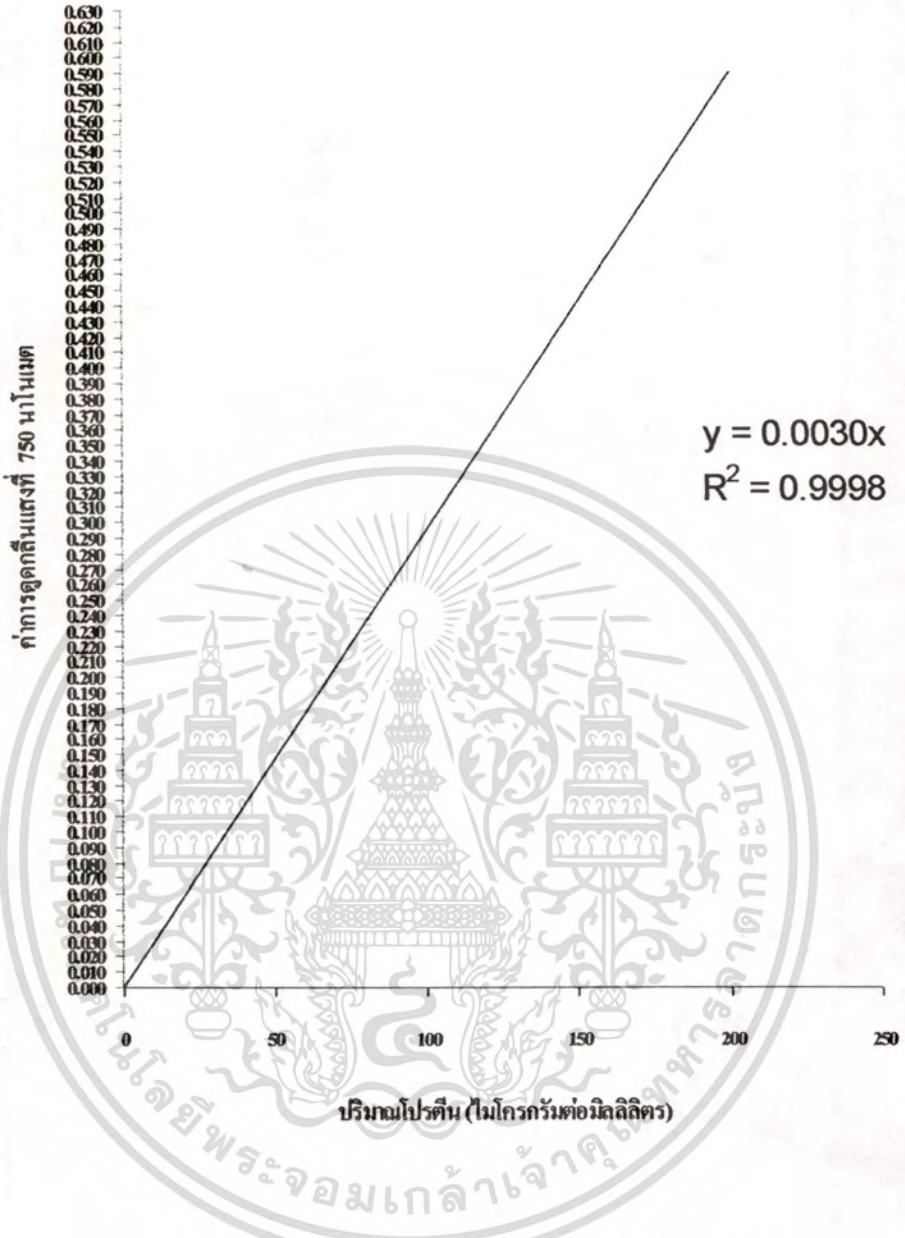
ผลการทดสอบวิเคราะห์ สอบเทียบ นี้รับรองเฉพาะตัวอย่างรายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น

การนำรายงานผลไปเรียงพิมพ์โฆษณาและการคัดลอกรายงานบางส่วนไปและแพร่หลายสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้บังคับการ วท

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) FM. BL. MTC.003 Rev.9

ที่ทำการไปรษณีย์ ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมีน (BSA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-6 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดนางฟ้า

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.6984	0.6993	0.7002	0.7008	0.7012	0.7032	0.7021	0.7023	0.7030	0.7028	0.7020
8 วัน	0.8012	0.803	0.8047	0.8055	0.8079	0.8089	0.8098	0.8090	0.8101	0.8093	0.8098
11 วัน	0.5809	0.5827	0.5844	0.5854	0.5875	0.5881	0.5875	0.5891	0.5888	0.5889	0.5888
14 วัน	0.6663	0.668	0.6697	0.6707	0.6729	0.6745	0.6741	0.6747	0.6752	0.6744	0.6744
17 วัน	0.8520	0.8529	0.8537	0.8539	0.8547	0.8559	0.8567	0.8566	0.8552	0.8569	0.8549
21 วัน	0.8973	0.8987	0.9000	0.9005	0.9017	0.9031	0.9026	0.9041	0.9039	0.9039	0.9038

ตารางที่ ค-7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดตีนแรด

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.7318	0.7325	0.7331	0.7330	0.7339	0.7343	0.7339	0.7351	0.7358	0.7355	0.7347
8 วัน	0.6784	0.6799	0.6814	0.6825	0.6842	0.6857	0.6845	0.6855	0.6845	0.6856	0.6865
11 วัน	0.6611	0.6636	0.6660	0.6677	0.6704	0.6714	0.6715	0.6719	0.6706	0.6728	0.6717
14 วัน	0.5476	0.5502	0.5527	0.5550	0.5576	0.5597	0.5592	0.5593	0.5589	0.5601	0.5590
17 วัน	0.6933	0.6950	0.6966	0.6981	0.6992	0.7016	0.6995	0.7001	0.7015	0.6999	0.7014
21 วัน	0.7600	0.7616	0.7632	0.7647	0.7657	0.7662	0.7667	0.7678	0.7669	0.7658	0.7666

ตารางที่ ค-8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดนางรม

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.7320	0.7334	0.7347	0.7355	0.7372	0.7380	0.7393	0.7386	0.7394	0.7396	0.7397
8 วัน	0.7640	0.7661	0.7682	0.7701	0.7717	0.7728	0.7734	0.7741	0.7732	0.7741	0.7734
11 วัน	0.5373	0.5401	0.5428	0.5451	0.5480	0.5487	0.5488	0.5493	0.5497	0.5495	0.5484
14 วัน	0.8363	0.8396	0.8429	0.8453	0.8494	0.8504	0.8511	0.8510	0.8518	0.8495	0.8496
17 วัน	0.8551	0.8586	0.8621	0.8646	0.8681	0.8697	0.8685	0.8695	0.8695	0.8683	0.8699
21 วัน	0.5907	0.5939	0.5970	0.5993	0.6027	0.6042	0.6050	0.6032	0.6043	0.6037	0.6041

ตารางที่ ค-9 แสดงค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์ADH ของสารสกัดเซลล์เห็ดหลินจือ

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.8872	0.8883	0.8893	0.8897	0.8909	0.8927	0.8934	0.8933	0.8916	0.8918	0.8919
8 วัน	0.7592	0.7605	0.7618	0.7621	0.7635	0.7650	0.7637	0.7637	0.7650	0.7655	0.7636
11 วัน	0.5002	0.5017	0.5031	0.5042	0.5054	0.5074	0.5077	0.5075	0.5056	0.5064	0.5071
14 วัน	0.6991	0.7016	0.7040	0.7056	0.7081	0.7095	0.7098	0.7091	0.7094	0.7097	0.7105
17 วัน	0.7312	0.7342	0.7372	0.7398	0.7428	0.7446	0.7442	0.7449	0.7428	0.7445	0.7445
21 วัน	0.6885	0.6919	0.6953	0.6978	0.7011	0.7033	0.7032	0.7018	0.7035	0.7015	0.7018

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายวัฒนา อัจฉริยะโพธา
วัน เดือน ปีเกิด	31 ตุลาคม 2519 ที่จังหวัดราชบุรี
ที่อยู่	72/56 ม. 3 ซอยแจ้งวัฒนะ 5 ถนนแจ้งวัฒนะ แขวงทุ่งสองห้อง เขตหลักสี่ กรุงเทพ 10210 โทร 0-2984-8411
ประวัติการศึกษา	2540 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	
พ.ศ. 2541-2544	ตำแหน่งอาจารย์พิเศษสอน ที่วิทยาลัยบริหารธุรกิจและการท่องเที่ยว กรุงเทพ
พ.ศ. 2544-2546	ตำแหน่งอาจารย์พิเศษรายชั่วโมง ที่วิทยาลัยบริหารธุรกิจและการท่องเที่ยวกรุงเทพ
พ.ศ. 2546-2547	ตำแหน่งอาจารย์ผู้ช่วยสอน ที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้