สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์เอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ในเห็ดกินได้บางชนิดในวงศ์ Tricholomataceae เพื่อผลิตไวน์ทดแทนการใช้เชื้อยีสต์

T058550

นางสาว จิริยา แต้งแก้ว
นางสาว ปริยานุช ทองภู่
นางสาว อมรรัตน์ พันธุ์สุผล

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58550
วัน,เดือน,ปี 25 ส.ค. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of Alcohol Dehydrogenase from Some Edible mushroom in Family Tricholomataceae on Wine Production for Substitution of Using Yeasts

Miss Jariya Tangkaeo
Miss Preeyanuch Thongpoo
Miss A-monrat Phansuphon

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2003

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง	การวิเคราะห์เอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ในเห็ดกินได้บางชนิดในวงศ์ Tricholomataceaeเพื่อผลิตไวน์ทดแทนการใช้เชื้อยีสต์
นักศึกษา	นางสาว จริยา แตงแก้ว
	นางสาว ปรียานุช ทองภู่
	นางสาว อมรรัตน์ พันธุ์สุผล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ดร. พรรณี สิตาภิชิต	.....
กรรมการ	รศ. สุขใจ ชูจันทร์	.....
กรรมการ	ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	.....

.....

(ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง การวิเคราะห์เอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ในเห็ดกินได้บางชนิดในวงศ์Tricholomataceaeเพื่อผลิตไวน์ทดแทนการใช้เชื้อยีสต์

นักศึกษา นางสาว จริยา แตงแก้ว
นางสาว ปรียานุช ทองภู่
นางสาว อมรรัตน์ พันธุ์สุผล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2546

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

ได้มีการศึกษาพบว่ามีเห็ดบางชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แล้วนำเห็ดเหล่านั้นมาทำการหมักไวน์ทดแทนการใช้เชื้อยีสต์ ซึ่งในการทดลองได้ใช้เห็ด 5 ชนิด คือ เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer) เห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus abalonus* Hon et al. Sp) เห็ดภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju*(Fr.)Sing.) และเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) พบว่าเห็ดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ADH สูงที่สุด คือ เห็ดแครง รองลงมาคือ เห็ดนางรม เห็ดภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดตีนแรด ตามลำดับ ซึ่งค่ากิจกรรมที่วัดได้คือ 4.84,2.53,2.41,2.03 และ 1.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis พบว่าเห็ดแครงเกิดแถบสีเข้มที่สุด รองลงมาคือ เห็ดภูฐาน เห็ดนางรม และเห็ดเป๋าฮื้อตามลำดับ ส่วนเห็ดตีนแรดนั้นไม่เกิดแถบ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในเห็ดแต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Determination of Alcohol Dehydrogenase from Some Edible mushroom in Family Tricholomataceae on Wine Production for Substitution of Using Yeasts
Name	Miss Jariya Tangkaeo
	Miss Preeyanuch Thongpoo
	Miss A-monrat Phansuphon
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2003
Special Project Advisor	Assoc.Prof. Sukjai Chujan

ABSTRACT

In a recent report,Tokumitsu found that some mushrooms were able to produce enzyme Alcohol Dehydrogenase (ADH) and they used the mushrooms on wine production instead of using yeasts. In this study we used five mushrooms to study ADH. The mushrooms that we used were *Pleurotus ostreatus* (Fr.)Kummer,*Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc, *Pleurotus abalonus* Hon et al. Sp, *Pleurotus Sajor-caju*(Fr.)Sing and *Schizophyllum commune* . We found that *Schizophyllum commune* had the highest activity of enzyme ADH while *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer, *Pleurotus Sajor-caju*(Fr.) Sing, *Pleurotus abalonus* Hon et al. Sp and *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc, respectively, had the activity of 4.84,2.53,2.41,2.03 and 1.19 unit/ml respectively. When determination of ADH by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) was performed,it was found that the bands of *Schizophyllum commune* were darkest while *Pleurotus Sajor-caju*(Fr.)Sing, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Pleurotus abalonus* Hon et al. Sp had paler color bands,respectively. These results agreed with the activity of enzyme ADH in each mushroom.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีอุปการคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการโครงงานพิเศษที่กรุณาอย่างยิ่งในการให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัยตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์ ประธานกรรมการและกรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทดลองและช่วยอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ซึ่งทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จได้ด้วยดี

จริยา แตงแก้ว
ปรียานุช ทองภู่
อมรรัตน์ พันธุ์สุผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ชีววิทยาของเห็ด	4
2.2 วงจรชีวิตของเห็ด	8
2.3 ส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด	9
2.4 คุณค่าทางอาหารของเห็ด	12
2.5 การจำแนกประเภทเห็ด	13
2.6 การใช้ประโยชน์ของเห็ด	13
2.7 คุณสมบัติทางยาของเห็ด	15
2.8 วิทยาศาสตร์ของเห็ด	17
2.9 การเพาะเห็ดตีนแรด	19
2.10 การเพาะเห็ดนางรม	21
2.11 เห็ดนางฟ้าภูฐาน	24
2.12 เห็ดเป๋าฮื้อ	27
2.13 เห็ดตีนตุ๊กแกหรือเห็ดแครง	31
2.14 เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.15 นิโคตินาไมด์ (nicotinammide) หรือไนอาซินาไมด์ (niacinamide) 33
2.16 อิเลคโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (Polyacrylamide Gel Electrophoresis , PAGE) 35
2.17 อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ SDS–พอลิอะคริลาไมด์เจล (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis , SDS-PAGE) 42
2.18 การย้อมสีเจล 44
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 47
3.1 เตรียมเส้นใยของตัวอย่างเห็ดสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 48
3.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี 48
3.3 ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค Electrophoresis แบบ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 49
3.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry 50
3.5 หามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ LMW marker kit เป็น marker 51
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 55
4.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี 55
4.2 ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค Electrophoresis แบบ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 58
4.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry 60
4.4 หามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ LMW marker kit เป็น marker 62
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 64
5.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี 64
5.2 ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค Electrophoresis แบบpolyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 64
5.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และหามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธี SDS-PAGE ใช้ LMW marker kit 65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก ก วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทำ PAGE

ภาคผนวก ข สารเคมี ในการทำ SDS-PAGE

ภาคผนวก ค การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและสรรพคุณของเห็ดที่ใช้เป็นยาสมุนไพร	14
2	การเตรียม SDS-PAGE Slab Gel	51
3	กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดภูฐาน	56
4	กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดตีนแรด	56
5	กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดเป๋าอื้อ	57
6	กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดนางรม	57
7	กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดแครง	57
8	ปริมาณโปรตีนของเห็ดแต่ละชนิด	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	เส้นใยที่มีผนังกั้น	5
2	เส้นในที่ไม่มีผนังกั้น	5
3	ส่วนประกอบต่างๆ ของดอกเห็ด	10
4	ลายพิมพ์สปอร์ของดอกเห็ด	11
5	แบบจำลองบริเวณเร่งของเอนไซม์ ADH	32
6	แบบจำลองโครงสร้างของ NAD^+	33
7	โครงสร้างของกรดนิโคตินิก (ไนอาซิน) และนิโคตินาไมด์	34
8	นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์(NAD^+) และ นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต($NADP^+$)	34
9	สแล้บเจลในแนวนอน	39
10	สแล้บเจลในแนวตั้ง	40
11	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมกับเอนไซม์ ADH	46
12	กราฟมาตรฐานสารละลาย NADH	55
13	แถบสีที่เกิดจากการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในครั้งที่ 1	58
14	แถบสีที่เกิดจากการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในครั้งที่ 2	59
15	แถบสีที่เกิดจากการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในครั้งที่ 3	60
16	กราฟมาตรฐานสารละลาย BSA	61
17	แถบสีที่เกิดจากการทำ (SDS - PAGE) ในครั้งที่ 1	62
18	แถบสีที่เกิดจากการทำ (SDS - PAGE) ในครั้งที่ 2	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ปัจจุบันคนส่วนใหญ่หันมาดูแลสุขภาพกันมากขึ้นซึ่งทางหนึ่งที่ทำได้ก็คือ การดื่มเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ไวน์ก็จัดเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพอย่างหนึ่งซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เชื้อยีสต์เป็นจุลินทรีย์ในการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ และสายพันธุ์ยีสต์ที่นิยมใช้คือสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

เห็ดก็เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่ม Fungi เช่นเดียวกับยีสต์ แต่เห็ดมีคุณสมบัติพิเศษต่างไปจากยีสต์หลายประการ คือ

จากการศึกษาพบว่ามีเห็ดบางชนิดที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เพื่อใช้ในการเปลี่ยนอะซีตอลดีไฮด์ (acetaldehyde) ไปเป็นเอทธานอล (ethanol) เช่น เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม) *Agaricus blasie* (เห็ดเข็มทอง) นอกจากนี้เห็ดยังมีคุณสมบัติเป็นยาสมุนไพรได้ด้วย ได้แก่ เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostrealus* (เห็ดนางรม) และ *Agaricus blasie* (เห็ดเข็มทอง) มีส่วนช่วยให้การจับตัวของเลือดช้าลงทำให้ไม่เกิดการอุดตันของเส้นเลือด และยังสามารถสลายลิ่มเลือดได้อีกด้วย นอกจากนี้เห็ดนางรมยังมีคุณสมบัติช่วยต่อต้านมะเร็ง และลดไขมันในเลือด เห็ดสายพันธุ์ *Schizophyllum commune* (เห็ดแครง) มีคุณสมบัติแก้อ่อนเพลีย รักษาโรคสตรี เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus abalonus* (เห็ดเป๋าฮื้อ) มีคุณสมบัติช่วยต่อต้านมะเร็ง และลดความดันโลหิต เห็ดสายพันธุ์ *Tricholoma crassum* (เห็ดตีนแรด) มีคุณสมบัติยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ในหนูทดลอง

จากคุณสมบัติของเห็ดที่กล่าวมานี้จึงเป็นเหตุจูงใจให้ทำการศึกษาเพื่อหาว่าเห็ดชนิดใดบ้างที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เพื่อนำเห็ดชนิดนั้นมาทำการหมักไวน์ทดแทนเชื้อยีสต์ ซึ่งผู้บริโภคไวน์นอกจากจะได้ประโยชน์จากการดื่มไวน์คือ ใช้ดื่มแก้หนาวเพราะแอลกอฮอล์ดูดซึมได้เร็วและให้พลังงานทันที ใช้ดื่มก่อนอาหารเพื่อเป็นตัวกระตุ้นหรือเรียกน้ำย่อยและช่วยให้สารอาหารอื่นถูกดูดซึมได้ง่าย ใช้ผสมลงในอาหารก่อนหรือหลังปรุงอาหารเสร็จ ใช้ดื่มคู่กับอาหารซึ่งเป็นประเพณีของชาวยุโรป เช่นดื่มไวน์แดงกับอาหารพวกเนื้อวัวหรือหมู และไวน์ขาวกับปลา ใช้ไวน์บำบัดความเจ็บปวดเล็กๆ น้อยๆ ใช้เป็นยาระงับความตื่นเต้น กังวล ช่วยให้เส้นเลือดขยายตัวในคนไข้ที่เป็นความดันต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยให้ขับถ่ายปัสสาวะสะดวกแล้วยังทำให้ผู้บริโภคไวน์ได้ประโยชน์ในลักษณะเป็นเครื่องดื่มบำรุงสุขภาพอีกด้วย

โดยปกติคนส่วนใหญ่นิยมบริโภคเห็ดในลักษณะที่เป็นดอกเห็ดทั้งแบบสดและแบบที่แปรรูปแล้ว แต่จากการศึกษาพบว่า ส่วนที่มีกิจกรรมทางเภสัชศาสตร์และมีการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสสูงคือส่วนที่เป็นไมซีเลียมของเห็ด ดังนั้นไวน์ที่ผลิตจากไมซีเลียมของเห็ดจึงน่าจะเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่มีประโยชน์มากกว่าการบริโภคเฉพาะส่วนที่เป็นดอกเห็ด นอกเหนือจากนั้นยังเป็นแนวทางพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์ให้ออกมาในรูปแบบเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพอีกทางหนึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของเห็ดและเป็นแนวทางขยายตลาดไปสู่ผู้บริโภคให้มากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาและตรวจวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ในเห็ดที่กินได้วงศ์ Tricholomataceae

1.2.2 ศึกษาว่าเห็ดชนิดใดมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสสูงที่สุด และสูงที่สุดในวันที่เท่าใดของการเพาะเลี้ยงเส้นใย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ศึกษาและตรวจวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ในเห็ดที่กินได้วงศ์ Tricholomataceae จำนวน 5 ชนิด คือ เห็ดนางรม เห็ดภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดแครง และเห็ดตีนแรด

1.3.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ในเห็ดแต่ละชนิดโดยวิธีทางเคมีและตรวจสอบเอนไซม์โดยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

1.3.3 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเห็ดแต่ละชนิด แล้วนำเห็ดเหล่านั้นไปหามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค SDS – PAGE

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

1.4.1 เตรียมเส้นใยของตัวอย่างเห็ดสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

1.4.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในเห็ดแต่ละชนิดโดยวิธีทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3 ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยเทคนิค Electrophoresis แบบ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

1.4.4 หาปริมาณโปรตีนในเห็ดแต่ละชนิดและหามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยวิธี SDS-PAGE ใช้ LMW marker kit เป็น marker

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบว่าเห็ดชนิดใดบ้างที่มีการสร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

1.5.2 ทราบว่าเห็ดชนิดใดมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสสูง เพื่อนำเห็ดชนิดนั้นไปใช้ทดแทนเชื้อยีสต์ในการผลิตไวน์ต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ชีววิทยาของเห็ด

2.1.1 การจำแนกประเภทของฟังไจ(Classification)

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

(1) **การจำแนกฟังไจ โดยอาศัยลักษณะการดำรงชีวิต**

จากการที่พวกฟังไจไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงสังเคราะห์แสงไม่ได้ การเจริญเติบโตของฟังไจพวกนี้จึงจำเป็นต้องใช้อาหารจากสารอินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นสิ่งที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิตก็ได้ จากลักษณะการดำรงชีพดังกล่าวจึงได้มีการจำแนกฟังไจออกเป็น 3 ประเภท คือ

1.1 พวกปรสิต (Parasite) ฟังไจพวกนี้มีการดำรงชีวิตโดยอาศัยอาหารจากสิ่งที่มีชีวิต ฟังไจพวกนี้ส่วนใหญ่เป็นฟังไจที่ทำให้เกิดโรคแก่ พืช มนุษย์ และสัตว์

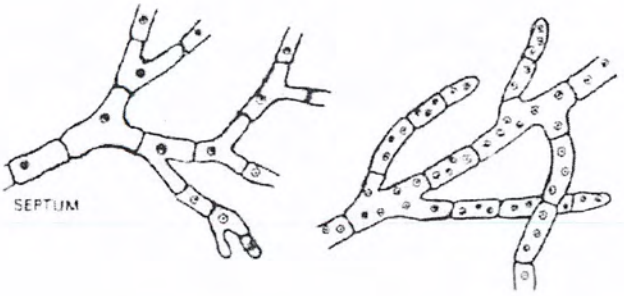
1.2 พวกพาราสิตตามโอกาส (Facutative Parasite) ฟังไจพวกนี้สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนสิ่งมีชีวิต หรือสิ่งที่ตายแล้ว และใช้อินทรียวัตถุจากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว ได้แก่ เห็ดหลายชนิด

1.3 พวกซาโปรบ

(2) **การจำแนกฟังไจ โดยอาศัยลักษณะการสืบพันธุ์**

ตามปกติแล้วฟังไจจัดเป็นสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจจะมีเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ก็ได้ ถ้าเซลล์พวกนี้มีหลายเซลล์ต่อกันเป็นเส้นใย เรียกว่า ไฮฟา (Hypha) ลักษณะของเส้นใย อาจมีผนังกั้นเป็นช่องๆ หรืออาจจะเป็นท่อนยาวตลอดก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดและวิวัฒนาการของฟังไจชนิดนั้นๆ เส้นใยที่ไม่มีผนังกั้นเรียกว่า อเซพติกไฮฟา (Aseptate hypha) ดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 เส้นใยของฟังไจ ถ้าอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า ไมซีเลียม (Mycelium) เส้นใยที่มีการพัฒนามากๆ ลักษณะของเส้นใยจะแข็งแรงมีผนังหนา เส้นใยบางชนิดจะมีข้อยึดระหว่างเซลล์ที่เรียกว่า แคลมคอนเนคชั่น (Clamp connection)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 เส้นใยที่มีผนังกั้น

รูปที่ 2 เส้นในที่ไม่มีผนังกั้น

การขยายพันธุ์ของฟังไจแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

(1) **การขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศ** (Asexual reproduction) เป็นการขยายพันธุ์แบบใช้เส้นใยหรือเนื้อเยื่อของเห็ด มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) คือ

1.1 Chlamydospore เป็นสปอร์ที่มีผนังหนา ซึ่งภายในจะมีการสะสมอาหารจึงทำให้สามารถพักตัวอยู่ได้นาน และมีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้เป็นอย่างดี

1.2 Conidiospore หรือ conidia เป็นสปอร์ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม และเกิดจากเซลล์ที่เรียกว่า sterigma

1.3 Blastospore มีการขยายพันธุ์คล้ายกับเซลล์ของยีสต์ หน่อที่แตกออกมา เรียกว่า Blastospore

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 Sporangiospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากการที่ปลายเส้นใยพองตัวออกคล้ายกระเปาะ ภายในกระเปาะจะมีผนังหนา และผนังกั้นเกิดขึ้นจากนั้นก็จะเจริญไปเป็นอับสปอร์(Sporangium) เมื่ออับสปอร์แตกสปอร์ที่อยู่ภายใน (Sporangiospore) ก็จะแพร่กระจาย ถ้าปลิวไปตกในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยออกมา

(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

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

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

(3) การจำแนกเชื้อรา โดยอาศัยรูปร่างและการวิวัฒนาการ แบ่งออกเป็น 5 ชั้น (class) คือ

3.1 คลาสไมโซไมซิติส (Class Myxomycetes) เชื้อราพวกนี้อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ราเมือก (slime mold) จัดเป็นเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายกับโปรโตซัว ภายในราเมือกจะมีหลายนิวเคลียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 คลาสไฟโคไมซิติส (Class Phycomycetete) เชื้อราพวกนี้ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เชื้อราชั้นต่ำ (lower fungi) จัดเป็นเชื้อราที่มีวิวัฒนาการต่ำสุด ส่วนมากจะเจริญเติบโตอยู่ในน้ำ เรียกว่า water mold

3.3 คลาสแอสโคมัยซิส (Class Ascomycetes) เชื้อราพวกนี้ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Sac fungi ซึ่งจัดเป็นเชื้อราที่มีวิวัฒนาการมากกว่าสองพวกแรก เชื้อราพวกนี้ที่จัดว่าเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ ได้แก่ พวกเชื้อยีสต์ และเชื้อราในสกุล Aspergillus และ Penicilium

3.4 คลาสเบซิดิโอไมซิติส (Class Basidiomycetetes) เชื้อราพวกนี้ อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Club fungi ซึ่งจัดเป็นเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ และมีวิวัฒนาการมากกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ เส้นใยเห็ดมีการแตกแขนงมากมาย และมีการดูดซึมนำอาหารไปใช้ในการเจริญเติบโต เชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่พวกเห็ดนั่นเอง ซึ่งจัดว่าเป็นอาหารที่มีปริมาณของโปรตีนสูง เห็ดพวกนี้เกิดจากการรวมตัวของเส้นใย ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 subclass คือ

3.4.1. Subclass Heterobasidiomycetidae - เชื้อราพวกนี้เป็นเชื้อราที่มีขนาดใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับเห็ด 2 order คือ

(1) *Order Tremellales* จัดเป็นเชื้อราที่มีการดำรงชีวิตแบบอิสระ เบซิเดียมมีผนังกั้นตามยาวแบ่งออกเป็น 4 เซลล์ แต่ละเซลล์จะสร้างก้านชู ได้แก่ พวกเห็ดหูหนูขาว

(2) *Order Auriculariales* เชื้อราพวกนี้เบซิเดียมจะมีผนังกั้นตามขวางและแบ่งเบซิเดียมออกเป็น 4 เซลล์ ได้แก่ พวกเห็ดหูหนูชนิดต่างๆ

3.4.2 Subclass Homobasidiomycetidae เชื้อราพวกนี้เป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นเชื้อราขนาดใหญ่และมีการสร้างดอกเห็ด (Fruiting body) ซึ่งสามารถนำมารับประทานเป็นอาหารได้ เชื้อราพวกนี้เบซิเดียมเป็นกระบอง ไม่มีผนังกั้น เห็ดที่อยู่ใน subclass นี้มีอยู่ 2 ซีรีส์

(1) *Series Hymenomycetes* เชื้อราพวกนี้มี 2 order คือ

- Order Polyporales เห็ดพวกนี้ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่ ครีบดอกมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายรังผึ้ง สร้างดอกเห็ดเรียงกันเป็นชั้นๆ ได้แก่ เห็ดหิ้ง

- Order Agaricales เห็ดพวกนี้จะมีการสร้างเบซิเดียมที่บริเวณครีบของดอก ดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายร่ม ได้แก่ เห็ดในตระกูล *Amanitaceae* , *Tricholomataceae* เช่น เห็ดตีนแรด เห็ดเป๋าฮื้อ

(2) *Series Gasteromycetes* เห็ดพวกนี้มักพบในช่วงฤดูฝน ดอกเห็ดมีลักษณะค่อนข้างกลม และไม่มีครีบดอก ได้แก่ เห็ดเผาะ เห็ดหัวเข่า เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 คลาสดิวเทอโรไมซีติส (Class Deuteromycetes) เชื้อราพวกนี้อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Imperfect fungi ลักษณะของเส้นใยเป็นแบบที่มีผนังกั้น การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยมีการสร้างคอนนิเดีย (conidia) เพียงอย่างเดียว การดำรงชีวิตมีทั้งแบบย่อยสลายและแบบปรสิต

2.2 วงจรชีวิตของเห็ด

วงจรชีวิตของเห็ดจะมีลักษณะคล้ายกันโดยจะหมุนเวียนเริ่มจากเบซิดิโอสปอร์ (Basidiospore) เมื่อปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสม สปอร์ก็จะงอกเส้นใยออกมา และเส้นใยพวกนี้จะรวมตัวกันและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด จากนั้นก็จะมีการสร้างสปอร์ หมุนเวียนกันไปเรื่อยๆ วงจรชีวิตของเห็ดแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แต่ตามปกติจะมีระยะการเจริญเติบโต 9 ระยะ คือ

2.2.1 เมื่อเห็ดเจริญเติบโตที่จะมีการสร้างเบซิดิโอสปอร์ บริเวณเบซิเดียมซึ่งอยู่ใต้ครีบดอกสปอร์พวกนี้เป็นพวก haploid เมื่อสปอร์ปลิวไปตกบริเวณที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใย (mycelium) ออกมา

2.2.2 เส้นใยที่งอกออกมานี้ เรียกว่า เส้นใยขั้นที่หนึ่ง (Primary mycelium) ซึ่งมีโครโมโซมเป็น haploid (n) จึงเรียกว่า homokaryotic mycelium

2.2.3 เส้นใยขั้นที่หนึ่งจะรวมตัวกันเป็นเส้นใยขั้นที่สอง เรียกระยะนี้ว่า Plasmogamy ซึ่งระยะที่เส้นใยขั้นที่หนึ่งของเห็ดเชื่อมต่อกัน และไซโตพลาสซึมของทั้งสองฝ่ายมารวมเข้าด้วยกัน ทำให้นิวเคลียสทั้ง 2 อันมารวมอยู่ในเซลล์เดียวกัน จากนั้นก็มีการพัฒนาไปเป็นเส้นใยขั้นที่สอง (secondary mycelium) การรวมตัวของเส้นใยขั้นที่หนึ่ง แบ่งออกได้เป็น 2 กรณี คือ

(1) Homothallic เป็นลักษณะการรวมตัวของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดียวกัน แล้วเจริญไปเป็นเส้นใยขั้นที่สอง โดยไม่ต้องเกิดการรวมตัวของเส้นใยขั้นที่หนึ่งที่งอกจากสปอร์อื่นๆ ลักษณะการรวมตัวของเส้นใยขั้นที่สอง โดยไม่ต้องเกิดการรวมตัวของเส้นใยขั้นที่หนึ่งที่งอกจากสปอร์อื่นลักษณะการรวมตัวของเส้นใยที่งอกจากสปอร์ของตัวเองนี้เรียกว่า มีวงจรชีวิตแบบ Homothallic Life Cycle

(2) Heterothallic เห็ดบางชนิดจะเจริญเติบโตเป็นดอกได้จะต้องผ่านการรวมตัวกันระหว่างเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกันจึงจะพัฒนาไปเป็นเส้นใยขั้นที่สองและสามารถรวมตัวกันเป็นดอกเห็ดได้จึงเรียกเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบนี้ว่า Heterothallic Life Cycle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 Karyogamy เป็นระยะที่นิวเคลียสสองอันรวมตัวกัน ถ้าเป็นเชื้อราชั้นต่ำจะเกิดอย่างรวดเร็วแต่ถ้าเป็นเชื้อราชั้นสูง ระยะการรวมตัวกันจะต้องใช้เวลาพอสมควร จึงทำให้เห็นว่าภายในเซลล์มี 2 นิวเคลียส (Binucleus) ซึ่งระยะนี้ว่า Dikaryon เส้นใยขั้นที่สองจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เส้นใยขั้นที่สองแต่ละเซลล์จะมีข้อยึดระหว่างเซลล์ เรียกว่า Clamp connection เส้นใยขั้นที่สองนี้ สามารถขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างแคลมไมโดสปอร์ (Clamydospore) หรือสร้างออยเดียม (Oidium)

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

2.2.6 ดอกเห็ดในระยะนี้ มีการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่มีรูปร่างคล้ายร่มและมีการสร้างเบซิเดียมคล้ายรูปทรงกระบอก ในแต่ละเบซิเดียม จะมีนิวเคลียสอยู่สองอัน (Binucleus)

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

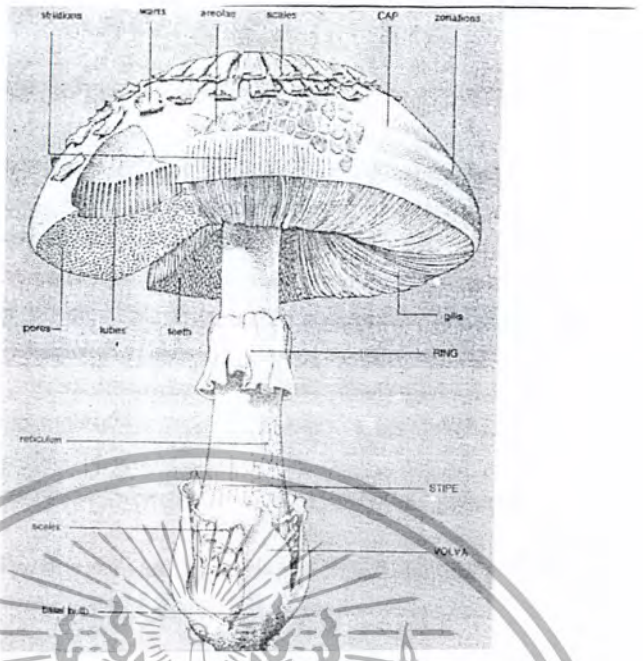
2.2.8 นิวเคลียสที่รวมตัวกัน (diploid nucleus) จะมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ลดจำนวนโครโมโซมเป็น hapliod (n) จำนวน 4 อัน

2.2.9 เบซิเดียมจะมีการสร้างก้านชูสปอร์ (Sterigma) 4 อัน และนิวเคลียสทั้ง 4 อัน จะเคลื่อนที่สู่ปลาย sterigma นิวเคลียสทั้ง 4 อัน จะพัฒนาไปเป็นเบซิดิโอสปอร์ (Basidiospore)

2.3 ส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด

เห็ดที่เจริญเติบโตบนพื้นโลก ส่วนใหญ่มีมากมายหลายชนิด บางชนิดมีสรรพคุณทางยารักษาโรค บางชนิดนำมารับประทานเป็นอาหาร และบางชนิดเป็นเห็ดพิษ ดอกเห็ดพวกนี้มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน แต่โดยทั่วๆ ไป เห็ดจะประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 ส่วนประกอบต่างๆ ของดอกเห็ด

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

2.3.2 ครีบดอก (Gills) หมายถึงส่วนที่อยู่ด้านล่างหรือส่วนที่อยู่ใต้หมวกดอกมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ เรียงติดกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก และแผ่ขยายออกไปยังหมวกดอก ครีบดอกของเห็ดบางชนิดจะยึดติดแน่นกับก้านดอก แต่บางชนิดจะเกาะกันแบบหลวมๆ บริเวณของครีบจะเป็นแหล่งกำเนิดสปอร์ เห็ดบางชนิดครีบดอกมีรูปร่างลักษณะเป็นรูพรุน (pores) บางชนิดอาจมีลักษณะเป็นฟันเลื่อย (teeth) ความหนาของครีบดอกแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน

2.3.3 ก้านดอก (Stalk หรือ Stipe) ก้านของดอกเห็ดแต่ละชนิดจะมีลักษณะแตกต่างกันทั้งทางด้านขนาดและความยาว ตามปกติก้านของดอกเห็ดจะมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก แต่บริเวณโคนก้านดอกจะใหญ่ และค่อยๆ เรียวเล็กไปยังส่วนปลาย ส่วนบนของก้านดอกจะติดอยู่กับหมวกดอกหรือครีบดอก ถ้าก้านดอกยึดบริเวณกลางก้านดอกพอควรเรียกก้านดอกใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะนี้ว่า Central Stalk แต่ถ้าก้านดอกยึดติดกับหมวกดอกโย้ไปด้านใดด้านหนึ่ง โดยไม่ได้ยึดกับตรงกลางดอก เรียกก้านดอกในลักษณะนี้ว่า Excetric Stalk ส่วนเนื้อภายในก้านดอกจะมีลักษณะเป็นเส้นใยสานกันอยู่อย่างหลวมๆ คล้ายฟองน้ำหรือแน่นทึบก็ได้ขึ้นกับชนิดของเห็ด

2.3.4 สปอร์ของเห็ดเป็นแบบเบซิดิโอสปอร์ (Basidiospore) สปอร์พวกนี้จะถูกสร้างขึ้นบริเวณครีบดอก สปอร์ของดอกเห็ดมีขนาดเล็กมากไม่มีสี แต่ถ้าสปอร์เหล่านี้รวมกันเป็นกลุ่มก้อนจะมีสีคล้ายกับสีของครีบดอก สปอร์ของดอกเห็ดแต่ละชนิด จะมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของเห็ด ถ้านำหมวกดอกของเห็ดมาวางบนกระดาษบริเวณที่อับลม สปอร์ของเห็ดจะตกลงบนแผ่นกระดาษเป็นกลุ่ม มีลักษณะแผ่ขยายไปตามเส้นขอบครีบดอก ดังแสดงในรูปที่ 4

รูปที่ 4 ลายพิมพ์สปอร์ของดอกเห็ด

2.3.5 วงแหวน (Ring) วงแหวนของเห็ดมีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อบางๆ ยึดติดอยู่กับก้านดอกโดยอยู่รอบก้านดอก เมื่อหมวกดอกกางออกเนื้อเยื่อที่ยึดติดก้านดอกกับหมวกดอกจะขาดจากกัน และมีเศษเนื้อเยื่อบางส่วนยึดติดกับก้านดอกทำให้ดูคล้ายกับว่าบริเวณก้านดอกมีแผ่นเยื่อบางๆ สวมอยู่

2.3.6 ปลอกหุ้มโคน (Volva) เป็นส่วนที่อยู่ด้านล่างของโคนก้าน ดอกเห็ดแต่ละชนิดมีปลอกหุ้มโคนที่มีความหนาบางแตกต่างกัน ปลอกหุ้มโคนก็คือเนื้อเยื่อที่หุ้มดอกเห็ดไว้ในขณะที่ดอกเห็ดยังตูมอยู่เรียกเนื้อเยื่อพวกนี้ว่า outer veli เมื่อเห็ดเจริญเติบโตขึ้น ก็จะดันเนื้อเยื่อที่หุ้มออกมา และก้านดอกเห็ดก็จะชูหมวกดอกขึ้นไปในอากาศ ทิ้งส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อไว้ด้านล่างบริเวณโคนดอกเห็ด ลักษณะคล้ายถ้วยวางหงายรองรับดอกเห็ดอยู่ เห็ดที่มีปลอกหุ้มโคนได้แก่ เห็ดฟาง เห็ดตระกูลอะมานิต้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.7 กลุ่มเส้นใย (Mycelium) หมายถึง กลุ่มเส้นใยที่รวมตัวกันแน่น เห็ดบางชนิดจะมีกลุ่มเส้นใยรวมตัวกันแน่นที่บริเวณโคนก้านดอก กลุ่มเส้นใยพวกนี้มีลักษณะเป็นใยหยาบๆ แต่บางชนิดกลุ่มเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นใยละเอียด กลุ่มของเส้นใยดังกล่าวจะมีสีขาวเกาะยึดระหว่างโคนก้านดอกกับวัสดุที่เห็ดเจริญเติบโต

2.4 คุณค่าทางอาหารของเห็ด

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเห็ดหลายชนิดพบว่า เห็ดจัดเป็นอาหารที่มีปริมาณของโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชผัก นอกจากนี้เห็ดยังมีกรดอะมิโน (amino acid) เป็นส่วนประกอบมากกว่า 20 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน กรดอะมิโนเหล่านี้มีอยู่ 9 ชนิดที่มีความสำคัญต่อร่างกาย และร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสร้างขึ้นได้ ได้แก่ lysine, methionine, tryptophane,threonine,valine,leucine,isoleucine,cystine และ phenylalanine กรดอะมิโนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการสร้างโปรตีนในร่างกายมนุษย์ 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 และแคลเซียมต่ำ

ในปัจจุบัน อัตราการเพิ่มประชากรของโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้ความต้องการโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นเป็นเงาตามตัวไปด้วย อาหารโปรตีนดังกล่าวอาจได้มาจากพืชหรือสัตว์ก็ได้ แต่อาหารโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์มีราคาค่อนข้างแพงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารประเภทอื่น ๆ และคนส่วนใหญ่เชื่อว่าถ้าต้องการโปรตีนก็ต้องบริโภคเนื้อสัตว์ แต่ความจริงแล้วไม่จำเป็นต้องบริโภคเนื้อสัตว์เสมอไป เพราะมีอาหารหลายอย่างที่มีปริมาณโปรตีนสูงและสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ได้ โดยเฉพาะเห็ดซึ่งจัดว่ามีโปรตีนสูงและอาหารโปรตีนที่ได้จากเห็ดไม่มีสารพวกคลอเรสเตอรอลที่ทำให้เส้นเลือดอุดตัน และเห็ดยังมีราคาถูกกว่าเนื้อสัตว์มาก นอกจากนี้สถาบัน The Institute of Muscle Research รัฐ Massachusetts ประทศสหรัฐอเมริกายังรายงานว่ามีเห็ดหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยารักษาโรคสามารถที่จะบำบัดโรคมะเร็งอย่างได้ผล ชาวจีนเชื่อว่าถ้ารับประทานเห็ดหอมและเห็นหูหนูขาวเป็นประจำจะช่วยป้องกันการสะสมไขมันในเส้นเลือด โรคความดัน และเห็ดพวกนี้ยังมีสารที่ต่อต้านเนื้องอกได้ ประกอบกับในปี พ.ศ. 2530 กรมวิชาการได้เชิญนายแพทย์ผู้เชี่ยวชาญจากประเทศญี่ปุ่น มารายงานการทดลองรักษาคนไข้ที่เป็นโรคมะเร็งโดยใช้เห็ดหลินจือ(เห็ดหมื่นปี) พบว่าเห็ดชนิดนี้สามารถที่จะรักษาผู้ที่เป็นโรคมะเร็งได้ จึงทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประชาชนหันมาสนใจเห็ดและนิยมรับประทานเห็ดกันมากขึ้น เห็ดยังจัดว่าเป็นอาหารที่เหมาะสำหรับผู้ที่นิยมรับประทานมังสะวิรัติ ตลอดจนผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจ โรคตับ โรคความดัน ฯลฯ (ปัญญา,2532)

2.5 การจำแนกประเภทเห็ด

เราอาจแบ่งเห็ดได้ 2 กลุ่มใหญ่ตามการนำไปใช้ คือ

(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 นอกจากนี้เห็ดสมุนไพรยังได้จากเห็ดพิษบางชนิดด้วย เช่นเห็ดร่างแห เห็ด *Amanita phalloudes* และเห็ดอื่น ๆ ที่ยังไม่มีการวิจัยและพัฒนาอีกหลายชนิด

2.6 การใช้ประโยชน์ของเห็ด

2.6.1 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในอดีต

ในอดีตมีการใช้เห็ดเป็นสมุนไพรมีมานานมากกว่า 4000 ปีแล้วในประเทศจีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน และเกาหลี ตัวอย่างเห็ดสมุนไพรที่ใช้ เช่น เห็ดหอม เห็ดหลินจือ ไมตาเกะ คอร์ดีเซฟ และเห็ดอื่น ๆ เห็ดสมุนไพรที่ใช้กันมานานและแพร่หลายมากที่สุดในประเทศจีนและญี่ปุ่น คือ เห็ดหลินจือ ซึ่งต่อมาประมาณปี ค.ศ. 1960 ได้ขยายตลาดไปยังยุโรปและอเมริกา เห็ดสมุนไพรบางชนิดใช้เป็นอาหารด้วย เช่น เห็ดหอม

ในประเทศไทยแพทย์พื้นบ้านใช้เห็ดงูเห่าซึ่งขึ้นตามเชิงป่าเขา เห็ดไม้แดง เห็ดไม้รั้ว และเห็ดกระถินพิมาน ซึ่งขึ้นตามตอไม้ที่ผุแล้วมาผสมเป็นยากิน เช่น ยาจักรวาลฟ้าครอบกินแก้ไข้กาฬทั้งปวง หรือทาภายนอกแก้ไฟลามทุ่ง ทำให้น้ำเหลืองแห้งได้ดี นอกจากนั้นยังมีการนำเห็ดร่างแหมาผสมกับตัวยาอื่นเพื่อใช้เป็นยารักษาแผล รวมทั้งใช้เห็ดตากแห้งมาผสมกับของเมาอย่างอื่นและจันทร์หอมทำเป็นธูป หรือทำเป็นยาชุดจุดไฟเอาควันรมเข้าห้องทำให้ผู้ถูกควันมึนเมาและหลับหมดสติไป นอกจาหนี้ยังมีสมุนไพรอื่น ๆ อีก ดังตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ชนิดและสรรพคุณของเห็ดที่ใช้เป็นยาสมุนไพร

ชื่อ	สรรพคุณ
เห็ดขิง	แก้หวัด ปวดตามข้อ
เห็ดแครง	แก้อ่อนเพลีย รักษาโรคสตรี
เห็ดฆ้องเขาเขียว	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 และไมตรี (2546)

2.6.2 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในปัจจุบัน

ในด้านโภชนาการเห็ดถือว่าเป็นอาหารที่ดี เห็ดสดมีองค์ประกอบคือ ความชื้นร้อยละ 90 โปรตีนประมาณร้อยละ 3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์มีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ครบ คือมีดรรชนีกรดอะมิโนจำเป็นเท่ากับร้อยละ 72-98 ของเนื้อสัตว์ และมีกรดนิวคลีอิกค่อนข้างสูง มีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 3-28 เส้นใยร้อยละ 3-32 และให้พลังงานน้อยเพียง 60-90 แคลอรีต่อปอนด์ น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในเห็ดมีหลายชนิดความหวานของเห็ดเนื่องจากน้ำตาลพิเศษ เช่น trehalose เรียกเฉพาะว่าเป็นน้ำตาลเห็ด น้ำตาลนี้จะพบมากในเห็ดอ่อน เมื่อเห็ดโตเต็มที่น้ำตาล trehalose นี้จะถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคสที่มีความหวานลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

2.6.3 การใช้ประโยชน์ของเห็ดในอนาคต

เป็นที่น่าสังเกตว่าเห็ดมีปริมาณกรดนิวคลีอิกต่อหน่วย 100 กรัม(กรัมร้อยละ)สูงมากรองจากยีสต์ 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 แล้วนำไปเติมในนมและอาหารเด็กเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันในเด็กได้

นอกจากนี้ยังมีเห็ดบางชนิดที่มีสารชีวภาพพิเศษมากพอที่จะนำมาวิจัยและพัฒนาใช้เป็นยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ เช่น เห็ดขมิ้นซึ่งมีสารโปรวิตามินเอ หรือเบต้าแคโรทีนสูงถึง 54.94 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับผักใบเขียว มะละกอสุก และแครอท ถือว่าเห็ดขมิ้นมีเบต้าแคโรทีนสูงมาก อาจใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพได้ดีเช่นเดียวกับผักและผลไม้ ดังนั้นควรมีการวิจัยระดับพื้นฐานในทุก ๆ ด้าน และมีการพัฒนาเห็ดสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ในประเทศให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ดีมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เพื่อเพิ่มมูลค่าของเห็ดให้มากขึ้นต่อไป (ศิริวรรณ และไมตรี 2546)

2.7 คุณสมบัติทางยาของเห็ด

มีการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีววิทยาของเห็ดสมุนไพรหลายชนิด มีรายงานว่าเห็ดบางสายพันธุ์ประกอบด้วยสารซึ่งป้องกันหรือบรรเทาโรคมะเร็ง โรคหัวใจ และโรคที่เกิดจากการติดเชื้อจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัส ซึ่งโรคทั้ง 3 ชนิดนี้ทำอันตรายต่อมนุษย์มากที่สุด ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการศึกษาคุณค่าทางยาของเห็ดและเป็นการพัฒนาของอุตสาหกรรมเห็ด

2.7.1 การต่อต้านมะเร็ง

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

Ikekawa และคณะ (1969) ได้ทำการทดลองฉีดของเหลวสกัดของเห็ดกินได้ 7 ชนิด พบว่ามี 6 ชนิดที่ให้ผลยับยั้งการเจริญของเนื้องอกเมื่อทดสอบกับเซลล์ Sarcoma 180 ascites ในหนูได้สูง โดยยับยั้งได้ร้อยละ 72-92 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ได้ผลดังนี้ ใน *Lentinus edodes* ยับยั้งได้ร้อยละ 81 *Flammulina velutipes* ยับยั้งได้ร้อยละ 81 *Pleurotus ostreatus* ยับยั้งได้ร้อยละ 75 *P. spodoleucus* ยับยั้งได้ร้อยละ 72 *Pholiota nameko* ยับยั้งได้ร้อยละ 86 *Tricholoma maysutake* ยับยั้งได้ร้อยละ 92 และ *A. auricula-judae* ยับยั้งได้ร้อยละ 43

National cancer center ได้ศึกษาสารต้านทานเนื้องอกในเห็ด shitake แยกและทำให้บริสุทธิ์ นำมาทดสอบกิจกรรมการต้านทานเนื้องอก เรียกสารนั้นว่าเลนทิแนน (lentinan) ยับยั้งการเจริญของเซลล์ Sarcoma 180 ในหนู ซึ่งชักนำให้เกิดผลการเสื่อมถอยของเนื้องอกอย่างสมบูรณ์ เมื่อให้ในปริมาณ 10 โดส(dose) ของ1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และไม่มีผลข้างเคียง เลนทิแนนเป็นสาร β-(1-3)-glucan แลนทิแนนทำงานผ่านระบบภูมิคุ้มกันซึ่งตอบสนองโฮสท์ที่เป็นสัตว์โดยการชักนำของอินเทอเฟียรอน(interferon) ซึ่งเป็นสารโปรตีนชนิดหนึ่งจากเซลล์ที่ถูกเชื้อไวรัสรุกรานมีฤทธิ์ป้องกันการแพร่พันธุ์ของไวรัส

2.7.2 การลดไขมันในเลือด

เห็ดกินได้หลายชนิด เช่น เห็ดฟาง เห็ดหอม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม มีฤทธิ์ทางด้านนี้ ยกเว้น เห็ดหูหนูสายพันธุ์ที่มีขนและเห็ดเข็มทอง

สารสกัดจากพวกเห็ดเป๋าฮื้อทำให้ความดันโลหิตในหนูพุกขาวและหนูแฮมส์เตอร์ลดลง และสารสกัดหลายชนิดมีฤทธิ์ลดไขมันอาจเกิดโดยสารจำพวกเส้นใยที่มีปริมาณสูงในเห็ดช่วยดูดซับและขัดขวางการดูดซึมไขมันในทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังพบในหนูทดลองอีกว่าสารสกัดจากเห็ดบางชนิดช่วยเพิ่มการนำสารไขมันบางชนิดไปใช้

Tokuda (1971) พบว่าเมื่อให้อาหารหนูที่ประกอบด้วยเส้นใยเห็ด shitake ร้อยละ 5 เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ระดับคลอเลสเตอรอลของสัตว์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนั้นเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เข็มทองก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ได้มีการแยกสารที่มีคุณสมบัติลดระดับคลอเลสเตอรอลใน shitake และทำให้บริสุทธ์ พบว่าเป็นอนุพันธุ์อะดีโนซีน (adenosine derivative) เรียกว่า เลนตินาซิน (lentinacin) และเลนติซีน (lentysine)

2.7.3 การต่อต้านไวรัส

สารสกัดจากเห็ดหลายชนิดที่กินได้ เช่น เห็ดหอม เห็ดตับเต่า และเห็ดหัวก้าน ช่วยยับยั้งไวรัสที่ทำให้เกิดไข้หวัดใหญ่ทั้งในหนูทดลองและในหลอดทดลอง เห็ดหัวก้านมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสได้ ซึ่งอาจไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สร้างสารภูมิคุ้มกันชื่ออินเทอเฟียรอนก็ได้ ในปลายปี ค.ศ. 1992 พบว่าสารสกัดจากเห็ดไมตาเกะ (Grifola frondosa) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง เห็ดที่กินได้ส่วนมากพบสารซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านโรคหัดและโรคโปลิโอด้วย

Cochran และคณะ (1959) ได้ทดสอบสารสกัดจากพืชและเห็ดราหลายชนิดต่อผลการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ในหลอดทดลองและในหนู พบว่าสารสกัดจากแอปเปิ้ล ถั่วและผักขมไม่สามารถมีกิจกรรมการยับยั้งไวรัสได้ แต่ในเห็ด shitake พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ได้ และมีรายงานว่าของเหลวสกัดจากเห็ด shitake ยังมีผลป้องกันไวรัสโรคโปลิโอ

Chihara (1970) ได้รายงานว่า เลนทิแนนสามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อจากแบคทีเรีย รา และไวรัส โดยเฉพาะเชื้อ HIV เลนทิแนนสามารถลดความเป็นพิษของยา AZT ซึ่งเป็นยาสามัญที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคเอดส์

2.7.4 การต่อต้านจุลินทรีย์และพยาธิ

จากการที่นักวิทยาศาสตร์สามารถผลิตยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลลินจากเชื้อราได้ ทำให้นักวิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ต่อต้านจุลินทรีย์จากเห็ดทั้งชนิดที่กินได้และกินไม่ได้ พบว่าเห็ดหอมและเห็ดอีกหลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราและเห็ดบางชนิดมีฤทธิ์ฆ่าพยาธิแต่ฤทธิ์เหล่านี้ยังไม่เด่นชัด

2.7.5 การลดความดันโลหิต

จีนและญี่ปุ่นใช้เห็ดเป๋าฮื้อในการลดความดันโลหิตมานานแล้ว จากการศึกษาวิจัยยืนยันว่ามีสารออกฤทธิ์นี้ในเห็ดบางชนิด นอกจากนี้ยังพบสารที่ออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดในสารสกัดจากเห็ดหอม เห็ดหลินจือ และเห็ดไมตาเกะ (กาญจนา,2546)

2.8 วิทยาศาสตร์ของเห็ด

2.8.1 ความรู้เกี่ยวกับแหล่งอาหารของเห็ด

ตามปกติเห็ดมีความต้องการธาตุอาหารจากอินทรียวัตถุโดยผ่านขบวนการย่อยที่ค่อนข้างซับซ้อน จากการศึกษาพบว่า เห็ดมีความต้องการอาหารหลายชนิด แต่ละชนิดเห็ดใช้ในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
58550

(1) แหล่งอาหารคาร์บอน (carbon) ตามปกติเห็ดต้องการอาหารประเภทคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเกี่ยวกับการสร้างเซลล์ที่เป็นโครงสร้างของเห็ดและเป็นแหล่งให้พลังงานแก่เห็ด แหล่งอาหารประเภทคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลต่าง ๆ เช่น กลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และฟรุคโตส ซึ่งจัดเป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก แต่ในวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดมีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส จึงจำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่ปุ๋ยหมักย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เหล่านี้ให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งเห็ดจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้

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

(3) แหล่งอาหารประเภทธาตุอาหาร (Element) ในการเพาะเห็ดจำเป็นต้องเพิ่มธาตุอาหารหลัก (Major Element) เข้าไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงเห็ด เพื่อที่เห็ดจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ธาตุอาหารหลักได้แก่ แคลเซียม (Ca) ฟอสฟอรัส (P) โปแตสเซี่ยม (K) แมกนีเซี่ยม (Mg) และซัลเฟอร์ (S) แม้ว่าเห็ดจะต้องการธาตุอาหารหลักไม่มากนักก็ตาม แต่ธาตุอาหารเหล่านี้มีส่วนทำให้ขบวนการทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของเห็ดเป็นไปตามปกติ ดังนั้นปุ๋ยหมักที่ใช้ในการเพาะเห็ดจึงมีการใส่ยิปซั่ม ($CaSO_4$) ดีเกลือ ($Mg\ SO_4$) ปุ๋ยพวกฟอสฟอรัสและปุ๋ยพวกโพแตสเซี่ยม เพื่อที่เห็ดจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้อาหารพวกจุลธาตุ (Minor Element) ก็มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเห็ด ได้แก่ เหล็ก (Fe) สังกะสี (Zn) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) โมลิบดินัม (Mo) จุลธาตุเหล่านี้อาจอยู่ในรูปของสารละลายซึ่งเห็ดต้องการใช้ในบางระยะของการเจริญเติบโต

(4) แหล่งอาหารประเภทวิตามิน (Vitamin) จากการศึกษาบทบาทของวิตามินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด พบว่า พวกไบโอติน (Biotin) และไทอามีน (Thiamine) มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด

(5) แหล่งอาหารประเภทกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth Promoting Activity) จากการศึกษาสารที่มีผลต่อการกระตุ้นหรือเร่งการเจริญเติบโตของเห็ดมีหลายชนิด คือ Indole acetic acid (IAA) สารพวกเอสเทอร์ของกรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยังมีสารพวกกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ เฟนิลอลานีน (phenylalanine) เมไธโอนีน (methionone) และโปรลีน (proline)

2.9 การเพาะเห็ดตีนแรด

เห็ดตีนแรด หรือ เห็ดตับเต่าขาวจัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย เห็ดชนิดนี้สามารถนำมารับประทานเป็นอาหารได้ หมวกเห็ดมีขนาดใหญ่ เมื่อกางออกเต็มที่จะมีลักษณะคล้ายร่ม ผิวของหมวกดอกเรียบ ก้านดอกมีขนาดใหญ่ เห็ดชนิดนี้มีรสชาติดี เนื้อเหนียว ถ้านำมาเปรียบเทียบกับเห็ดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติแล้ว คุณภาพของเห็ดตีนแรดจะเป็นรองเฉพาะเห็ดโคนเท่านั้น ถ้านำเห็ดตีนแรดมาประกอบอาหารจะมีกลิ่นหอม รสหวาน เนื้อกรุบ กินอร่อย เห็ดชนิดนี้ในแต่ละท้องถิ่นมีชื่อเรียกแตกต่างกัน โดยภาคเหนือเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า เห็ดจั่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่า เห็ดตีนแรด(เพราะมีขนาดใหญ่) ส่วนภาคกลาง เรียกว่า เห็ดตับเต่าขาว เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีบนพื้นดินที่มีใบไม้ผุพังทับถมอยู่และในพื้นดินที่มีการระบายน้ำดี บริเวณทุ่งหญ้าหรือป่าโปร่งก็ได้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีต้นไม้ใหญ่ ๆ ถูกโค่นและทิ้งส่วนของรากไว้ในดิน เมื่อตอไม้เริ่มผุเห็ดตีนแรดก็จะเจริญเติบโตตามรากไม้ หรือตามพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุ หลังจากที่ฝนตกและมีสภาพความชื้นเหมาะสมเห็ดตีนแรดก็จะเจริญและสร้างดอกเห็ดโผล่พ้นพื้นดินขึ้นมาเป็นกลุ่ม ๆบางครั้งมีความสูงถึง 2 ฟุต

เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่น่าสนใจและน่าจะมีความสำคัญมากขึ้นในอนาคต เพราะเห็ดชนิดนี้มีขนาดใหญ่ และสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานโดยไม่เน่าเสีย แต่คุณภาพจะด้อยลงเล็กน้อย ประกอบกับเห็ดตีนแรดสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารแทบทุกชนิดคล้ายเห็ดในสกุลเห็ดนางรมจึงเหมาะที่จะนำมาเพาะในช่วงฤดูฝน เห็ดตีนแรดเป็นเห็ดที่มีเนื้อดอกดี กรุบ อร่อย และมีคุณสมบัติไม่ย่อยตัวเอง (autolysis) จึงทำให้เห็ดชนิดนี้จัดเป็นเห็ดที่น่าสนใจและน่าจะเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญในอนาคต ปัจจุบันได้มีฟาร์มเห็ดหลายแห่งได้ผลิตก้อนเชื้อเพื่อเก็บผลผลิตจำหน่ายทั้งในรูปของก้อนเชื้อและดอกเห็ด แต่เนื่องจากยังขาดการประชาสัมพันธ์ที่ดี จึงทำให้ประชาชนรู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่มากนัก ประกอบกับเห็ดชนิดนี้มีขนาดใหญ่มากจนทำให้ประชาชนที่ไม่รู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่กล้ารับประทาน แต่ถ้ามีการประชาสัมพันธ์ที่ดีแล้ว เห็ดตีนแรดน่าจะเป็นเห็ดที่สามารถเข้ามาทดแทนเห็ดชนิดอื่นได้อย่างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด

2.9.1.1 การจำแนกเห็ดตีนแรด (Taxonomy)

ชื่อวิทยาศาสตร์	:	*Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc
ชื่อสามัญ	:	เห็ดตีนแรด เห็ดจั่น เห็ดตับเต่าขาว
Class	:	Basidiomycetes
Subclass	:	Holobasidiomycetidae
Order	:	Agaricales
Family	:	Tricholomataceae
Genus	:	*Tricholoma*
Species	:	*crassum*

2.9.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดที่อยู่ใน genus *Tricholoma* เกือบทั้งหมดพบในเขตอบอุ่น มีเพียง 2-3 species เท่านั้นที่พบในเขตร้อน เห็ดพวกนี้ที่สามารถนำมารับประทานได้มีหลายชนิด ในเขตยุโรปได้แก่ *T. albobrunneum, T. flavovirens* ส่วนในเขตเอเชีย ได้แก่ *T. mutsutake,T. crassum* เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ลักษณะของดอกเห็ดประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

(1) หมวกดอก (cap) หมวกดอกของเห็ดตีนแรดในขณะที่ยังไม่บานเต็มที่มีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลมคว่ำ(convex) ขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน จากนั้นจะค่อย ๆ เจริญแผ่ขยายออก หมวกดอกเมื่อแผ่ขยายออกและเจริญเติบโตเต็มที่จะมีขนาดตั้งแต่ 3.1-12.5 เซนติเมตร ผิวหมวกด้านบนเรียบ สีขาว แต่เมื่อแก่จัดอาจเปลี่ยนเป็นสีครีมอ่อน หมวกดอกมีความหนา 1-3 เซนติเมตร เนื้อของหมวกดอกด้านในมีสีขาว

(2) ครีบดอก (gills) ครีบดอกของเห็ดตีนแรดมีจำนวนน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกดอก จำนวนครีบดอกถ้านับที่ขอบดอกจะมีประมาณ 20-25 ครีบต่อความยาว 1 เซนติเมตร ครีบดอกจะเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก ครีบดอกของเห็ดตีนแรดจะเปราะและขาดง่าย ส่วนใหญ่ครีบดอกมีลักษณะฟรี เป็นอิสระจากก้านดอก

(3) ก้านดอก (stalk) ก้านดอกของเห็ดตีนแรดมีสีขาว ปลายก้านด้านบนติดอยู่ที่ตรงกึ่งกลางของหมวกดอก ก้านดอกจะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีความยาวตั้งแต่ 7-24 เซนติเมตร ดอกเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีหมวกดอกใหญ่จะมีก้านดอกยาว ที่โคนก้านดอกจะใหญ่กว่าส่วนที่อยู่ติดกับหมวกดอกเล็กน้อย เมื่อดอกเห็ดแก่ เนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเนื้อหรือสีชมพูอ่อน และเนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะมีลักษณะยืดหยุ่นและสานกันโปร่ง ๆ ไม่เหนียวเหมือนกับเห็ดชนิดอื่น ที่บริเวณตรงกลางของก้านดอกเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเป็นเส้นและมีรูเล็ก ๆ คล้ายเห็ดฟาง

(4) สปอร์ (spore) เห็ดตีนแรดเมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างสปอร์ที่บริเวณครีบดอก สปอร์มีสีขาว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ขนาด 5-6.5 x 6.5-7.6 ไมโครเมตร

2.9.2 **ลักษณะการเจริญเติบโต**

การเจริญติบโตของเส้นใยจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดตีนแรดใสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ผลของการศึกษามีดังนี้

(1) อุณหภูมิ (temperature) จากการทดลองเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร P.D.A. ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า เส้นใยเห็ดตีนแรดเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็นระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเส้นใยเกือบไม่มีการเจริญเติบโตเลย

(2) ชนิดของอาหารวุ้น จากการทดลองเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ พบว่า เห็ดเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น P.D.A. และเส้นใยมีการเจริญหนาแน่นมาก ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 79 มิลลิเมตร ส่วนอาหารวุ้นที่ทำมาจากน้ำมะพร้าว (coconut milk agar) เส้นใยจะเจริญได้ดีจองลงมา มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 63.6 มิลลิเมตร

(3) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เส้นใยของเห็ดตีนแรดสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH 4-8 แต่ pH ที่เส้นใยเจริญได้เร็วที่สุด คือ pH 6 รองลงมาเป็น pH 5 และ pH 7

2.10 การเพาะเห็ดนางรม (Oyster Mushroom)

เห็ดนางรม(Oyster Mushroom) จัดเป็นเห็ดที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางถิ่นประเทศแถบยุโรป เห็ดพวกนี้เจริญเติบโตได้ดีในพวกไม้โอ๊ค(oak) ไม้เมเปิ้ล(maple) ไม้พีช(peach) ฯลฯ และสามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไปในเขตอบอุ่น ต่อมาได้มีการนำเข้ามาทดลองเพาะเลี้ยงในประเทศไทย พบว่าเห็ดชนิดนี้สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย จึงได้มีการเผยแพร่วิธีการเพาะเห็ดชนิดนี้จนเป็นที่รู้จักของประชาชนทั่ว ๆ ไป เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่ประชาชนนิยมรับประทานกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากเห็ดนางรมมีลักษณะคล้ายเห็ดมะม่วงหรือเห็ดขอนขาวที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติบนตอไม้ที่ผุพัง ประกอบกับเห็ดนางรมเป็นเห็ดที่มีสีขาวสะอาด มีคุณค่าทางอาหารสูง และมีรสชาติหอมหวานนอกจากนี้เนื้อของเห็ดนางรมยังไม่เหนียวมากเหมือนเห็ดมะม่วงหรือเห็ดขอนขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และที่สำคัญก็คือ เห็ดนางรมมีสารบางอย่างที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคไม่แพ้เห็ดชนิดอื่น ๆ จึงทำให้ประชาชนรู้จักเห็ดชนิดนี้เป็นอย่างดี

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเฉพาะโปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน ไม่แพ้เห็ดชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้เห็ดนางรมยังให้ปริมาณแร่ธาตุหลายชนิดเช่น แคลเซี่ยม ฟอสฟอรัส โพแทสเซี่ยม และยังให้พลังงานค่อนข้างสูง เห็ดนางรมมีวิตามินบี 1 วิตามินบี 1 สูงกว่าเห็ดชนิดอื่น ๆ และยังมีกรดโฟลิกสูงกว่าพืชผักและเนื้อสัตว์ กรดพวกนี้ช่วยป้องกันรักษาโรคโลหิตจางได้จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และยังเหมาะต่อผู้ที่ต้องการลดน้ำหนักเพราะเห็ดมีปริมาณของไขมันน้อยและมีปริมาณโซเดียมต่ำจึงเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ที่เป็นโรคหัวใจและโรคไตอักเสบ ประกอบกับเห็ดนางรมเป็นเห็ดที่เพาะง่าย สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย จึงได้มีการเพาะเห็ดชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายโดยทั่วไป

2.10.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม

2.10.1.1การจำแนกเห็ดนางรม (Taxonomy)

ชื่อวิทยาศาสตร์	:	*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer
ชื่อสามัญ	:	เห็ดนางรม Oyster Mushroom
Class	:	Basidiomycetes
Subclass	:	Holobasidiomycetidae
Order	:	Agaricales
Family	:	Tricholomataceae
Genus	:	*Pleurotus*
Species	:	*ostreatus*

2.10.1.2 ชนิดของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมที่เกษตรกรนิยมเพาะกันทั่วไปมี 2 ชนิด คือ

(1) เห็ดนางรมสีขาว (White type หรือ Florida type) จัดเป็นเห็ดนางรมที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิสูง จึงเหมาะที่จะนำมาเพาะในช่วงฤดูร้อน เห็ดชนิดนี้จะออกดอกได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส หมวกดอกมีสีขาว และมีน้ำหนักมากกว่าเห็ดนางรมสีเทาแต่หมวกดอกของเห็ดนางรมสีขาวจะมีขนาดเล็กและบางกว่าเห็ดนางรมสีเทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) เห็ดนางรมสีเทา (Gray type หรือ Winter type) เห็ดพวกนี้เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงเหมาะที่จะนำมาเพาะในช่วงฤดูหนาว โดยเห็ดจะออกดอกได้ดีที่ระดับอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส หมวกดอกหนาและมีขนาดใหญ่ แต่ผลผลิตจะต่ำกว่าเห็ดนางรมสีขาว

2.10.2 รูปร่างลักษณะของดอกเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีรูปคล้ายหอยนางรม จึงเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า Oyster mushroom ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

(1) หมวกดอก (cap หรือ pileus) หมวกดอกมีลักษณะคล้ายหอยนางรม หมวกดอกมีลักษณะแบนราบไม่เหมือนเห็ดฟาง กลางหมวกดอกมีลักษณะเว้าเป็นแอ่ง หมวกดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-15 เซนติเมตร หมวกดอกอาจมีสีขาวหรือสีเทาก็ได้ และลักษณะของหมวกดอกจะเป็นเนื้อเดียวกับก้านดอก

(2) ก้านดอก (stalk) เป็นส่วนที่ใช้ชูก้านดอกขึ้นไปในอากาศ ก้านดอกค่อนข้างสั้นและเจริญเข้าหาแสงสว่าง

(3) ครีบดอก (gills) มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ สีขาวหรือสีเทา ที่บริเวณครีบดอกเป็นแหล่งสร้างสปอร์ สปอร์ของเห็ดนางรมมีขนาด 8-12 ไมโครเมตร x 3-4 ไมโครเมตร

2.10.3 วงจรชีวิตของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบ Heterothallic ซึ่งเกิดจากดอกเห็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างเบซิดิโอสปอร์ (Basidiospore) เมื่อสปอร์พวกนี้ปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสมก็จะงอกเส้นใยขั้นที่หนึ่ง (Primary mycelium) ออกมา เส้นใยขั้นที่หนึ่งจะมีนิวเคลียสเพียงอันเดียว (haploid) จากนั้นเส้นใยขั้นที่หนึ่งที่เจริญมาจากสปอร์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกันจะรวมตัวกันแล้วพัฒนาไปเป็นเส้นใยขั้นที่สอง (Secondary mycelium) ซึ่งมีนิวเคลียส 2 อัน เส้นใยขั้นที่สองนี้อาจจะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Dikaryotic mycelium เส้นใยขั้นที่สองจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและในแต่ละเซลล์จะมีข้อยึดระหว่างเซลล์ (Clamp connection) ถ้าเส้นใยขั้นที่สองจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน พร้อมที่จะสร้างดอก เรียกเส้นใยในระยะนี้ว่า เส้นใยขั้นที่สาม (Tertiary mycelium) จากนั้น เส้นใยจะค่อย ๆ พัฒนาไปเป็น fruiting body และเจริญไปเป็นดอกเห็ดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10.4 ธรรมชาติของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่ดำรงชีวิตแบบ Saprophytic fungi แต่ในบางครั้งก็จัดเป็นพวกปาราสิต (parasite) โดยเจริญเติบโตบนต้นไม้ที่มีชีวิตและเมื่อต้นไม้ตายเห็ดนางรมก็ยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อีก การดำรงชีพตามธรรมชาติของเห็ดนางรมมีดังนี้

(1) เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีความสามารถย่อยสารประกอบที่มีโมเลกุลซับซ้อนได้ดีกว่าเห็ดฟาง โดยเฉพาะพวกเซลลูโลส ลิกนิน ฯลฯ จึงทำให้วัสดุที่ใช้ในการเพาะโดยเฉพาะขี้เลื่อยไม้ยางพาราไม่จำเป็นต้องผ่านการหมักก็ได้

(2) ความสามารถในการดำรงชีวิตในกรณีที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เห็ดนางรมสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยการสร้างคลามัยโดสปอร์ (Chlamydospore) อยู่ตามตอไม้ เมื่ออากาศชุ่มชื้นและสภาพแวดล้อมเหมาะสมเห็ดนางรมก็จะงอกเส้นใยออกมา จากนั้นเส้นใยก็จะพัฒนาไปเป็นดอกและมีการสร้างสปอร์แพร่พันธุ์ต่อไป และเห็ดนางรมยังสามารถเจริญเติบโตบนท่อนไม้ได้อย่างดี

(3) เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดเล็กน้อยหรือมี pH 5.0-5.2 การผสมขี้เลื่อยหรือวัสดุที่ใช้เพาะไม่จำเป็นต้องใส่ปูนขาวลงไป

(4) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดควรอยู่ประมาณ 30-32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกดอกหรือสร้างดอกประมาณ 25 องศาเซลเซียส

2.11 เห็ดนางฟ้าภูฐาน

เห็ดนางฟ้าภูฐาน จัดเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดนางรมและถือเป็นเห็ดค่อนข้างใหม่ในการนำมาผลิตเพื่อการค้า เห็ดชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดแถบภูเขาหิมาลัย ประเทศอินเดีย ในสภาพธรรมชาติ เห็ดนางฟ้าภูฐาน ชอบเจริญเติบโตตามตอไม้ผุๆ ในบริเวณที่มีอากาศชื้นและเย็น เห็ดพวกนี้มีลักษณะคล้ายเห็ดนางรมและเห็ด เป๋าฮื้อ แต่ดอกเห็ดจะมีสีขาวนวลจนถึงสีน้ำตาลอ่อน เห็ดนางฟ้าภูฐานสามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 15 - 35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จัดเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุด

2.11.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

2.11.1.1 การจำแนกเห็ดนางฟ้าภูฐาน (Taxonomy)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Pleurotus Sajor-caju* (Fr.) Sing.

ชื่อสามัญ : เห็ดนางฟ้าภูฐาน หรือ Sajor-caju

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Class	:	Basidiomycetes
Subclass	:	Holobasidiomycetidae
Order	:	Agricales
Family	:	Tricholomataceae
Genus	:	Pleurotus
Species	:	Sajor-caju

2.11.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดนางฟ้าภูฐาน จัดเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป๋าฮื้อ แต่เห็ดนางฟ้าจะมีหมวกดอกหนาและเนื้อแน่นกว่าเห็ดนางรม ลักษณะของดอกทั่วๆ ไป ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

(1) หมวกดอก (Cap) หมวกดอกจะมีเนื้อแน่น และมีสีคล้ำคล้ายเห็ดเป๋าฮื้อ แต่สีของหมวกดอกจะจางกว่า หมวกดอกจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-6 นิ้ว ดอกอาจจะออกมาเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือเป็นกระจุกก็ได้

(2) ก้านดอก (Staik) ก้านดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐาน จะเป็นเนื้อเดียวกับหมวกดอกคล้ายเห็ดนางรม แต่มีเนื้อแน่นสีขาว และไม่มีวงแหวนรอบก้านดอก ถ้าเห็ดนางฟ้าเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติตามขอนไม้ ดอกเห็ดจะมีลักษณะเรียงรายลดหลั่นกันเป็นชั้นๆ ก้านดอกจะสั้นมาก

(3) ครีบดอก (Gills) ครีบดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐาน จะมีสีขาวยาวตลอด และบริเวณครีบดอกจะเป็นแหล่งสร้างสปอร์ของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

(4) เส้นใยของเห็ดนางฟ้าภูฐาน (Mycelium) เส้นใยจะมีลักษณะค่อนข้างละเอียด และมีสีขาวมากกว่าเห็ดนางรม การเจริญเติบโตของเส้นใยจะมีลักษณะคล้ายเห็ดนางรม

2.11.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

จากการที่เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดในสกุลเดียวกับเห็ดนางรม ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเห็ดนางฟ้าภูฐาน จึงคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ

(1) อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็นดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานประมาณ 25 องศาเซลเซียส เห็ดนางฟ้าจะไม่ออกดอกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส และสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส และการให้ก้อนเชื้อได้รับอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ในระยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาสั้นๆ จะช่วยชักนำให้การออกดอกดีขึ้น การที่ก้อนเชื้อได้รับอุณภูมิต่ำในช่วงเวลากลางคืนก็เพียงพอที่จะช่วยชักนำการออกดอกของเห็ดได้ดีขึ้น

(2) ความชื้น (Humidity) เห็ดนางฟ้าภูฐานเป็นเห็ดที่ต้องการสภาพความชื้นของอากาศค่อนข้างสูงสภาพของโรงเรือนควรมีความชื้น (Relative humidity) ไม่ต่ำกว่า ร้อยละ 80-85 เพราะสภาพความชื้นของอากาศมีความสำคัญต่อการพัฒนาของดอกเห็ดมาก

2.11.3 **คุณค่าทางอาหารของเห็ดนางฟ้าภูฐาน**

จากการที่เห็ดนางฟ้าภูฐานเป็นเห็ดที่มีกลิ่นหอม เนื้อแน่น เจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูฝน ต่อต้นฤดูหนาว ประมาณเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน เป็นช่วงที่เหมาะต่อการเพาะเห็ดนางฟ้าภูฐานมาก จึงทำให้เห็ดนางฟ้าภูฐานจัดเป็นเห็ดที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง นอกจากนี้เห็ดนางฟ้าภูฐานยังจัดเป็นเห็ดที่มีปริมาณวิตามินและแร่ธาตุค่อนข้างสูง เห็ดนางฟ้าภูฐานประกอบด้วยคุณค่าทางอาหาร ดังต่อไปนี้

1. ปริมาณธาตุอาหาร (Nutrients)เห็ดนางฟ้ามีประมาณธาตุ อาหารหลายอย่างดังนี้

แคลเซียม	(Ca)	20	มิลลิกรัม/100 กรัม
ฟอสฟอรัส	(P)	760	มิลลิกรัม/100 กรัม
โปแตสเซียม	(K)	3,260	มิลลิกรัม/100 กรัม
เหล็ก	(Fe)	124	พีพีเอ็ม
แคดเมียม	(Cd)	0.3	พีพีเอ็ม
สังกะสี	(Zn)	12.0	พีพีเอ็ม
ทองแดง	(Cu)	12.2	พีพีเอ็ม
ตะกั่ว	(Pb)	3.2	พีพีเอ็ม

2. ปริมาณของกรดอะมิโน (amino acid) ปริมาณของกรดอะมิโน คำนวณในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม ของ Crude protien nitrogen

Isoleucine	78.4
Leucine	68.1
Lysine	73.5
Methionine + Cystine	62.7
Phenylalanine + Tyrosine	137.8
Threonine	88.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tryptophan	91.6
Valine	76.1

2.12 เห็ดเป๋าฮื้อ

เห็ดเป๋าฮื้อเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีระหว่างอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส เห็ดชนิดนี้มีเนื้อแน่นมีรสชาติคล้ายเนื้อสัตว์ (เป๋าฮื้อเป็นเนื้อหอยทะเลชนิดที่มีราคาแพงมาก) ในปี 2515 บริษัทอาหารสากล ได้ว่าจ้างผู้เชี่ยวชาญทางด้านเห็ดของไต้หวันมาทำการเพาะเห็ดชนิดนี้ ที่จังหวัดเชียงใหม่เป็นผลสำเร็จครั้งแรก เพื่อส่งโรงงานกระป๋องของบริษัท ในระยะแรกเห็ดเป๋าฮื้อที่จำหน่ายกันในท้องตลาดราคาสูงมาก ประมาณกิโลกรัมละ 80-100 บาท จึงทำให้นักเพาะเห็ดสนใจหันมาเพาะเห็ดชนิดนี้กันมากขึ้น และได้มีการส่งเสริมและอบรมการเพาะเห็ดเป๋าฮื้อทั่วทุกภาคของประเทศทั้งๆ ที่งานด้านวิชาการทางด้านการทดลองค้นคว้า ยังไม่ได้เริ่มต้นเลย จึงทำให้ผลผลิตในการเพาะเห็ดเป๋าฮื้อต่อหน่วยค่อนข้างต่ำ ตลอดจนมีโรคและแมลงรบกวนมาก ทำให้การผลิตเห็ดชนิดนี้ขาดหลักประกันที่ดีในปี 2519-2520 ผู้เพาะเห็ดเป๋าฮื้อเริ่มประสบภาวะขาดทุนและบางรายถึงกับเลิกกิจการไป อย่างไรก็ดีเห็ดเป๋าฮื้อมีโอกาสที่จะผลิตเป็นสินค้าออกจำหน่ายยังต่างประเทศสูงมาก เพราะไต้หวันประสบผลสำเร็จในการผลิตเห็ดเป๋าฮื้อ (เห็ดกระป๋อง) เป็นสินค้าออกมาแล้ว และประเทศที่เป็นคู่แข่งสำคัญ คือ ประเทศเกาหลีใต้ ถ้าเปรียบเทียบระหว่างไต้หวันหรือเกาหลีใต้กับประเทศไทยแล้ว ประเทศไทยได้เปรียบมากกว่า ด้านวัตถุดิบที่ใช้เพาะและแรงงานในประเทศไทยยังถูกกว่า ถ้าหากได้มีการส่งเสริมและค้นคว้าอย่างจริงจังแล้ว ในอนาคต เห็ดชนิดนี้จะทำรายได้เป็นสินค้าออกในปีหนึ่งๆ เป็นจำนวนมาก

นอกจากเห็ดเป๋าฮื้อจะมีรสอร่อยแล้วยังมีข้อได้เปรียบกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ อีกหลายประการที่ทำให้นักเพาะเห็ดสนใจ เช่น

1. เห็ดเป๋าฮื้อมีราคาแพงกว่าเห็ดฟาง เห็ดนางรม โดยเฉพาะในระยะแรก เพราะราคาสูงมาก

2. สามารถนำมาทำเป็นเห็ดกระป๋องได้ดี เพราะโครงสร้างของดอกเห็ดไม่เปลี่ยนแปลงหรือยุบตัวลงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่นๆ

3. เห็ดเป๋าฮื้อสามารถเก็บไว้ได้นานหว่าเห็ดชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะถ้าเก็บไว้ในตู้เย็น จะรักษาความสดได้เป็นสัปดาห์

4. วิธีการเพาะเห็ดทำได้ง่าย โดยการใช้เศษวัสดุทางการเกษตร เช่น ซัง ข้าวโพด ขี้เลื่อยไม้เนื้ออ่อน เศษฟาง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สามารถเพาะได้ทุกฤดูกาล และทุกภาคของประเทศ โดยไม่ต้องใช้เครื่องปรับอุณหภูมิ
6. ยังมีตลาดพอจำหน่ายได้ทั้งในและต่างประเทศ

2.12.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดเป๋าฮื้อ

2.12.1.1 การจำแนกเห็ดเป๋าฮื้อ

เห็ดเป๋าฮื้อจัดเป็นเห็ดที่อยู่ในตระกูลเดียวกับเห็ดนางรม หรือจัดอยู่ในสกุล *Pleurotus* จึงทำให้ลักษณะภายนอกของเห็ดใกล้เคียงกันมาก จะมีความแตกต่างกันที่สีและความแน่นของเนื้อดอกเท่านั้น เห็ดพวกนี้จัดเป็นสายพันธุ์ใหม่ของเห็ดนางรม ที่มีการสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศที่เรียกว่า ออยเดีย (Oidia) ซึ่งเกิดรวมกลุ่มสีดำบนก้านชูที่เรียกว่า Coremium ส่วนที่เป็นก้านชู คือ Coremium นอกจากจะพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังอาจพบบริเวณโคนก้านดอกด้วย ส่วนการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อจะเจริญน้อยกว่าเห็ดนางรม ไม่ว่าจะเจริญบนอาหารวุ้นหรือในถุงก้อนเชื้อเห็ด จึงทำให้ผู้เพาะเห็ดไม่นิยมเพาะมากนัก อย่างไรก็ตาม เห็ดเป๋าฮื้อจัดเป็นเห็ดที่เหมาะต่อการนำมาแปรรูปทำเห็ดกระป๋องมากกว่าเห็ดชนิดอื่น ๆ การจำแนกเห็ดเป๋าฮื้อทางชีววิทยา สามารถจำแนกเห็ดเป๋าฮื้อได้ดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์	:	*Pleurotus abalonus* Hon et al. Sp
ชื่อสามัญ	:	เห็ดเป๋าฮื้อ หรือ เห็ดหอยโข่งทะเล
		Abalone mushroom
Class	:	Basidiomycetes
Subclass	:	Holobasidiomycetidae
Order	:	Agricales
Family	:	Tricholomataceae
Genus	:	Pleurotus
Species	:	Abalonus

(1) สายพันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อ

เห็ดที่อยู่ในสกุลเห็ดนางรม หรือ *Pleurotus* มีมากมายหลายชนิดบางชนิดมีลักษณะคล้ายเห็ดเป๋าฮื้อ แต่พันธุ์เห็ดเป๋าฮื้อดั้งเดิมอยู่ในประเทศไต้หวันและประเทศจีน ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 สายพันธุ์ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 เห็ดเป๋าฮื้อดำ เป็นเห็ดเป๋าฮื้อที่ถูกนำมาเพาะ และจำหน่ายในท้องตลาดก่อนพันธุ์อื่นๆ พวกนี้มีสีน้ำตาลแก่จนเกือบเป็นสีดำ มีโครงสร้างของดอกแน่นมาก แต่ไม่เหนียว ส่วนมากจะเพาะไว้สำหรับบรรจุกระป๋อง เห็ดชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 24 – 28 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้ดอกเห็ดจะเบา คุณภาพต่ำ โครงสร้างดอกไม่แน่นและรสชาติไม่อร่อยเท่าที่ควร แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่านี้ การเจริญเติบโตของดอกเห็ดจะช้ามาก เห็ดเป๋าฮื้อพันธุ์นี้ถ้าทำการเพาะเลี้ยงด้วยสปอร์จะได้ลูกหลานที่มีความแปรปรวนมาก

1.2 เห็ดเป๋าฮื้อสีเหลือง เป็นเห็ดที่ได้จากการกลายพันธุ์ของเห็ดเป๋าฮื้อดำ แต่มีโครงสร้างของดอกไม่แน่นเท่าเห็ดเป๋าฮื้อดำ ขนาดดอกใหญ่กว่า และมีสีสันสวยงามกว่า จึงเหมาะต่อการนำมาบริโภคสดๆ ส่วนการบรรจะกระป๋องนั้น ต้องอาศัยเทคนิคเข้าช่วย จึงจะทำให้ได้คุณภาพของเห็ดพันธุ์นี้ไม่แพ้เห็ดเป๋าฮื้อสีดำ เห็ดพันธุ์นี้ทนร้อนได้ดีและให้ผลผลิตค่อนข้างสูง

1.3 เห็ดเป๋าฮื้อญี่ปุ่น เป็นพันธุ์ที่เหมาะสำหรับบริโภคสด มีสีเทาแก่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิที่เหมาะสม 15 – 22 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับผู้เพาะเห็ดทางภาคเหนือที่จะนำมาเพาะในช่วงฤดูหนาว แต่ตลาดสำหรับพันธุ์นี้ยังไม่กว้างขวางมากนัก

1.4 เห็ดเป๋าฮื้ออินเดีย เป็นเห็ดสายพันธุ์ที่มีสีเทาแก่เกือบดำ ดอกใหญ่ปานกลาง เนื้อไม่แน่น มีกลิ่นหอมเหมาะที่จะนำมาบริโภคสดๆ อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญเติบโต อยู่ระหว่าง 16 – 24 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตได้เร็วกว่าเห็ดเป๋าฮื้อพันธุ์สีดำมาก และยังให้ผลผลิตสูง

ในปัจจุบัน ผู้เพาะเห็ดเป๋าฮื้อพันธุ์ดอกสีครีม เป็นพันธุ์ที่เส้นใยเจริญเติบโตรวดเร็วและให้ผลผลิตสูง แต่โครงสร้างดอกไม่แน่นเท่าพันธุ์สีดำ ลักษณะเนื้อของเห็ดพันธุ์สีครีมนิ่มกว่าพันธุ์สีดำ เล็กน้อย จึงไม่เหมาะที่จะนำมาบรรจุกระป๋อง แต่ในปัจจุบันโรงงานบรรจุกระป๋องให้ดีขึ้นและรับเห็ดเป๋าฮื้อพันธุ์สีครีมมาบรรจุกระป๋องด้วย

2.12.2 **รูปร่างและลักษณะของเห็ดเป๋าฮื้อ**

เห็ดเป๋าฮื้อมีรูปร่างและลักษณะการเจริญเติบโตผิดกับเห็ดชนิดอื่นๆ พอที่จะจำแนกได้ ดังนี้

(1) การเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารวุ้น เป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกระยะนี้ว่า Conidia state หรือ Imperfect state โดยเส้นใยจะเจริญบนอาหารวุ้น มีลักษณะเป็นสีขาว ประมาณ 70 – 10 วัน หลังจากนั้นเส้นใยจะสร้าง conidia รวมกันเป็นกลุ่ม มีสีดำอยู่บนก้านสั้นๆ ซึ่งเกิดทั่วไปก้านของ conidia เรียกว่า coremium ส่วนกลุ่มของ conidia เรียกว่า ออยเดีย (oidia) ซึ่งเป็นลักษณะของ Asexual state โดยเส้นใยจะเจริญยื่นขึ้นมาจากกลุ่มของเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธรรมดา และปลายของเส้นใยจะหักออก มีลักษณะเป็นก้านสั้นๆ รูปทรงกระบอก มีสีคล้ำ สปอร์เหล่านี้จะเรียงติดกันเป็นลูกโซ่ เมื่อรวมตัวกันมากๆ จะเห็นเป็นจุดหรือหยดสีดำ เรียกว่า coremia บนอาหารวุ้นและยังพบบนก้อนเชื้อที่เพาะหรือตามโคนของดอกเห็ดอีกด้วย

(2) ลักษณะของดอกเห็ด การเกิดของดอกเห็ดเป๋าฮื้อ อาจเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มก็ได้ แต่ทั่วไปนิยมรับประทานดอกเดี่ยว ขนาดของหมวกดอก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5 – 15 เซนติเมตร ผิวดอกเป็นสีครีมหรือสีเทาเข้ม ลักษณะของผิวดอกจะแห้งไม่เปียกหรือเป็นเมือก บริเวณส่วนกลางของหมวกดอกจะบุ๋มเล็กน้อย และครีบใต้หมวกดอกมีสีขาวถึงครีม ก้านดอกมีขนาดใหญ่อวบแน่นแข็งแรง และประกอบด้วยเนื้อเยื่ออัดตัวกันแน่น ตามปกติก้านดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 – 3 เซนติเมตรและยาว 5 – 8 เซนติเมตรเห็ดเป๋าฮื้อบางดอกมีก้านดอกสั้นมาก ก้านดอกของเห็ดเป๋าฮื้อไม่ติดตรงกลางดอกเหมือนเห็ดฟางแต่จะติดกับขอบของหมวกดอก

2.12.3 สภาพแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อเห็ดเป๋าฮื้อ

สภาพแวดล้อมนับว่ามีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของเห็ดเป๋าฮื้ออย่างมาก ดังนั้นถ้าต้องการจะให้เห็ดเป๋าฮื้อออกดอกดี ควรปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม ดังนี้

(1) แสงสว่าง (Light) แม้ว่าเห็ดเป๋าฮื้อจะไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงไม่จำเป็นต้องใช้แสงสว่างในการปรุงอาหาร แต่แสงสว่างมีส่วนช่วยในการกระตุ้นให้เห็ดออกดอก โดยเฉพาะการเจริญของหมวกดอก แต่ถ้าแสงน้อย หรือไม่มีแสงจะกระตุ้นการเจริญของก้านดอก นอกจากนี้ ถ้าเห็ดเป๋าฮื้อเจริญในที่มืดหมวกดอกจะมีสีเข้ม แต่ถ้าเห็ดเป๋าฮื้อเจริญเติบโตในที่สว่าง หมวกดอกจะมีสีจางลง

(2) ความชื้น (Humidity) มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของเห็ดเป๋าฮื้อมาก เห็ดพวกนี้ต้องการความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศสูงมาก จึงจำเป็นต้องเพาะในโรงเรือนเพาะเห็ด ความชื้นภายในโรงเรือนที่เหมาะสมต่อการเพาะเห็ดเป๋าฮื้อควรอยู่ระหว่างร้อยละ 90 –95 ถ้าความชื้นสัมพัทธ์สูง จะทำให้ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมาก

(3) อุณหภูมิ (Temperature) นับว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของเห็ดเป๋าฮื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดเป๋าฮื้อควรอยู่ระหว่าง 25 – 30 องศาเซลเซียส ถ้ามีอุณหภูมิต่ำกว่า 12 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 36 องศาเซลเซียส เห็ดจะไม่ออกดอก หรือดอกที่ออกจะมีลักษณะแคระแกน มีรูปร่างผิดปกติ (ปัญญา,2532)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.13 เห็ดตีนตุ๊กแกหรือเห็ดแครง

เห็ดตีนตุ๊กแกหรือเห็ดแครง เป็นเห็ดขนาดเล็กซึ่งเกิดชุกชุมตามท่อนไม้ที่ตายแล้ว บนท่อนอ้อยที่ทิ้งอยู่ในไร่ ตามรั้วบ้านที่ทำด้วยไม้เนื้ออ่อน ตามท่อนไม้ไผ่ที่ผุเปื่อยหรือตายแล้ว เป็นต้น ในฤดูฝนจะพบเห็นเห็ดชนิดนี้มากมาย นับว่าเป็นเห็ดที่ขึ้นง่ายและขึ้นทั่วไป เห็ดตีนตุ๊กแกเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่รับประทานได้ เห็ดชนิดนี้ทางภาคใต้เรียก " เห็ดแครง" คนส่วนมากนิยมนำไปทอดกับไข่ หรือนำไปแกงคั่วกับเนื้อสัตว์โดยใช้เห็ดที่เกิดใหม่ๆ เพราะยังสดอยู่ มีลักษณะอ่อนนุ่มไม่เหนียวและแข็งเกินไป

เห็ดตีนตุ๊กแกมีเนื้อเห็ดบางและค่อนข้างเหนียว และมีเนื้อเห็ดแห้งกว่าเห็ดธรรมดา เห็ดชนิดนี้ชอบออกดอกข้างๆ ลำต้นหรือท่อนไม้ผุ รูปร่างดอกเห็ดแผ่ออกคล้ายพัดซึ่งมีก้านสั้นมากหรือบางดอกก็ไม่มีก้านเลย ก้านดอกเฉลี่ยแล้วยาวประมาณ 0.5 – 2 มิลลิเมตร ผิวดอกเห็ดด้านบนมีสีขาวปนเทาอ่อนและมีขนละเอียดคล้ายขนกำมะหยี่ปกคลุมอยู่ทั่วไป เวลาอากาศแห้งขอบหมวกเห็ดจะงอหรือม้วนเข้าข้างล่างเล็กน้อย และจะมีการแยกออกจากกันเข้าไปเกือบครึ่งดอกเป็นแห่งๆ มองดูคล้ายนิ้วเท้า หรือนิ้วมือของตุ๊กแก ครีบหมวกเห็นด้านล่างมีสีน้ำตาลหรือสีอบเชย และมีแผ่นครีบหมวกเห็ดเกิดซ้อนกันก็มี ดอกเห็ดเวลาแห้งแล้วมีลักษณะแข็งและเหนียวเล็กน้อย และจะคงรูปร่างอยู่นานหลายเดือนจนกว่าจะค่อยๆ ผุเปื่อยไป

เห็ดตีนตุ๊กแกมีสปอร์สีขาว รูปร่างยาวรี และมีขนาดเล็กกว่าสปอร์ของเห็ดทั่วไป ขนาดเฉลี่ย 4 x 1.5 ไมครอน ปลายด้านหนึ่งแหลมเป็นติ่งยื่นออกไปเล็กน้อย

เห็ดชนิดนี้เกิดอยู่กันเป็นกลุ่มและงอกซ้อนกันเป็นชั้น ๆ ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะก็อาจจะขึ้นเป็นดอกเดี่ยวกระจัดกระจายกันบ้าง

เห็ดตีนตุ๊กแกหรือเห็ดแครงเป็นเห็ดที่ขึ้นง่าย และพบเสมอตามไม้ผุหรือขอนไม้ผุ เห็ดชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Schizophyllum commune* เห็ดชนิดนี้เป็นปรสิตของพืชบางชนิดด้วย เช่น เป็นปรสิตของอ้อยทำให้ต้นอ้อยแห้งตาย (อนงค์,2520)

2.14 เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ปฏิกริยาในการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวทนั้นเกิดขึ้นเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและเกิดขึ้นในทุกเซลล์ แต่ไพรูเวทที่เกิดขึ้นนั้นสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้มากมาย ปฏิกริยาที่สำคัญ คือ การเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทธานอลซึ่งเกิดขึ้นในยีสต์และจุลินทรีย์หลายชนิด การเปลี่ยนแปลงขั้นตอนแรก คือ เกิดการดึงหมู่คาร์บอกซิลออกจากไพรูเวท (decarboxylation) ได้เป็นอะซีตอลดีไฮด์ ซึ่งปฏิกริยานี้เร่งด้วยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase โดยมี Thiamine pyrophosphate เป็นโคเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

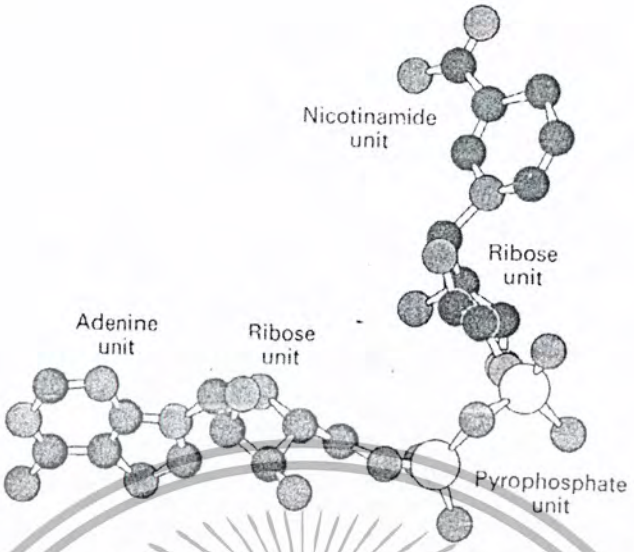
ขั้นที่ 2 จะเกิดปฏิกริยารีดักชันของอะซีตอลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอลโดยใช้ NADH ซึ่งปฏิกริยานี้เร่งด้วยเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase(ADH) ดังนี้

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

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

<u>รูปที่ 5</u> แบบจำลองบริเวณเร่งของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แบบจำลองโครงสร้างของ NAD^+

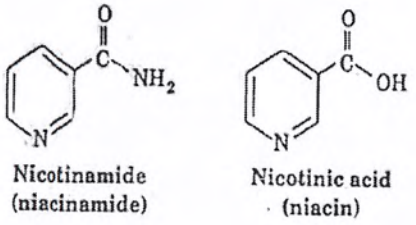
เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ และเร่งปฏิกริยารีดักชันของอัลดีไฮด์(อะซีตัลดีไฮด์) เอนไซม์นี้พบในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดและพบมากในตับและไต โมเลกุลของเอนไซม์มีสังกะสี (Zinc) เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นโดย glutathione และ EDTA และถูกยับยั้งด้วยโลหะหนัก แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่สกัดได้จากตับของม้ามีมวลโมเลกุล 80,000 ขณะที่ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่ได้จากยีสต์มีมวลโมเลกุล 141,000

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสใช้มากในการวิเคราะห์เอทานอลในของเหลวทางชีวภาพ ซึ่งจะนำไปใช้ในปฏิกริยาคู่ควบในการวิเคราะห์ของเหลวทางชีวภาพ โดย pH ที่เหมาะสมของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสคือ 8.6 – 9.0 แต่สามารถขยายได้ถึง pH 12.6 และ isoelectric point ของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสคือ 5.4 เอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นด้วย sulfhydryl reagent เช่น mercaptoethanol และ dithiotreitol

2.15 นิโคตินาไมด์ (nicotinammide) หรือไนอาซินาไมด์ (niacinamide)

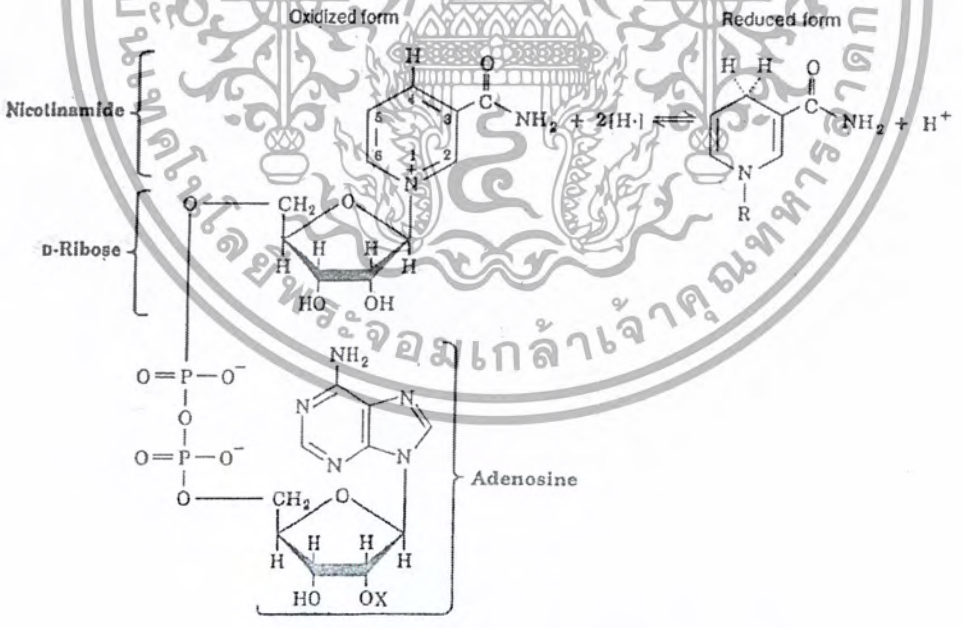
รูปกรดคาร์บอกซิลิก คือ กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) หรือไนอาซิน (niacin) เป็นอนุพันธ์ของไพริดีน (pyridine) มีโครงสร้างดังรูปที่ 7 พบทั่วไปในพืชและเนื้อเยื่อของสัตว์ เนื่องจากพืชและสัตว์ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิโคตินาไมด์ จากกรดอะมิโนทริปโตเฟน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 โครงสร้างของกรดนิโคตินิก (ไนอาซิน) และนิโคตินาไมด์

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 8 นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์(NAD^+) และ
นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต($NADP^+$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิโคตินาไมด์ นิวคลีโอไทด์ ทั้ง 2 ชนิดทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ พวกดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชัน ตัวอย่าง เช่น

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH + H^+$$

ปฏิกิริยานี้เกี่ยวข้องกับการกำจัดไฮโดรเจนอะตอม 2 อะตอม ออกจากสับเสตรท คือ เอทานอล ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นอะซีตัลดีไฮด์ 2 อิเล็กตรอน และ 2 โปรตอน (H^+) จะถูกกำจัดออกจากสับเสตรทในรูปของไฮไดรด์ไอออน (H^-) และโปรตอน (H^+) กลไกการเกิดรูปรีดิวซ์ของ NAD^+ ($NADP^+$) อธิบายได้โดย H^- จากสับสเตรท จะเข้าทำปฏิกิริยากับตำแหน่งที่ 4 ของส่วนที่เป็นนิโคตินาไมด์ของนิวคลีโอไทด์รูปออกซิไดส์ (รูปที่ 8) ส่วน H^+ ที่ถูกกำจัดจากสับสเตรทจะไม่เข้าไปเกี่ยวข้องกับโมเลกุลของ NAD^+ ($NADP^+$) ทั้งนิโคตินาไมด์นิวคลีโอไทด์รูปออกซิไดส์และรีดิวซ์ มีคุณสมบัติในการดูดแสงต่างกัน โดยที่รูปรีดิวซ์สามารถดูดแสงได้ในช่วงคลื่น 340 นาโนเมตร แต่รูปออกซิไดส์ไม่ดูดแสงที่ช่วงคลื่นนี้ เพราะฉะนั้นเราสามารถที่จะติดตามการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน หรือออกซิเดชันของโคเอนไซม์ตัวนี้ได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ในขณะที่เกิดปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยารีดักชันของ NAD^+ เมื่อมีเอธานอลและเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

2.16 อิเลคโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (Polyacrylamide Gel Electrophoresis , PAGE)

อิเลคโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล หรือที่เรียกย่อๆ ว่า PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสม ถึงแม้ว่าเทคนิคการแยกแบบ 2 มิติจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการแยกโปรตีนแต่อิเล็กโทรโฟเรซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล 1 มิติก็ยังคงเป็นที่นิยมใช้และให้ผลที่ดี

ไอออนที่มีประจุหรือหมู่ที่มีปรุจุเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ได้ โปรตีนก็เช่นเดียวกันเป็นแมโครโมเลกุลที่มีประจุที่ pH ต่างๆ เพราะฉะนั้นจึงเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้าและอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ (charge density) ของโปรตีน ความหนาแน่นของประจุหมายถึงอัตราส่วนของมวลประจุต่อมวล (charge/mass) ถ้าอัตราส่วนนี้สูงโมเลกุลจะเคลื่อนที่ได้เร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลายโปรตีนผสม โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่แตกต่างกันทำให้แยกออกจากกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสที่มีตัวกลางค้ำจุนเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีในระหว่างเกิดกระบวนการแยก ตัวกลางค้ำจุนพวกกระดาษและเซลลูโลสอะซิเตตสามารถลดการพา (convention) ได้ การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางค้ำจุน 2 อย่างนี้ จะขึ้นกับความหนาแน่นของประจุของโปรตีนที่ค่า pH หนึ่งๆ ที่เลือกส่วนตัวกลางค้ำจุนพวกเจลสามารถลดการแพร่และป้องกันการเกิดการพา ทำให้การแยกได้แถบที่คมชัด รวมทั้งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุนซึ่งทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลได้เมื่อปรับขนาดของรูพรุนให้เหมาะสม เพราะฉะนั้น การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นเจลจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาดของสารที่ต้องการแยก ด้วยเหตุนี้โปรตีน 2 ชนิดที่มีขนาดที่ต่างกัน แต่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากันจึงไม่ถูกแยกออกจากกันเมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบกระดาษ ในขณะที่ถ้าใช้เทคนิค PAGE ขนาดของรูพรุนของเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดใหญ่ช้าลงกว่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่า ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้

ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลของเจลนี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเจลว่ามีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของอนุภาคที่เคลื่อนที่หรือไม่ ขนาดรูพรุนของอะกาโรสเจลค่อนข้างใหญ่ทำให้ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลของโปรตีนส่วนใหญ่ลดลง การแยกจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุอย่างเดียว ในขณะที่แป้งเจลและพอลิอะคริลาไมด์เจลมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับขนาดของโมเลกุลโปรตีนทำให้การแยกขึ้นกับขนาดและความหนาแน่นประจุ อย่างไรก็ตามผลการแยกโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแป้งเจลจะขึ้นกับคุณภาพของแป้งเจลด้วย ทั้งนี้เนื่องจากแป้งเจลเตรียมมาจากผลผลิตทางชีวภาพจึงอาจมีสารปนเปื้อนซึ่งมีผลต่อการแยกสารได้ ในขณะที่พอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) ของอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ (acrylamide monomer) ซึ่งเตรียมจากสารที่มีความบริสุทธิ์สูง และยังเป็นสารที่เฉื่อยต่อสารเคมี เสถียร (stable) ที่ช่วง pH อุณหภูมิและไมครอนกว้าง และยังโปร่งใส ข้อดีของพอลิอะคริลาไมด์เจลอีกข้อคือสามารถเตรียมเจลที่มีขนาดรูพรุนได้ขนาดต่างๆ กัน ซึ่งต่างจากแป้งเจลที่มีขนาดรูพรุนค่อนข้างจำกัด ด้วยเหตุนี้พอลิอะคริลาไมด์เจลจึงเป็นตัวกลางค้ำจุลที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซน ถึงแม้ว่าแป้งเจลจะนิยมใช้เป็นตัวกลางค้ำจุนในการวิเคราะห์ไอโอไซม์ และอะกาโรสเจลเป็นตัวกลางค้ำจุลในการแยกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะพวกกรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอโปรตีน (nucreoprotein) ก็ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.16.1 สิ่งที่เกี่ยวข้องกับการทำอิเลคโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล

2.16.1.1 อะคริลาไมด์

สารที่ทำให้เกิดเจลขึ้นได้แก่มอโนเมอร์พวกอะคริลาไมด์ และบิส รวมทั้งตัวเริ่มต้น เช่น แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต และ TEMED ปฏิกริยาพอลิเมอรไรเซชันเกิดขึ้นได้ต้องมีแสง เพราะฉะนั้นทั้งอะคริลาไมด์และบิสจึงควรเก็บไว้ในขวดสีชาไม่ให้ถูกแสง และเก็บที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเช่นนี้มอโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่เป็นของแข็งจะสเถียร แต่ถ้าเป็นสารละลายจะเสถียรน้อยกว่าและไม่ควรเก็บไว้นานเกินกว่า 1-2 เดือน ทั้งอะคริลาไมด์และบิสมีความเป็นพิษสูงต่อระบบประสาทกลาง (central nervous system) สามารถถูกดูดซึมเข้าทางผิวหนังหรือเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดดมเอาผงของสารเหล่านี้เข้าไป เมื่อมอโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดเกิดปฏิกริยาพอลิเมอร์ไรเซชันขึ้นเป็นเจล แล้วจะไม่เป็นพิษและสามารถจับต้องได้อย่างปลอดภัย แต่อย่างไรก็ตามควรจะสวมถุงมือเป็นการป้องกันการสัมผัสมากเกินไป

เนื่องจากอะคริลาไมด์เป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดในสารละลายมอโนเมอร์ เพราะฉะนั้นอะคริลาไมด์จึงเป็นแหล่งที่สำคัญของสารปนเปื้อนที่อาจไปรบกวนปฏิกริยาได้

การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบเจลมีข้อสังเกตดังนี้คือ

1. เมื่อต้องการแยกสารผสมของโปรตีน ต้องไม่เลือกความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลการแยกสารชนิดใดชนิดหนึ่งออกจากสารที่เหลือทั้งหมด แต่จะต้องเลือกความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลการแยกของสารทุกชนิดดี

2. ถ้าได้แถบการแยกแถบเดี่ยวจะไม่สามารถสรุปได้เลยว่าประกอบด้วยส่วนประกอบชนิดเดียว ต้องทำการทดลองซ้ำอีด 2 หรือ 3 การทดสอง เพื่อพิสูจน์ โดยใช้เจลที่มีขนาดรูพรุนแตกต่างกัน เพื่อให้ผลของตะแกรงร่อนโมเลกุลต่างกัน หรือใช้ระบบของเจลที่มี pH แตกต่างกันซึ่งมีผลเปลี่ยนแปลงประจุสุทธิของโมเลกุล

ถ้าส่วนประกอบบางชนิดของสารผสมไม่เสถียรหรือตกตะกอนที่ค่า pH หนึ่งๆ ต้องหลีกเลี่ยงการเกิดปัญหานี้ในระหว่างการแยก ในสารละลายอิสระ การเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ของบัฟเฟอร์มีค่าต่างจากค่า pI ของโปรตีนมากขึ้น เพราะฉะนั้นจึงควรเลือกค่า pI ที่ทำให้ส่วนประกอบของสารผสมมีความแตกต่างกันมากที่สุด ในการวิเคราะห์สารผสมโดย PAGE บางครั้งต้องเริ่มด้วยค่า pH ที่ทำให้สารประกอบทุกชนิดในสารผสมเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันแล้วจึงปรับค่า pH ที่ทำให้การแยกได้ผลดีที่สุด โดยทั่วไปสามารถทำ PAGE ได้ที่ pH ช่วง 3.0-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.0 แต่ถ้า pH ต่ำกว่า 3 หรือสูงกว่า 10 จะทำให้เกิดปฏิกริยาดีอะมิเดชัน (de-amination) ของโปรตีน หรือเกิดปฏิกริยาการสลายได้

2.16.1.2 คอลัมน์เจลหรือเจลรูปแท่งและสแล็บเจล (Column Gel or Rod Gel and Slab Gel)

การทำ PAGE มีวิธีการทำเจลได้ 3 แบบ คือ

1. สแล็บเจลในแนวนอน
2. สแล็บเจลในแนวตั้ง
3. เจลรูปแท่งในแนวตั้งตรง

ในช่วงเริ่มต้นของการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซนมักนิยมใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลมีลักษณะเป็นแท่งในหลอดแก้ว หรือเจลรูปแท่ง แต่ปัจจุบันนิยมใช้เจลเป็นแผ่นหรือสแล็บเจลซึ่งมีความหนาประมาณ 0.75-1.5 มิลลิเมตร หรือเป็นเจลแผ่นบางมากสามารถทำ PAGE ได้ในแผ่นเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่เหมือนกันซึ่งทำให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบ แต่เมื่อใช้เจลรูปแท่งสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะถูกวิเคราะห์บนแท่งเจลที่แยกกัน ทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบที่จะให้ผลถูกต้องแน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการยากที่จะรักษาสภาวะในเจลทุกแท่งให้เหมือนกันตลอดการทดลอง

สแล็บเจลมีข้อดีดังนี้คือ

1. ลดการผิดส่วนบิดเบี้ยวของแถบโปรตีนเนื่องจากผลของความร้อน ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ถ้าเป็นสแล็บเจลความร้อนที่เกิดขึ้นจะถูกกระจายไปได้ง่ายกว่า เจลรูปแท่งที่มีความหนากว่า

2. มีพื้นที่หน้าตัดที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าจึงทำให้ง่ายต่อการวัดความทึบแสงและการถ่ายรูป นอกจากนี้ยังง่ายต่อการเก็บแห้ง หรือการทำภาพรังสีในตัว (autoradiography)

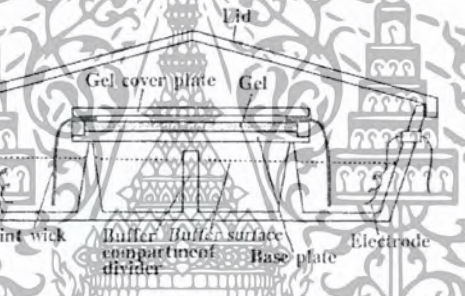
3. การเตรียมเจลใช้เวลาน้อยกว่า สำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสที่ใช้สารตัวอย่างจำนวนมากภายใต้สภาวะเดียวกัน แผ่นสแล็บเจล 1 แผ่นสามารถแยกสารตัวอย่างได้ถึง 25 สาร

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเจลรูปแท่งจะมีข้อเสียเปรียบกว่าสแล็บเจล แต่ก็ยังคงทำอยู่ เช่นในงานที่ต้องการตัดเจลหลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซีส เพื่อนำมาวิเคราะห์หากัมมันตรังสี หรือในงานที่ต้องการชะโปรตีนออกจากเจลเพื่อนำไปหาแอกติวีตีทางชีวภาพ (biological activity)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(1) สแล็บเจลในแนวนอน

การทำ PAGE แบบสแล็บเจลในแนวนอนนี้สามารถใช้เครื่องมือที่ง่ายๆ ราคาไม่แพงและสามารถใช้ร่วมกับระบบอื่นๆได้ เช่น อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแป้งเจล แบบกระดาษ แบบเซลลูโลสอซีเตต และไอโซอิเล็กโทรโฟกัสซิง (isoelectric focusing หรือ IEF) การหยดสารตัวอย่างบนแผ่นเจลนิยมเจาะช่อง(slot) ในเจลจึงหยดหรือปิเปตหยอดสารตัวอย่างที่มีปริมาตรแน่นอนและพอดีกับช่องลงไปในช่องนั้น หรือโดยการวางกระดาษกรองแผ่นเล็กที่ชุ่มด้วยสารตัวอย่างที่มีปริมาตรแน่นอน เช่นเดียวกับที่ทำในอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแป้งเจล วิธีทำเช่นนี้มีข้อดีตรงที่สามารถวางสารตัวอย่างตรงบริเวณใดก็ได้บนแผ่นเจล ถ้าวางตรงกลางของแผ่นเจลก็สามารถทราบถึงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างว่าเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวกหรือเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบในเจลแผ่นเดียวกัน

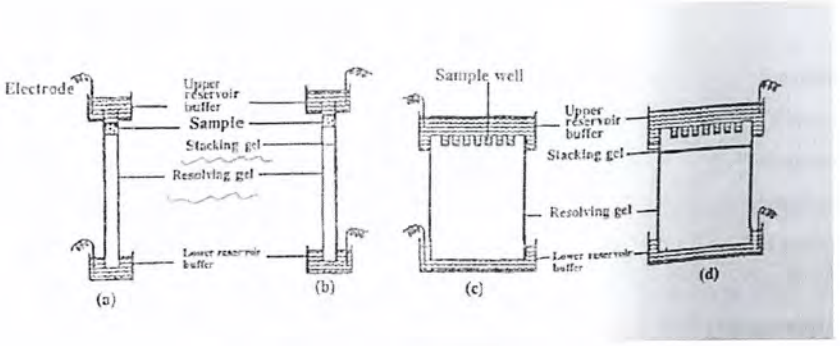


รูปที่ 9 สแล็บเจลในแนวนอน

(2) สแล็บเจลและเจลรูปแท่งในแนวตั้งตรง

การทำ PAGE ในแนวตั้งทั้งแบบสแล็บเจลและเจลรูปแท่ง สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้งอิเล็กโทรดขั้วเดียวเท่านั้น เพราะฉะนั้นจึงต้องเลือก pH ที่ทำให้สารทุกชนิดเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกัน ทั้งสแล็บเจล และเจลรูปแท่ง ในแนวตั้งตรงสามารถใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน และที่ต่างกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 สแล็บเจลในแนวตั้ง

2.16.2 คุณสมบัติของ PAGE

การทำ PAGE เพื่อแยกโปรตีนในสารตัวอย่าง โปรตีนยังคงมีโครงสร้างและรูปร่างในสภาพทางธรรมชาติ (native structure and shape) การแยกจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาด เมื่อต้องการแยก "native protien" โดยใช้เทคนิค PAGE ควรทำ "pre – electrophoresis" ก่อนที่จะหยดสารตัวอย่างลงบนเจล ใช้เวลาทำประมาณ 30-40 นาที เพื่อกำจัดสารเคมีที่ยังเหลืออยู่ เช่น แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต หรือกรดอะคริลิก ซึ่งอาจไปลดแอกติวิตีทางชีวภาพของโปรตีนที่สนใจได้

2.16.2.1 การเลือกระบบของบัฟเฟอร์

การทำ PAGE สามารถเลือกระบบของบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันได้เกือบทั้งหมดที่มี pH ระหว่าง 3-10 แต่สารละลายบัฟเฟอร์ต้องมีไมครอนค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการนำไฟฟ้าที่ต่ำจะช่วยลดความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำ PAGE โดยทั่วไปความเข้มข้นถูกกำจัดอยู่ในช่วง 0.01 โมลต่อลิตร และ 0.1 โมลต่อลิตร ตัวอย่างของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ศึกษาโปรตีน ได้แก่ ทริส-ไกลซีน (pH 80-.3-9.5) ทริส-อะซิเตต (pH 8.3-9.3) ความเข้มข้นของทริสอยู่ในช่วงระหว่าง 0.02-0.05 M

ระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน หมายถึง ไอออนของบัฟเฟอร์เหมือนกันทั้งในสารตัวอย่าง ในเจล และในอ่างอิเล็กโทรด (electrode reservoir) และมี pH คงที่เท่ากัน ส่วนระบบของบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน หมายถึง ไอออนของบัฟเฟอร์ต่างกันในส่วนของเจลและในอ่างอิเล็กโทรด และมี pH ไม่เท่ากัน

2.16.2.2 การเลือก pH

สิ่งที่ต้องพิจารณาอันดับแรกคือ ช่วง pH ที่ทำให้โปรตีนเสถียร และทำให้การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสดำเนินไปได้เร็วและมีประสิทธิภาพในการแยก ถ้า pH ของบัฟเฟอร์ห่างจากค่า pI ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนที่ต้องการแยกมาก โปรตีนจะมีประจุสูงขึ้น เพราะฉะนั้นเวลาที่ใช้ทำจะสั้นลง และเนื่องจากการแพร่ลดลงจึงทำให้แถบคมชัดมากขึ้น ประมาณครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่ศึกษากันมีค่า pI อยู่ในช่วง pH 4.0-6.5 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้จึงอยู่ในช่วง pH 8.0-9.5

2.16.2.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่างต้องให้โปรตีนละลายอย่างสมบูรณ์ และต้องหลีกเลี่ยงการใช้บัฟเฟอร์ที่มีไมครอนสูง ปริมาณของสารตัวอย่างที่หยอดลงบนเจลขึ้นกับจุดประสงค์ของการทำ PAGE และวิธีการย้อมที่ใช้ ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการตรวจสอบความบริสุทธ์ของสารตัวอย่างต้องใช้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโปรตีนสูงประมาณ 0.1-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรของสารตัวอย่างต้องน้อยด้วยเนื่องจากเป็นระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันจึงไม่มีการรวมตัวอย่างเป็นแถบแคบๆ เหมือนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน โดยทั่วไปใช้ปริมาณสารตัวอย่าง 5-25 ไมโครลิตร สำหรับเจลรูปแท่งเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ถ้าใช้ปริมาตรสูงประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ความหนาแน่นของสารตัวอย่างจะมีผลต่อความคมชัดของแถบและการแยก ถ้าการทำ PAGE เป็นแบบแนวตั้ง (ทั้งสแล็บเจลและเจลรูปแท่ง) การหยดสารตัวอย่างต้องใช้ไมโครปิเปต (micropipette) หยอดสารตัวอย่างผ่านบัฟเฟอร์ในอ่างอิเล็กโทรดลงบนในช่องหรือหลุม (sample well) ที่เจาะไว้ตรงส่วนบนของแผ่นสแล็บเจล หรือลงบนผิวหน้าของเจลรูปแท่ง การหยอดสารตัวอย่างในลักษณะนี้ต้องเติมซูโครสร้อยละ 2-10 หรือกลีเซอรอลร้อยละ 5-10 ปริมาณเล็กน้อยในสารตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความหนาแน่นให้สูงกว่าบัฟเฟอร์ ทำให้สารตัวอย่างไม่ฟุ้งกระจายแพร่ปะปนในอ่าง นอกจากนี้ยังต้องเติมสีย้อมเป็น “tracking dye” ปริมาณน้อยประมาณร้อยละ 0.002 ลงในสารตัวอย่างด้วย สีย้อมที่เหมาะสมสำหรับบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างคือ โบรโมฟีนอลบลู (bromophynol blue) ส่วนสีย้อมชนิดเมธิลลีนกรีน (methylene green) และเมธิลลีนบลู (methylene blue) หรือ ไพโรนีน (pyronine Y) เหมาะสำหรับบัฟเฟอร์ที่เป็นกรด “tracking dye” เป็นตัวแสดงถึงการสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส เนื่องจากมันเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่สูงกว่าส่วนประกอบที่เป็นแมคโครโมเลกุลในสารตัวอย่าง เพราะฉะนั้นเมื่อสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ถึงบริเวณห่างจากปลายอ้างอิง (reference point) ในการเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ ในสาร ตัวอย่าง เมื่อหยอดสารตัวอย่างแล้วให้เริ่มต้นทำอิเล็กโทรโฟรีซีสทันที เพื่อหลีกเลี่ยงการแพร่ของสารในสารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.17 **อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ SDS – พอลิอะคริลาไมด์เจล** (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis , SDS-PAGE)

ในปัจจุบันการทำ PAGE มักนิยมใช้สารซักฟอกที่มีชื่อว่าโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต หรือ SDS ในระบบบัฟเฟอร์ร่วมกับสารที่สารละลายพันธะไดซัลไฟด์(disulfide bond) การทำ PAGE ที่มี SDS – PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนและหามวลโมเลกุลของมัน SDS เป็นสารซักฟอกแอนไอออนิก (anionic detergent) ที่มีประจุลบ สามารถจับกับสายโซ่พอลิเพปไทด์ด้วยอัตราส่วนที่คงที่ คือ SDS 1.4 กรัมต่อสายโซ่พอลิเพปไทด์ 1 กรัม SDS –พอลิเพปไทด์คอมเพลกซ์ (SDS-polypeptide complex) นี้มีรูปร่างเป็นแท่ง(rod shape) เนื่องจากสายโซ่โพลีเพปไทด์เมื่อถูกจับด้วย SDS จะคลายการขดม้วนออกเป็นสายยาว มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 18 อังสตรอม ซึ่งคงที่ในขณะที่ความยาวของคอมเพลกซ์จะเป็นสัดส่วนกับมวลโมเลกุลของสายโซ่พอลิเพปไทด์ คอมเพลกซ์นี้มีประจุลบ (เนื่องจากประจุของ SDS ไปบดบังประจุของโปรตีน) มีอัตราส่วนของประจุต่อมวลหรือมีความหนาแน่นของประจุคงที่เท่ากันและมีรูปร่างเหมือนกัน จึงทำให้การเคลื่อนที่ของสายโซ่พอลิเพปไทด์ขึ้นกับมวลโมเลกุลของสายโซ่พอลิเพปไทด์และทุกคอมเพลกซ์จะเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันคือเข้าหาขั้นบวก เมื่อเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน ที่ทราบมวลโมเลกุล จะทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของสายโซ่พอลิเพปไทด์ และจากวิธีการย้อมสีทำให้ทราบถึงจำนวนหน่วยย่อยหรือจำนวนสายโซ่พอลิเพปไทด์ ใน “native protein”

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการศึกษาน้อยเป็นไมโครกรัม มีประโยชน์ในการศึกษาพวกเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายหน่วย โปรตีนที่ถูกแยกโดย SDS-PAGE สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆ ต่อไปได้ โดยการชะแต่ละแถบที่แยกออกจากกันจากเจลแล้วกำจัด SDS หรือสารเคมีอื่นๆ จากนั้นจึงนำไปศึกษา เช่น วิเคราะห์กรดอะมิโน แผนที่เพปไทด์(peptide map) หาปลาย N- หรือปลาย C- เป็นต้น

สารผสมโปรตีนที่ต้องการแยกและหามวลโมเลกุลต้องถูกทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติ โดยให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ละลายหรือเจือจางสารผสมโปรตีนต้องมี SDS ปริมาณมากเกินพอ และมีสารไธออล (thiol reagent) ทำหน้าที่เป็นตัวรีดิวซ์ (reduce) สลายพันธะไดซัลไฟด์ สารไธออลที่นิยมใช้คือ 2-เมอร์แคปโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) หรือ β -เมอร์แคปโตเอธานอล และไดไธโอไธรทอล (dithiothreitol หรือ DTT) DTT มีข้อดีคือ ไม่มีกลิ่นและเป็นสารรีดิวซ์ซิง (reducing agent) ที่ให้ผลเท่ากันกับ 2-เมอร์แคปโตเอธานอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.17.1 คุณสมบัติของ SDS-PAGE

2.17.1.1 การเลือกความเข้มข้น

การแยกโปรตีนหรือพอลิเพปไทด์จะได้ผลดีหรือไม่นั้นอยู่กับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์และบิส ถ้าใช้ความเข้มข้นของเจลที่ผิดจะทำให้โปรตีนไม่สามารถผ่านเจลได้ หรือทำให้โปรตีนผ่านเจลไปได้อย่างรวดเร็วพร้อมๆ กับ "tracking dye" เพราะฉะนั้นจึงต้องเลือกความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนที่ศึกษา ถ้าทราบช่วงมวลโมเลกุลของพอลิเพปไทด์ผสมก็สามารถเลือกความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมได้จากกราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่างมวลโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่ ตัวอย่างเช่น %T = 10 (อัตราส่วนของอะคริลาไมด์ต่อบิส = 37:1) การแยกจะได้ผลดีในช่วงมวลโมเลกุล 10,000 – 70,000

2.17.1.2 การเลือกระบบบัฟเฟอร์

ระบบบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนระบบทริส-โซเดียมอะซีเตตได้ถูกดัดแปลงโดยลดความเข้มข้นของ SDS ในบัฟเฟอร์เป็นร้อยละ 0.1 เพื่อให้ผลการแยกดีขึ้น ระบบอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ (imidazole buffer system) มีการนำไฟฟ้าที่ต่ำกว่าระบบฟอสเฟตมาก จึงใช้เมื่อต้องการแยกสารโดยเร็วหรือเมื่อใช้ฟอสเฟตไม่ได้

2.17.1.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE อาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ เช่น การสลายพันธะไดซัลไฟด์เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์หรือมีการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic degradation) ในสารตัวอย่างโดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อผสม SDS และ 2-เมอร์แคปโตเอธานอลในสารตัวอย่างแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพราะฉะนั้นการเตียมสารตัวอย่างสำหรับ SDS-PAGE จึงจำเป็นต้องต้มสารตัวอย่างในน้ำเดือดนานอย่างน้อย 3 นาที หลังจากเติม SDS และ 2-เมอร์แคปโตเอธานอลลงในสารตัวอย่างเพื่อทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ้ายังไม่ใช้สารตัวอย่างทันทีให้เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บที่เย็น SDS จะตกผลึกจากสารละลาย เพราะฉะนั้นจึงต้องทำให้สารละลายอุ่นก่อนที่จะนำไปใช้ การต้มสารตัวอย่างจะทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ ทำให้โปรตีเอสไม่สามารถสลายโปรตีนที่สนใจในสารตัวอย่างได้

การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีเกลือความเข้มข้นสูงพบว่า การหามวลโมเลกุลของโปรตีนในช่วงมวลโมเลกุล 20,000 – 66,000 จะไม่ถูกรบกวนเมื่อมีเกลือ NaCl ในสารตัวอย่างสูงถึง 0.8 M อย่างไรก็ตามถ้าเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมฟอสเฟต pH 7.0 จาก 0.01M ไปเป็น 0.1 M ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารตัวอย่างจะมีผลต่อการหามวลโมเลกุล เพราะฉะนั้นมวลโมเลกุลของโปรตีนในช่วง 20,000 – 97,000 หาได้เมื่อมีเกลือความเข้มข้นสูงในสารตัวอย่างถ้าทั้งสารตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานมีปริมาณของเกลือและไอออนของบัฟเฟอร์เท่ากัน

ถ้าทำ SDS-PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งเจลรูปแท่งและสแล็บเจลต้องใส่ซูโครสเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของสารตัวอย่าง และใช้โบรโมฟีนอลบลูเป็น “tracking dye”

2.18 การย้อมสีเจล

2.18.1 วิธีการย้อมสีเจล (Gel Staining Method)

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

2.18.1.1 การย้อมโดยใช้โคแมสซีบลู

การย้อมสำหรับการตรวจวิเคราะห์การแยกโปรตีนโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลที่นิยมมากที่สุด คือ การย้อมโดยโคแมสซีบลู หรือ Coomassie Brilliant Blue R 250 (R มาจากคำว่า reddish hue และ 250 เป็นตัวเลขแสดงความเข้มของสี) สีย้อมโคแมสซีบลูนี้สามารถเก็บและใช้ได้หลายครั้ง และสามารถตรวจพบแถบของโปรตีนที่มีความเข้มข้นจำกัดประมาณ 1 ไมโครกรัมต่อแถบได้ ถ้าโปรตีนมีความเข้มข้นสูงการจับระหว่างสีย้อมและโปรตีนจะเริ่มไม่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการหาปริมาณของโปรตีนในเจล การย้อมด้วยวิธีนี้จะได้แถบที่สม่ำเสมอ เสถียรและเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องวัดความทึบแสง

หลังจากเสร็จสิ้นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์แล้ว ต้องตรึงโปรตีนในเจลโดยใช้ 12.5% TCA นาน 30 นาที แล้วจึงย้อมเจลโดยแช่ในสารละลายเจือจาง 1:20 ของสารละลาย โคแมสซีบลู R 250 ร้อยละ 1 ใน TCA ร้อยละ 12.5 นาน 1 ชั่วโมง สีย้อมจะซึมผ่านเข้าไปในเจลทำให้จับกับโปรตีนได้ดีขึ้น เพราะฉะนั้นแถบของโปรตีนจะมีสีเข้มขึ้น เมื่อย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงล้างสีย้อมด้วยสารละลายสีย้อมจนกระทั่งพื้นหลังปราศจากสีย้อมและเห็นแถบของโปรตีนเด่นชัดขึ้น แถบโปรตีนจะคงสีเข้มอยู่ระหว่าง 1-2 วัน ถ้าแถบมีสีจางมาก อาจเพิ่มความเข้มของสีได้โดยเติมสีย้อม 2-3 หยด ในกรดอะซีติกร้อยละ 7 แล้วแช่เจลค้างคืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.18.1.2 กลไกการย้อมด้วยโคแมสซีบลู

การย้อมด้วยโคแมสซีบลูต้องการตัวกลางที่เป็นกรดเพื่อให้เกิดแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) ระหว่างโมเลกุลของสีย้อมกับหมู่อะมิโนของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีแรงแวนเดอร์วาลล์ที่ทำให้เกิดคอมเพลกซ์ระหว่างสีย้อมและโปรตีนรวมทั้งพันธะนอน-โควาเลนท์ (non-covalent bond) ระหว่างสีย้อมกับบริเวณไม่โพลาร์ (non-polar region) บนโมเลกุลของโปรตีน การที่โคแมสซีบลูให้สีที่เข้มกว่าการย้อมด้วยสีอินทรีย์อื่นๆ เนื่องจากมีพันธะเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของสีย้อม โดยโมเลกุลสีย้อมจะใช้พันธะนี้ไปจับกับโมเลกุลสีย้อมในคอมเพลกซ์ ซึ่งจับกับโปรตีนด้วย พันธะไอออนิก (ionic bond) และพันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bond)

วิธีการย้อมโดยใช้โคแมสซีบลู R 250 มีหลายวิธีซึ่งแตกต่างกันที่สารละลายตรึงและสารละลายสีย้อม โดยทั่วไปใช้ TCA กรดซัลโฟซาลิไซลิก เมธานอลหรือเอธานอล การย้อมโดยใช้โคแมสซีบลูอีกวิธีหนึ่งคือใช้ Coomassie Brilliant Blue G 250 (G ย่อมาจากคำว่า greenish hue) หรือ Xylene Cyanine Brilliant G โดยโคแมสซีบลู G 250 นี้เป็น dimethylated form ของโคแมสซีบลู R 250 โคแมสซีบลู G 250 นี้ละลายได้เพียงเล็กน้อยใน TCA ร้อยละ 12 ทำให้สารละลายมีลักษณะของสารแขวนลอย เมื่อตรึงเจลด้วย TCA ร้อยละ 12.5 นาน 5 นาที แล้วย้อมด้วย 0.25% (w/v) โคแมสซีบลู G 250 นาน 30 นาที หลังจากนั้นแช่เจลในสารละลายกรดอะซีติกร้อยละ 5 แถบโปรตีนจะปรากฏให้เห็นชัดในสารละลายกรดอะซีติกร้อยละ 5 เนื่องจากสีย้อมที่ไปจับกับโปรตีนจะละลายและแพร่เข้าไปในเจลไปจับกับโปรตีนที่บริเวณภายในได้ ลักษณะของสารแขวนลอยของสีย้อมชนิดนี้จะไม่สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเจลได้ ทำให้ย้อมโปรตีนได้อย่างรวดเร็วโดยที่ไม่มีพื้นหลังที่มีสีเข้ามารบกวน

2.18.1.3 การย้อมด้วยเอนไซม์ (Enzyme Stain)

การย้อมด้วยเอนไซม์เป็นการตรวจวัดโปรตีนที่จำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งหรือเป็นการตรวจวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ หลังจากที่ทำการแยกโปรตีนโดยใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เพราะฉะนั้นจึงต้องระมัดระวังเพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียแอกติวิตีในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันต้องทำ pre-electrophoresis เพื่อกำจัดมอโนเมอร์ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา และกำจัดเพอร์ซัลเฟตออกไป ต้องเลือกค่าพีเอชที่ทำให้เอนไซม์เสถียรและควรทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่อุณหภูมิต่ำ

การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ทำได้โดยตัดเจลมาชะด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วนำสารละลายที่ได้มาหาแอกติวิตี แต่จะมีปัญหาเกิดขึ้นเมื่อมีสารตัวอย่างจำนวนมาก และยิ่งกว่านั้นถ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการเคลื่อนที่ของโปรตีน (เอนไซม์) 2 ชนิดที่แตกต่างกันเล็กน้อยจะทำให้การตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด นี้ผิดพลาดได้

การย้อมด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในปัจจุบันเกี่ยวข้องกับสีย้อมที่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอน เช่น ไนโตรบลูเททระโซเลียม (nitroblue tetrazolium หรือ NBT) และเมธิลไธอะโซลอิล เททระโซเลียม (methyl thiazolyl trtrazolium หรือ MTT) สีย้อมพวกนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เมื่อถูกรีดิวซ์โดยตัวให้อิเล็กตรอนแล้วจะเกิดเป็นฟอร์มาแซน (formazan) ที่ไม่ละลายน้ำและมีสีน้ำเงินเข้ม ปฏิกิริยานี้มีสารฟีนาซีนเมโธซัลเฟต (phenazine methosulfate หรือ PMS) ทำหน้าที่เป็นพาหะ (carrier) ของไฮไดร์ด-ไอออน (hydride-ion) ระหว่างโคเอนไซม์ในรูปรีดิวซ์ (reduced ceenzyme) หรือหมู่พรอสเธติก (prosthetic group) ของเอนไซม์ และเกลือเททระโซเลียม เมื่อมีแอกติวิตีของเอนไซม์จะทำให้เกิดรูปรีดิวซ์ ของโคเอนไซม์ NAD^+ หรือ $NADP^+$ ไปเป็น $NADH + H^+$ หรือ $NADPH + H^+$

การตรวจสอบโดยวิธีการย้อมด้วยเอนไซม์นี้จะขึ้นอยู่กับการรักษาแอกติวิตีของเอนไซม์ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสได้มากน้อยแค่ไหน เพราะฉะนั้นจึงต้องหาค่าพีเอชและส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่จะรักษาแอกติวิตีของเอนไซม์ที่สนใจให้คงอยู่ไม่ให้สูญเสียไป (อาภัสรา,2537)

รูปที่ 11 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสีย้อมกับเอนไซม์จำพวกดีไฮโดรจีเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เห็ดที่ใช้ในการทดลอง

- เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer)
- เห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc)
- เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus abalonus* Hon et al. Sp)
- เห็ดภูฐาน (*Pleurotus sajor-caju*(Fr.)Sing.)
- เห็ดแครง (*Schizophyllum commune*)

อุปกรณ์

- จานเพาะเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส
- ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร
- เครื่อง centrifuge แบบควบคุมอุณหภูมิ
- บีกเกอร์ 500 มิลลิลิตร
- เครื่องกรองแบบใช้ความดัน
- กระดาษกรอง เบอร์ 1
- ที่ใส่หลอดทดลอง (rack) และหลอดทดลอง
- ขวดกระทิงแดง (ใส่สารเคมี)
- เครื่องแช่แข็งแบบ Ultra Low Temperature
- ไนโตรเจนเหลว
- โกร่งบด
- เครื่อง spectrophotometer
- ไมโครคิวเวตต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 เตรียมเส้นใยของตัวอย่างเห็ดสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

1. เลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2. ใช้หลอดทนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะลงบนเส้นใยที่เจริญเต็มที่จากบริเวณขอบของโคโลนีใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายชิ้นวุ้นลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) อยู่ 75 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

- เห็ดนางรม : 5, 7, 9, 12 วัน
- เห็ดภูฐาน : 5, 7, 9, 12, 14 วัน
- เห็ดแครง : 5, 7, 9, 13 วัน
- เห็ดเป๋าฮื้อ : 12, 14, 16, 18, 19 วัน
- เห็ดตีนแรด : 12, 14, 16, 18, 19 วัน

หมายเหตุ : ระยะเวลาการบ่มขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของเห็ดแต่ละชนิด

3. นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB มากรองด้วยกระดาษกรอง ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แล้วซับเส้นใยให้แห้งด้วยกระดาษกรองหลังจากนั้นนำมาบดด้วยโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติม Tris-HCL buffer 80 ไมโครลิตร รักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง

4. นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. เก็บส่วนใสที่ได้(เซลล์สกัด)ใส่ eppendorf และนำไปแช่ในตู้แช่แข็ง - 80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสต่อไป

3.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี

1. นำเซลล์สกัดที่เตรียมไว้เติมลงในสารละลายผสมของเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร สารละลาย NAD^+ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และTris-HCl buffer (pH 7.5) 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เติมให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตรโดยใช้ไมโครคิวเวตต์ (ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนเซลล์สกัด)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในไมโครคิวเวตต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

3. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย NADH ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้น เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของสารละลาย NADH

4. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

โดย 1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (1 unit/ml) หมายถึง อัตราการเกิด NADH 1 ไมโครโมลต่อนาที ในขณะที่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งคำนวณได้ตามสูตร (อารี,2546)

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

3.3 ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค Electrophoresis แบบ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

3.3.1 การเตรียม polyacrylamide gel แบบ slab gel

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล

2. ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่น ๆ โดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75 -1.0 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใช้โดยใส่ stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1.0-2.0 เซนติเมตร หรือเหนือ separating gel

3. เตรียมสารละลาย separating gel ดังนี้คือ เติมสารละลาย acrylamide-bis 2.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่น 2 ครั้ง 4.85 ไมโครลิตร และ 1.5 M Tris-HCl , pH 8.8 2.5 ไมโครลิตร ลงในบีกเกอร์ 50 มิลลิลิตร

4. เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร วนขวดให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่มีฟองอากาศ

5. เทสารละลายของเจลลงบนช่องว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ให้เหลือระยะห่างจากขอบบน 2-3 เซนติเมตร จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งให้แข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. เตรียมสารละลายของ stacking gel โดยเติมสาร acrylamide-bis 1.33 ไมโครลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 6.1 ไมโครลิตร และ 0.125 M Tris , pH 6.8 2.5 ไมโครลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

7. เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร วนขวดให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่มีฟองอากาศ เทสารละลายของ stacking gel บน separating gel ใส่หวี (template comb) ลงใน stacking gel ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

3.3.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำส่วนใสของเห็ดนางรม เห็ดภูฐาน เห็ดแครง เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดตีนแรด มาตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตรต่อการทำอิเล็คโทรโฟรีซิส 1 ตัวอย่าง โดยผสมสารตัวอย่างกับสารละลาย sample buffer 5 ไมโครลิตร ก่อนใส่ในช่องตัวอย่างบนเจล

3.3.3 การใส่สารตัวอย่าง

หยอดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ลงบนเจลแต่ละช่องอย่างช้าๆ ช่องละ 1 ตัวอย่าง ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

3.3.4 การผ่านกระแสไฟฟ้า

ผ่านกระแสไฟฟ้า 70 มิลลิแอมแปร์ โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ลงมาจนระดับของสีของ sample buffer ที่ผสมในสารละลายตัวอย่างอยู่ห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที จึงหยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส (สุขใจ,2547)

3.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

1. นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลาย ง 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตัวอย่าง ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เติม Folin-Ciocalteu reagent 1 N 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในข้อ 2 ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้สีเกิดอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้หาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

4. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0, 50,100 150, 200, 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 1-3 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรและความเข้มข้นของสารละลาย bovine serum albumin

5.ถ้าในตัวอย่างมีโปรตีนสูงกว่าช่วงกราฟมาตรฐาน ต้องเจือจางตัวอย่างให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ (นวลพรรณ,2540)

3.5 หามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ LMW marker kit เป็น marker

3.5.1 การเตรียม SDS-PAGE Slab Gel (Separating gel และ stacking gel)

ตารางที่ 2 การเตรียม SDS-PAGE Slab Gel

	SDS-PAGE		
	12%[a]	7.5%[b]	4%[c]
Deionized water	3.35 ml	4.85 ml	6.1 ml
1.5 M Tris-HCl , pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% (w/v) SDS stock	100 µl	100 µl	100 µl
Acrylamide/bis (30%stock)(degas 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง)	4.0 ml	2.5 ml	1.33 ml
10%ammonium persulfate[d] (เตรียมสดเมื่อใช้)	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
TOTAL MONOMER	10 ml	10 ml	10 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[a,b] Separating gel preparation 0.375 M Tris , pH 8.8

[c] Stacking gel preparation 4.0% gel ,0.125 M Tris , pH 6.8 ปริมาตรเพียงพอสำหรับเจล 2 แผ่น

[a] สำหรับโปรตีนที่เติม SDS ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 10-100 k daltons

[b] สำหรับโปรตีนที่เติม SDS ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 40-250 k daltons

[d] เตรียมก่อนใช้เท่านั้น โดยละลาย 100 มิลลิกรัม ใน deionized water 1 มิลลิลิตร

ก่อนการเตรียมเจลให้ตั้งสารละลายทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง การผสมสารให้เรียงลำดับจาก deionized water, 1.5 M Tris-HCl , pH 8.8, 10 %(w/v) SDS , Acrylamide/bis ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้น degas เพื่อกำจัดฟองอากาศอย่างน้อยที่สุด 15 นาที แล้วเติม TEMED และ 10% ammoniumpersulfate ตามลำดับ ถ้าเกิดเจลช้าสามารถเพิ่มปริมาณ 10 % ammoniumpersulfate ได้ หรือถ้าเกิดเจลเร็วเกินไปสามารถลดปริมาณ 10 % ammonium persulfate ได้

3.5.2 ขั้นตอนการเตรียมเจล

(1) เตรียมสารละลายสำหรับ Separating gel ทั้งหมดยกเว้น TEMED และ ammonium persulfate นำไปกำจัดก๊าซอย่างน้อย 15 นาที

(2) วางหวี(comb) ลงไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก ใช้ปากกาทำเครื่องหมายบนแผ่นกระจกตรงบริเวณต่ำจากปลายฟันของหวี 1 เซนติเมตร ระดับที่ทำเครื่องหมายคือความสูงของ separating gel นำเอาหวีออก

(3) เติม TEMED และ ammonium persulfate ในสารละลายที่นำไปกำจัดก๊าซแล้ว ผสมสารละลายให้เข้ากันปิเปต สารละลายลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก บริเวณกลางแผ่นกระจกอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอเพื่อป้องกันไม่ให้ผสมกับอากาศจนถึงขีดเครื่องหมาย

(4) ปิดผิวหน้าของสารละลายโดยหยอดน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลโดยหยอดอย่างช้า ๆ เพื่อป้องกันไม่ให้ผสมกับสารละลาย separating gel และทำให้ผิวหน้าเจลเรียบ

(5) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา polymerization ประมาณ 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง

(6) เตรียมสารละลายสำหรับ stacking gel ทั้งหมดยกเว้น TEMED และ ammonium persulfate นำไปกำจัดก๊าซอย่างน้อย 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(7) วางหวีลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกให้เอียงทำมุม 10 องศา เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศใต้ฟันของหวีในขณะที่ปิเปตสารละลาย เติม TEMED และ ammonium persulfate ในสารละลายที่กำจัดก๊าซแล้ว ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกบริเวณใกล้กับด้านแหงนของหวีอย่างช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายท่วมฟันของหวี วางหวีให้ตรงและปิเปตสารละลายให้ถึงปลายบนสุด

(8) ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา polymerization ประมาณ 30-45 นาที ดึงหวีออกอย่างช้าๆ

(9) ล้างช่องหรือหลุมสำหรับหยอดสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น หรือ running buffer จะได้เจลที่พร้อมทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.5.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

คำนวณปริมารโปรตีนประมาณ 50-100 ไมโครกรัมต่อ 1 ช่อง

เจือจางสารละลายตัวอย่าง อย่างน้อย 1 : 4 ด้วย sample buffer และให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสนาน 4 นาที

3.5.4 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

(1) เตรียม electrode buffer 300 มิลลิลิตร โดยผสม 5x electrode buffer 60 มิลลิลิตร กับ deionized water 240 มิลลิลิตร

(2) วาง inner cooling core ลงใน lower buffer chamber เท electrode buffer ประมาณ 115 มิลลิลิตรลงใน lower buffer chamber จนกระทั่งถึงระดับกึ่งกลางแผ่นกระจก

(3) เท electrode buffer ที่เหลือลงใน upper buffer chamber จนกระทั่งท่วมเจล ไล่ฟองอากาศออกให้หมดโดยใช้ปิเปตกวนเบาๆ

(4) ใส่สารละลายตัวอย่างปริมาตร 3-5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่องโดยที่ช่องแรกและช่องสุดท้ายใส่สารละลาย marker ที่มี electrode buffer ท่วมอยู่

(5) ปิดฝาบน lower buffer chamber

(6) ตั้ง power supply คงที่ 200 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 70 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล (120 มิลลิแอมแปร์ต่อ 2 เจล) ใช้เวลาประมาณ 45 นาที ในระหว่าง 45 นาทีกระแสไฟฟ้าจะลดลงอย่างช้าๆ จนถึงประมาณ 30 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(7) เมื่อครบเวลา 45 นาที ปิด power supply เปิดฝาบนออก นำเอา inner cooling core ออกจาก lower buffer chamber เท upper buffer ออก นำแผ่นเจลออกมาเพื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ bromphynol blue (tracking dye) เสร็จแล้วจึงเอาเจลออกจากแผ่นกระจกมาย้อมสี

3.5.5 การย้อมสีด้วย Coomassie Blue

(1) ย้อมสีเจลด้วย 0.25% Comassie blue R-250 ในสารละลาย Destaining นาน 30 นาที

(2) ล้างสีย้อมหลายครั้งด้วยสารละลาย Destaining ประมาณ 1-3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดสีที่พื้นหลังจนกระทั่งเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

3.5.6 การวิเคราะห์ผล

เมื่อได้แถบสีของโปรตีนที่แยกออกจากกันแล้ว ถ่ายรูปเจลเก็บไว้แล้ววัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละแถบสี เพื่อนำไปคำนวณหาค่า R_f หรือใช้เครื่อง densitometer อ่านและวิเคราะห์ผลจากแผ่นเจล

3.5.7 การเก็บแผ่นเจล

แช่เจลในสารละลาย 10% glycerol นาน 30 นาทีเพื่อไม่ให้เจลแตก แช่แผ่นเซลโลเฟน (cellophane) 2 แผ่น ในสารละลาย glycerol นาน 10 นาที วางแผ่นเจลระหว่างเซลโลเฟน 2 แผ่นที่เปียก อย่าให้มีฟองอากาศระหว่างเจลและรอบ ๆ ขอบเจลมิเช่นนั้นเจลจะแตก ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งค้างคืน จะได้แผ่นเจลที่แห้ง การทำให้เจลแห้งถ้าเจลหนาเกินไป เช่น หนาเกิน 1.5 มิลลิเมตร เจลจะแตกได้ในระหว่างทำให้แห้ง

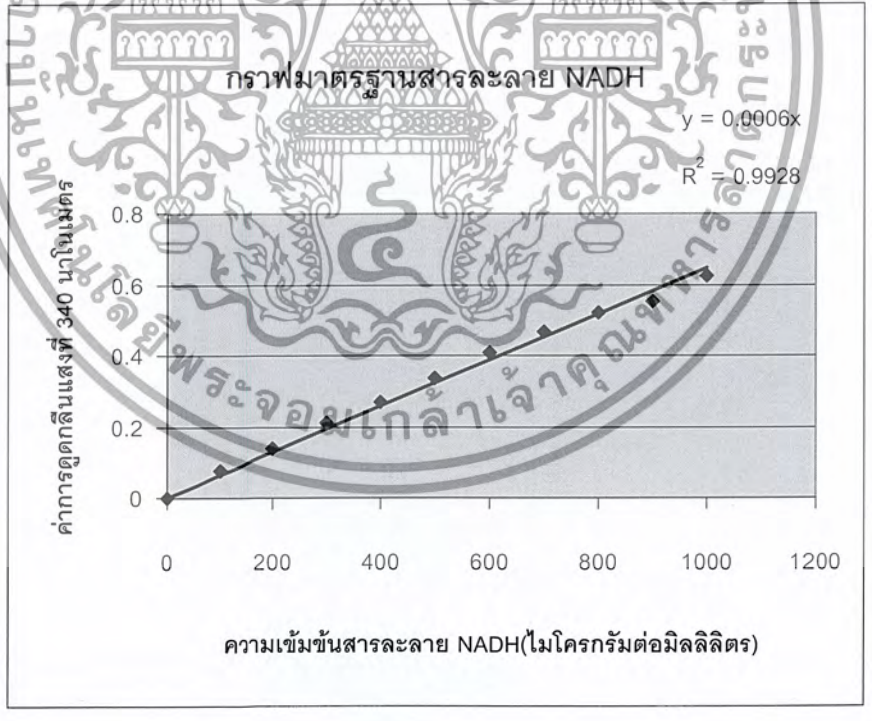
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี

เติมสารละลาย ethanol 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร สารละลาย NAD^+ 1 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร และสารละลาย Tris - HCl 200 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรลงในไมโครคิวเวตต์ จากนั้นเติมเซลล์สกัดลงไปให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 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 12 กราฟมาตรฐานสารละลาย NADH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำค่าการดูดกลืนแสงของเห็ดแต่ละชนิดไปหาปริมาณ NADH ที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย NADH จากนั้นนำปริมาณ NADH ที่ได้ไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากสูตร (อารี,2546)

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

กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดแต่ละชนิดเป็นดังนี้

ตารางที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดภูฐาน

เห็ดภูฐาน	กิจกรรมของเอนไซม์ ADH (unit/ml)
วันที่ 5	2.07
วันที่ 7	2.09
วันที่ 9	2.41
วันที่ 12	2.05
วันที่ 14	2.03

ตารางที่ 4 กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดตีนแรด

เห็ดตีนแรด	กิจกรรมของเอนไซม์ ADH (unit/ml)
วันที่ 12	0.42
วันที่ 14	0.40
วันที่ 16	1.19
วันที่ 18	1.09
วันที่ 20	0.34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดเป๋าฮื้อ

เห็ดเป๋าฮื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ ADH (unit/ml)
วันที่ 12	1.32
วันที่ 14	1.66
วันที่ 16	1.73
วันที่ 18	2.03
วันที่ 20	1.73

ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดนางรม

เห็ดนางรม	กิจกรรมของเอนไซม์ ADH (unit/ml)
วันที่ 5	1.43
วันที่ 7	2.29
วันที่ 9	2.53
วันที่ 12	1.53

ตารางที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดแครง

เห็ดแครง	กิจกรรมของเอนไซม์ ADH (unit/ml)
วันที่ 5	4.46
วันที่ 7	4.84
วันที่ 9	3.59
วันที่ 13	2.51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค Electrophoresis แบบ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

รูปที่ 13 แถบสีที่เกิดจากการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในครั้งที่ 1

หมายเหตุ : 1 = แถบสีของเห็ดเป๋าฮื้อ

2 = แถบสีของเห็ดแครง

3 = แถบสีของเห็ดภูฐาน

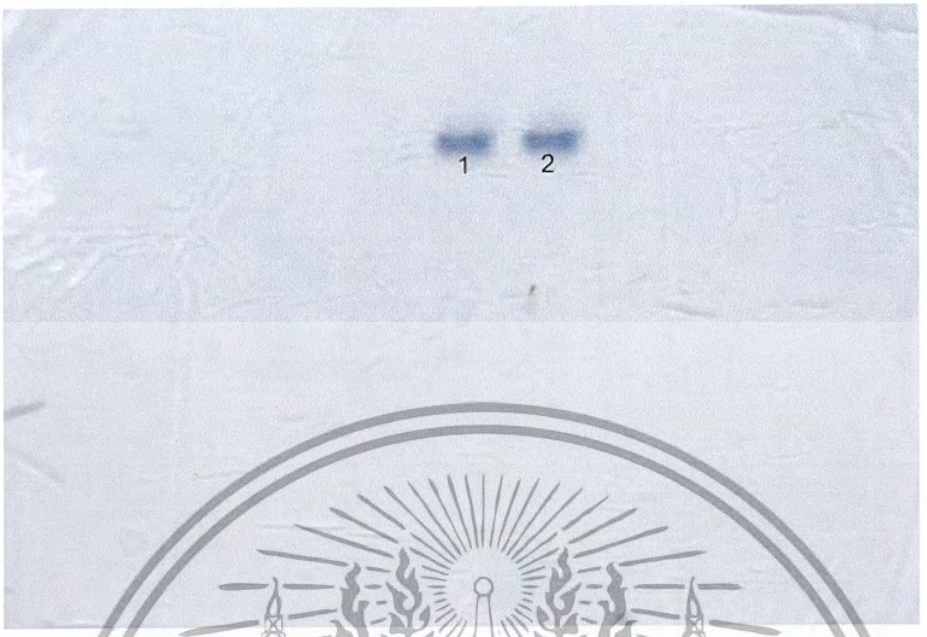
4,5 = แถบสีของเห็ดนางรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 14 แถบสีที่เกิดจากการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในครั้งที่ 2

หมายเหตุ : 1,2 = แถบสีของเห็ดนางรม
3,4 = แถบสีของเห็ดภูฐาน
5,6 = แถบสีของเห็ดเป๋าฮื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



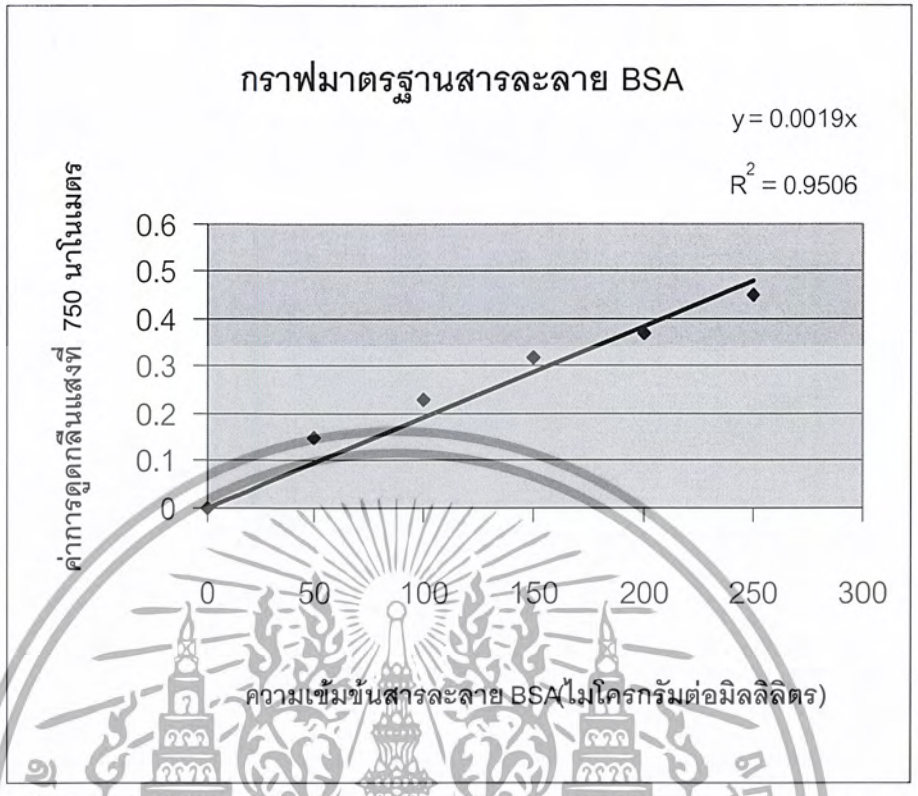
รูปที่ 15 แถบสีที่เกิดจากการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในครั้งที่ 3

หมายเหตุ : 1,2 = แถบสีของเห็ดแครง

4.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

นำเซลล์สกัดของเห็ดแต่ละชนิดมาหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร และทำกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA โดยใช้ความเข้มข้น 0,50,100,150,200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานสารละลาย BSA

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของเห็ดแต่ละชนิดที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย BSA เพื่อหาปริมาณโปรตีน

ตารางที่ 8 ปริมาณโปรตีนของเห็ดแต่ละชนิด

ชนิดของเห็ด	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	เฉลี่ย
เห็ดแครง	73473.68	69052.63	71263.16
เห็ดนางรม	88000.00	86526.32	87263.16
เห็ดภูฐาน	82315.79	82736.84	82526.32
เห็ดตีนแรด	66736.84	64000.00	65368.42
เห็ดเป๋าฮื้อ	83157.89	84842.11	84000.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 หามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ LMW marker kit เป็น marker

รูปที่ 17 แถบสีที่เกิดจากการทำ (SDS - PAGE) ในครั้งที่ 1

หมายเหตุ : M = แถบสีของ LMW marker kit
ร = แถบสีของเห็ดนางรม
ภ = แถบสีของเห็ดภูฐาน
ค = แถบสีของเห็ดแครง
ป = แถบสีของเห็ดเป๋าฮื้อ
ต = แถบสีของเห็ดตีนแรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 18 แถบสีที่เกิดจากการทำ (SDS - PAGE) ในครั้งที่ 2

หมายเหตุ : M = แถบสีของ LMW marker kit
ภ = แถบสีของเห็ดภูฐาน
ค = แถบสีของเห็ดแครง
ร = แถบสีของเห็ดนางรม
ป = แถบสีของเห็ดเป๋าฮื้อ
ต = แถบสีของเห็ดตีนแรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี

จากการทดลองเมื่อทำการเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่ระยะเวลาต่าง ๆ เพื่อนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีทางเคมี พบว่าเห็ดแครงมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือ เห็ดนางรม เห็ดภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดตีนแรดตามลำดับ ซึ่งค่ากิจกรรมสูงสุดที่วัดได้ของเห็ดแต่ละชนิดเป็นดังนี้

- เห็ดแครง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 4.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 7 วัน
- เห็ดนางรม มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 2.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 9 วัน
- เห็ดภูฐาน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 2.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 9 วัน
- เห็ดเป๋าฮื้อ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 1.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 18 วัน
- เห็ดตีนแรด มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 0.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 16 วัน

5.2 ตรวจสอบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค Electrophoresis แบบ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยเทคนิค PAGE นั้นพบว่าแถบสีที่เกิดขึ้นของเห็ดแต่ละชนิดนั้นแถบสีของเห็ดแครงมีความชัดเจนและมีขนาดใหญ่ที่สุด แสดงว่าเห็ดแครงมีปริมาณของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสสูงที่สุด รองลงมา คือ เห็ดภูฐาน เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ ตามลำดับ ส่วนเห็ดตีนแรดนั้นไม่เกิดแถบสีจากการทำ PAGE เนื่องจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในเห็ดตีนแรดนั้นมีน้อยมาก ซึ่งการทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อยืนยันผลของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีเคมี เพราะให้ผลการทดลองที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรงกัน และการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธี PAGE นี้เป็นการทดลองที่ยืนยันผลว่าเห็ดแต่ละชนิดนั้นมีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจริง เนื่องจากแถบสีที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากปฏิกริยาเคมีที่เฉพาะเจาะจงของสีย้อมที่ใช้กับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของเห็ดแต่ละชนิดที่อยู่บนแผ่นเจล โดยเอนไซม์จะทำปฏิกริยากับ MTT และ PMS ในสีย้อมซึ่งมีเอทานอลเป็นสารตั้งต้น เกิดเป็นฟอร์มาแซน (formazan) ซึ่งมีสีน้ำเงินบนแผ่นเจล

5.3 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และหามวลโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยวิธี SDS-PAGE ใช้ LMW marker kit

จากการวัดปริมาณโปรตีนในเห็ดแต่ละชนิดเพื่อนำไปใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเห็ดแต่ละชนิดโดยเทคนิค SDS – PAGE พบว่าแถบสีที่เกิดขึ้นจากการย้อมสีแผ่นเจลด้วยสีย้อม Coomassie Blue นั้นมีแถบสีเกิดขึ้นในปริมาณมาก เนื่องจากว่าในเซลล์สกัดของเห็ดแต่ละชนิดนั้นประกอบด้วยโปรตีนมากมายหลายชนิด ซึ่งเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสก็เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งด้วยเช่นกัน ดังนั้น จึงไม่สามารถบอกได้ว่าแถบสีที่เกิดขึ้นนั้นแถบใดเป็นแถบของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสดังนั้นก่อนที่จะนำเซลล์สกัดมาหามวลโมเลกุลควรนำเซลล์สกัดนั้นไปทำให้บริสุทธิ์ เพื่อแยกเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในเห็ดแต่ละชนิดออกมาก่อนที่จะนำมาทำ SDS – PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา ทวีการ. 2546. การศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางยาของผลิตภัณฑ์จากเห็ดกินได้. สัมมนาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา. คณะวิทยาศาสตร์.สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.กรุงเทพฯ.

ปัญญา โพธิ์สุติรัตน์. 2532. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. ภาควิชาการผลิตพืช. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

สถาพร จิตตปาลพงศ์. ปฏิบัติการ western blotting. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส.

สุขใจ ชูจันทร์. 2546. เอกสารประกอบการสอนวิชาเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และ ไมตรี สุทธจิตต์. 2546. เห็ดสมุนไพรจากอดีตสู่ปัจจุบันและอนาคต. กรุงเทพฯ : ศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก.เอกสารอัดสำเนา

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2520. เห็ดเมืองไทย. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชย์. กรุงเทพฯ.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2546. เอกสารประกอบการสอนวิชาปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์.คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส. ภาควิชาสรีรวิทยา. คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Alexopoulos, C.J., Mino, C.W. and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology.4th ed. New York : John Wiley and Sons

Tokumitsu, O.M. et.al. 2001. Characteristics of Wine Produced by Mushroom Fermentation. Biosci. Biotechol. Biochem. 65(7) : 1596-1600.

Tokumitsu, O.M. et.al. Discovery of Alcohol Dehydrogenase From Mushroom and Application to Alcoholic Beverages. Journal of molecular catalysis : 1-12.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วัสดุและสารละลายที่ใช้ในการทำ PAGE (สถาพร,ม.ป.ป.)

1.Stock solution

- 30% T,2.7%C Acrylamide(29.2 กรัม Acrylamide และ 0.8 กรัม, Bisacrylamide ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรเก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส จะเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากเตรียม)

- 1.5 M Tris-HCL , pH 8.8 (Concentrated resolving gel buffer)

- 0.5 M Tris-HCL , pH 6.8 (Concentrated stacking gel buffer)

- Stock sample buffer (0.06 M Tris-HCL, pH 6.8, 10% Glyceral,0.025% Bromphenol blue)

เตรียมโดยผสมสารต่างๆในอัตราส่วนดังนี้

น้ำ	4.8	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCL , pH 6.8	1.2	มิลลิลิตร
Glyceral	1.0	มิลลิลิตร
0.5% Bromphenol blue (W/V)	0.5	มิลลิลิตร

2.Catalyst

- 10% Ammonium persulfate (APS) เตรียมก่อนที่จะใช้

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

3. Electrode buffer

Electrode buffer ประกอบด้วย

0.0025 M Tris base	0.3	กรัม
0.192 M Glycine	1.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH เป็น 8.3		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมี ในการทำ SDS-PAGE (สถาพร,ม.ป.ป.)

1. Acrylamide/bis (30%T ,2.67%C)

Acrylamide	14.6	กรัม
N N-bis-methylene-acrylamide	0.4	กรัม

ละลายและปรับปริมตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย deionized water กรองและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสในที่มืด (เก็บได้นานที่สุด 30 วัน)

2. 1.5 M Tris-HCl , pH 8.8

Tris base	18.15	กรัม
Deionized water	60	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 6 N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วย deionized water และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. 0.5M Tris-HCl , pH6.8

Tris base	6	กรัม
Deionized water	60	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 6 N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย deionized water และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย 10%SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ใน deionized water 90 มิลลิลิตร ภวนเบาๆ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย deionized water และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. Sample buffer (SDS reducing buffer) เก็บที่อุณหภูมิห้อง

Deionized water	1.9	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl , pH6.8	0.5	มิลลิลิตร
Glycerol	0.4	มิลลิลิตร
10% (w/v) SDS	0.8	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	0.2	มิลลิลิตร
10% (w/v) bromophenol blue	0.2	มิลลิลิตร
Total	4	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. 5X electrode (running) buffer , pH 8.3 (เพียงพอสำหรับการทำ 10 ครั้ง)

Tris base	6 กรัม (15 กรัมต่อลิตร)
Glycine	43.2 กรัม (72 กรัมต่อลิตร)
SDS	3 กรัม (5 กรัมต่อลิตร)

ปรับปริมาตรเป็น 600 มิลลิลิตร ด้วย deionized water และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส (ถ้าตกตะกอนให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้) ก่อนใช้ให้เจือจาง 5 เท่า

7. สารละลาย Stain: 0.25% Comassie blue R-250 ในสารละลาย Destaining (กรองก่อนใช้)
8. สารละลาย Destaining : 25% ethanol 10% acetic acid และ 65% deionized water
9. สารละลาย 10% glycerol

สารละลายสีย้อมเอนไซม์ ADH

0.2 โมล Tris-HCL buffer pH 7.0	40	มิลลิลิตร
0.5 โมล $MgCl_2$	0.2	มิลลิลิตร
เอทานอล 95%	3	มิลลิลิตร
NAD (1%ในน้ำ)	2	มิลลิลิตร
PMS (1%ในน้ำ)	0.5	มิลลิลิตร
NBT (1%ในน้ำ)	1	มิลลิลิตร
MTT (1%ในน้ำ)	0.3	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (นวลพรรณ,2540)

วิธีนี้เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย หลักการคือ เป็นการวัดความเข้มข้นของสีที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างโปรตีนกับสารที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สารที่ใช้คือ Alkaline copper sulfate และ Folin-Ciocalteu reagent ขั้นตอนในการเกิดสีแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. โปรตีนจะรวมตัวกับสารละลาย Alkaline copper sulfate ได้สารเชิงซ้อนคอปเปอร์โปรตีน (Copper-protien complex)

2. Folin-Ciocalteu reagent จะถูกรีดิวซ์ด้วยไทโรซีน (tyrosine) และทริปโทเฟน (tryptophan) ที่เหลืออยู่ในสารเชิงซ้อนคอปเปอร์โปรตีนได้สารละลายสีน้ำเงิน ดังนั้นโปรตีนต่างชนิดกันจะให้สีที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดอะมิโนไทโรซีนและทริปโตเฟนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีนชนิดนั้นๆ

วิธีนี้สามารถหาปริมาณโปรตีนที่อยู่ในช่วง 20 –200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารที่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry คือ Good's buff เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.15 ไกลซีน (glycine) ที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 0.5 และสาร mercaptan

สารเคมี

1. สารละลาย ก

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

2. สารละลาย ข

ละลายโพแทสเซียมตาเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$) 2.7 กรัม ในน้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

3. สารละลาย ค

สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร

4. สารละลาย ง

นำสารละลาย ก 100.0 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ข 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (สารละลายนี้เตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น)

5. Folin-Ciocalteu reagent 1N

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

6. สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin

ละลาย bovine serum albumin 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาทำให้เจือจางโดยให้มีความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ระหว่าง 25-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้