สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากเห็ดที่กินได้ (วงศ์ Auriculariaceae, Ganodermataceae และ Pleurotaceae) เพื่อผลิตไวน์ทดแทนเชื้อยีสต์

นายอิศรา เฉียนิวัตต์
นายเอกชนก เทียนทอง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 58548
วัน,เดือน,ปี 25 มิ.ย. 2549
.b.....
.i.....
เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Determination of alcohol dehydrogenase from edible mushroom (Family Auriculariaceae, Ganodermataceae and Pleurotaceae) on wine product substituted for using yeast

Mr. Itsara Jeaniwat

Mr. Aekchanok Thicuthong

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

หัวข้อโครงงานพิเศษ การวิเคราะห์หาเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จากเห็ดที่กินได้ (วงศ์ Auriculariaceae,Ganodermataceae และ Pleurotaceae) เพื่อผลิตไวน์ทดแทนเชื้อยีสต์

นักศึกษา นายอิศรา เจียนิวัตต์ รหัส 43050214

นายเอกชนก เทียนทอง รหัส 43050215

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์	.....
กรรมการ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชัต	.....
กรรมการ อาจารย์ลินจง สุขลำภู	.....

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากเห็ดที่กินได้ (วงศ์ Auriculariaceae,Ganodermataceae และ Pleurotaceae) เพื่อผลิตไวน์ทดแทนเชื้อยีสต์	
นักศึกษา	นายอิศรา	เจียนิวัตต์
	นายเอกชนก	เทียนทอง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สุขใจ	ชูจันทร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	2546	

บทคัดย่อ

ไวน์, เบียร์ และสาเกเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่นิยมดื่มกันทั่วโลก ได้มีการบันทึกว่ามนุษย์เริ่มดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มาเป็นเวลานับพันปี จุลินทรีย์ดั้งเดิมที่เป็นที่ยอมรับในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ได้ค้นพบเมื่อ 150 ปีก่อนผ่านงานของหลุยส์ ปาสเตอร์ ซึ่งโดยทั่วไปคือยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้กันมานานในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เนื่องจากมีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แต่ในปัจจุบันนี้เราได้ค้นพบว่าเห็ดบางชนิดก็มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเช่นกัน นับแต่โบราณมนุษย์รู้จักการบริโภคเห็ด ไม่ใช่รับประทานเพียงเพื่อให้อิ่มเท่านั้น แต่ยังรับประทานอย่างชื่นชอบเพราะว่ามันมีรสและกลิ่นที่ดีเลิศมาก นอกจากนั้นคุณค่าทางอาหาร, คุณสมบัติบำรุงกำลัง และคุณลักษณะทางยาของเห็ดหลายชนิดได้ถูกค้นพบกันมาเป็นเวลานานแล้ว เห็ดที่นิยมปลูกกันเป็นส่วนใหญ่มีปริมาณโปรตีนสูงทีเดียวคือร้อยละ 19 ถึง 35 รวมทั้งมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วนและมีปริมาณไขมันต่ำ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในช่วงร้อยละ 51 ถึง 88 และปริมาณไฟเบอร์ร้อยละ 4 ถึง 20 นอกจากนั้นเห็ดยังมีวิตามินเล็กน้อยรวมทั้งแร่ธาตุต่างๆ นอกเหนือไปจากคุณค่าทางอาหาร ได้มีรายงานแล้วว่าเห็ดบางชนิดที่นิยมในซีกโลกตะวันออก มีคุณสมบัติทางยาเช่น การต่อต้านเนื้องอก ต่อต้านไวรัส และลดปริมาณไขมัน เห็ดบางชนิด เช่น เห็ดนางรม, เห็ดนางฟ้า และเห็ดหลินจือ เป็นเห็ดที่นิยมบริโภคกันทั่วไป และอุดมไปด้วยไฟเบอร์, โปรตีน, ไทอามีน และไรโบฟลาวิน นอกจากนั้นยังมีสารช่วยป้องกันมะเร็งและสารช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพราะฉะนั้นเราจึงนำมาใช้ในการผลิตไวน์, เบียร์ และสาเก โดยใช้เห็ดแทนยีสต์ โดยหวังว่าผู้บริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จะได้รับสารช่วยป้องกันมะเร็งและสารช่วยป้องกันการแข็งตัวของเลือด ซึ่งจะช่วยบำรุงสุขภาพของผู้บริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Determination of alcohol dehydrogenase from edible mushroom (Family Auriculariaceae, Ganodermataceae and Pleurotaceae) on wine product substituted for using yeast
Name	Mr. Itsara Jeaniwat
	Mr. Aekchanok Thienthong
Special Project Adviser	Associate Professor Sukjai Choojun
Department	Applied Biology
Academic Year	2003

Abstract

Wine, beer and sake are popular alcoholic beverages consumed by many people around the world. The earliest written records indicate that alcohol (ethanol) has been enjoyed in the human diet for thousands of years. Its microbial origin was only established some 150 years ago through the work of Louis Pasteur. In general, *Saccharomyces cerevisiae* has long been used for producing alcoholic beverages since it has potent alcohol dehydrogenase activity. We have recently discovered that some mushrooms also possess alcohol dehydrogenase. Since ancient times mushrooms have been consumed by humans not only as a part of the normal diet but also as a delicacy because they have a highly desirable taste and aroma. In addition, the nutritional, tonic, and medicinal properties of mushrooms have been recognized for a long time. Mushrooms are quite high in protein (19–35%, including all the essential amino acids) and low in fat. Mushrooms also contain relatively large amounts of carbohydrate and fiber, ranging from 51 to 88% and from 4 to 20%, respectively, for the major cultivated species. In addition, mushrooms contain significant amounts of vitamins, as well as minerals. In addition to their nutritional value, some mushrooms popular in the Far East may also have a medicinal value; antitumor, antiviral, and hypolipidemic effects have been reported. Mushrooms such as *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju* and *Ganoderma lucidum* are commonly consumed, and are rich in fiber, protein and vitamins such as thiamin and riboflavin, in addition to having a preventive effect against cancer and thrombosis. We therefore produced wine, beer and sake with mushrooms and expected that consumption of these alcoholic beverages could have a preventive effect against cancer and thrombosis, as well as other health benefits.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสำเร็จได้ด้วยการสนับสนุนและการช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีอุปการะคุณหลายท่าน

ขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ เป็นท่านอาจารย์ที่ปรึกษา และกรรมการโครงงานพิเศษที่กรุณาเป็นอย่างยิ่งในการชี้แนะแนวทางการวิจัย ให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย และอำนวยความสะดวกในระหว่างการวิจัย ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ที่สุด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. พรรณี จิตาภิชัต และท่านอาจารย์ดินจง สุขลำภู ที่เป็นประธานกรรมการ และกรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยให้คำปรึกษาและข้อมูล และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการวิจัย และช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษสามารถสำเร็จได้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนขอบคุณรุ่นพี่และรุ่นน้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษมาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

นายอิศรา เจียนิวัตต์

นายเอกชนก เทียนทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญรูป ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขต 2

1.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ไวน์

2.1.1 ความหมาย 4

2.1.2 ประเภทของไวน์ 4

2.1.3 ประโยชน์และโทษของไวน์ 6

2.1.4 หลักการผลิตไวน์ 6

2.1.5 ขั้นตอนหลัก 9 ประการในการผลิตไวน์ 7

2.1.6 ข้อแตกต่างระระหว่างวิธีผลิตไวน์ขาวและไวน์แดงจากองุ่น 12

2.1.7 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักไวน์ 14

2.2 เห็ด

2.2.1 เห็ดหูหนู 19

2.2.2 เห็ดหลินจือ 22

2.2.3 เห็ดนางรม 24

2.2.4 เห็ดนางฟ้า 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3 ทฤษฎีของอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.3.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซน 32

2.3.2 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ 32

2.3.3 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต 33

2.3.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล 34

2.3.5 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแป้งเจล 34

2.3.6 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล 35

2.3.7 ผลของขนาดรูพรุน 40

2.3.8 อะคริลาไมด์ 41

2.3.9 บิส 42

2.3.10 ตัวเริ่มปฏิกิริยา 43

2.3.11 สารเติมแต่งในเจล 44

2.3.12 สารปนเปื้อนในบัฟเฟอร์ 45

2.3.13 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน 45

2.3.14 การเลือกระบบของเจลและบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม 46

2.3.15 คุณสมบัติของพอลิอะคริลาไมด์เจล 51

2.3.16 การเลือกระบบของบัฟเฟอร์ 51

2.3.17 การเลือกพีเอช 52

2.3.18 การเตรียมสารตัวอย่าง 52

2.3.19 การย้อมด้วยเอนไซม์ 53

2.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

2.4.1 คุณสมบัติของเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล 56

2.4.2 การใช้เจลที่มีเกรเดียนต์ของความเข้มข้น 57

2.4.3 คุณสมบัติของเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลแบบเกรเดียนต์ 58

2.4.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัส 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 การย้อมเจล

2.5.1 วิธีการย้อมสีเจล 65

2.5.2 การตรึง 65

2.5.3 การย้อมโดยใช้โคแมสซีบลู 66

2.5.4 กลไกการย้อมด้วยโคแมสซีบลู 66

2.6 การเตรียมสแล็บเจลในแนวตั้งตรง 67

2.7 เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 69

2.8 นิโคตินาไมด์หรือไนอาซินาไมด์ 70

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ชนิดของเห็ด 72

3.1.2 แหล่งที่มาของเชื้อเห็ด 72

3.2 วัสดุ-อุปกรณ์ และเครื่องมือ 72

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น 73

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสาร สกัดเซลล์เห็ด 73

3.3.3 การเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ดจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยง 74

3.3.4 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีการทางเคมี 74

3.3.5 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบ โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 74

3.3.6 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียม โดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 75

3.3.7 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อใน การหมักไวน์ 77

3.3.8 การทดสอบการหมักโดยใช้สารสกัดมอลล์ 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น 78

4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสาร
สกัดเซลล์เห็ด 82

4.3 ผลการเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ดจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยง 84

4.4 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีการทางเคมี 85

4.5 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบ
โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 87

4.6 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียม
โดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส 88

4.7 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อใน
การหมักไวน์ 89

4.8 ผลการทดสอบการหมักโดยใช้สารสกัดมอลต์ 91

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย 93

5.2 ข้อเสนอแนะ 94

บรรณานุกรม 95

ภาคผนวก 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แผนภูมิการผลิตไวน์ขาวจากองุ่น 15
รูปที่ 2 แผนภูมิการผลิตไวน์แดงจากองุ่น 16
รูปที่ 3 แผนภูมิการผลิตไวน์จากผลไม้ 17
รูปที่ 4 แสดงลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดหูหนู 21
รูปที่ 5 แสดงลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดนางรม 27
รูปที่ 6 เครื่องมือสำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ และแบบเซลลูโลสอะซีเตต 33
รูปที่ 7 โครงสร้างของอะคริลาไมด์ บิส และพอลิอะคริลาไมด์ 37
รูปที่ 8 โครงสร้างของสารเชื่อมโยงบางชนิด 44
รูปที่ 9 โครงสร้างของสารเติมแต่งในเจล 45
รูปที่ 10 ผลของความเข้มข้นของเจลต่อการเคลื่อนที่ของสาร 47
รูปที่ 11 เครื่องมือการทำ PAGE แบบสแล็บเจลในแนวนอน 50
รูปที่ 12 การทำ PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งแบบสแล็บเจลและเจลรูปแท่งในระบบ
สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันและระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน 51
รูปที่ 13 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้การย้อมด้วยเอนไซม์ 54
รูปที่ 14 แสดงสารไธออล 56
รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานเมื่อเขียนระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลและ $\log_{10}$ %T
สำหรับเกรเดียนสแล็บเจลช่วง 5-20 %T 59
รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลกับระยะทางการ
เคลื่อนที่เมื่อทำ SDS-PAGE โดยใช้สแล็บเจลที่ %T ต่างกัน 64
รูปที่ 17 สีย้อมโคแมสซีบลูที่ใช้ตรวจสอบการแยกโปรตีนโดยเทคนิค PAGE 67
รูปที่ 18 การเตรียมสแล็บเจลในแนวตั้งตรง 68
รูปที่ 19 โครงสร้างของกรดนิโคตินิกและนิโคตินาไมด์ 70
รูปที่ 20 นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NAD^+) และ
นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ($NADP^+$) 71
รูปที่ 21 แสดงเส้นใยเห็ดหูหนูบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน 78
รูปที่ 22 แสดงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน 79
รูปที่ 23 แสดงเส้นใยเห็ดนางรมทองบนอาหารวุ้น อายุ 35 วัน 79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 24 แสดงเส้นใยเห็ดนางนวลบนอาหารวุ้น อายุ 32 วัน 80
รูปที่ 25 แสดงเส้นใยเห็ดนางรมฮังการีบนอาหารวุ้นอายุ 25 วัน 80
รูปที่ 26 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน 81
รูปที่ 27 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว อายุ 0 วัน 82
รูปที่ 28 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว อายุ 14 วัน 83
รูปที่ 29 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 84
รูปที่ 30 แสดงสารสกัดเซลล์เห็ดสำหรับวิเคราะห์หาเอนไซม์ 84
รูปที่ 31 แสดงกราฟของการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรของเห็ดนางฟ้า
อายุ 14 วัน 85
รูปที่ 32 แสดงกราฟของการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรของเห็ดหูหนู
อายุ 14 วัน 85
รูปที่ 33 แสดงกราฟค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเห็ดชนิดต่างๆ ที่
อายุ 5, 8, 11, 14, 17 และ 21 วัน 86
รูปที่ 34 แสดงแถบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซีสและ
ย้อมสีเอนไซม์ 87
รูปที่ 35 แสดงไดอาแกรมจากการทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีเอนไซม์ 87
รูปที่ 36 แสดงแถบสีที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีโปรตีน 88
รูปที่ 37 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เลี้ยงโดยการเขย่า 100 รอบต่อนาที 89
รูปที่ 38 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เลี้ยงโดยการเขย่า 100 รอบต่อนาที 90
รูปที่ 39 แสดงการหมักชุดควบคุมโดยใช้เห็ดนางฟ้า
ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเวลา 21 วัน 91
รูปที่ 40 แสดงการหมักสารสกัดมอลล์โดยใช้เห็ดนางฟ้า
ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 21 วัน 92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเห็ดชนิดต่างๆ 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา

ปัจจุบันประชาชนนิยมดูแลสุขภาพกันมากขึ้น ซึ่งทางหนึ่งที่ทำได้ก็คือการรับประทานอาหารเพื่อสุขภาพ ไวน์ก็จัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพอย่างหนึ่ง โดยทั่วไปจะใช้เชื้อยีสต์เป็นจุลินทรีย์เพื่อหมักให้ได้เอทานอล แต่ในปัจจุบันพบว่าเห็ดบางชนิดสามารถสร้างเอทานอลได้ เนื่องจากเห็ดเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มฟังไจเช่นเดียวกับยีสต์ และเห็ดหลายชนิดมีคุณสมบัติทางด้านสมุนไพร

มีผู้ศึกษาพบว่ามีเห็ดบางชนิดที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ซึ่งสามารถเปลี่ยนอะซีตัลดีไฮด์เป็นเอทานอล คือ เห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* (เห็ดนางรม), *Agaricus blasie* (เห็ดเข็มทอง) และ *Ganoderma lucidum* (เห็ดหลินจือ) คุณสมบัติในไวน์ที่ได้จากการหมักโดยเห็ด คือ มีส่วนช่วยให้การจับตัวของเลือดช้าลงทำให้ลดการอุดตันของเส้นเลือด นอกจากนี้ยังสามารถสลายลิ่มเลือดได้อีกด้วย

จากคุณสมบัติของเห็ดที่กล่าวมานี้จึงเป็นเหตุจูงใจให้ทำการศึกษาเพื่อนำเห็ดมาหมักไวน์แทนเชื้อยีสต์ ซึ่งผู้บริโภคไวน์นอกจากจะได้ประโยชน์จากการดื่มไวน์คือกระตุ้นความอยากอาหารและดื่มเพื่อความบันเทิง ยังได้ประโยชน์จากคุณสมบัติของเห็ดที่ใช้หมักด้วย

โดยทั่วไปประชาชนนิยมบริโภคเห็ดในลักษณะที่เป็นดอกเห็ดทั้งแบบสดและแบบที่แปรรูปแล้ว แต่จากการศึกษาพบว่าส่วนที่มีคุณสมบัติทางสมุนไพรและการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสสูงคือส่วนที่เป็นไมซีเลียม ดังนั้นไวน์ที่ผลิตจากไมซีเลียมของเห็ดจึงน่าจะเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่สามารถรับประทานได้ง่ายกว่าการรับประทานดอกเห็ด นอกเหนือจากนั้นยังเป็นแนวทางเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ไวน์ให้ออกมาในรูปแบบอาหารเพื่อสุขภาพอีก เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ไวน์ และเป็นแนวทางขยายตลาดไปสู่ผู้บริโภคให้มากยิ่งขึ้น

เห็ดมีสรรพคุณทางสมุนไพรคือในเห็ดหลินจือพบว่ามีสารออกฤทธิ์และสรรพคุณทางยา คือ สารไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขม เช่น กรดกาโนเดอริค และกรดลูซิเดนิค ช่วยลดความดันโลหิต ช่วยลดไขมันในเลือด ป้องกันการอุดตันของไขมันในเส้นเลือด และยังพบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลล์มะเร็งในตับ และการต้านสารพิษที่มีต่อตับอีกด้วย สารพอลิแซคคาไรด์ ได้แก่ กาโนเดอแรนส์ ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด สารเบต้าดีกลูแคนมีฤทธิ์ในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนในเลือด, ไขกระดูก และในตับ ช่วยลดการอักเสบ ช่วยกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดบี-เซลล์ และ ที-เซลล์ สารสเตอรอยด์ คือ กาโนสเตอโรน หรือกาโนโดสเตอโรน มีฤทธิ์ในการลดพิษที่มีในตับ

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาและตรวจวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากเห็ดที่กินได้ในประเทศไทยด้วยวิธีต่างๆ

1.2.2 ศึกษาและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวน์จากไมซีเลียมของเห็ดในแบบอาหารเพื่อสุขภาพ

1.2.3 ศึกษาถึงคุณลักษณะทางด้านป้องกันโรคและคุณสมบัติของไวน์ที่ผลิตได้

1.2.4 ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคจากการใช้เห็ดในการหมักไวน์

1.3 ขอบเขต

1.3.1 ตรวจวิเคราะห์หาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากเห็ดที่กินได้ในประเทศไทยวงศ์ Auriculariaceae, Ganodermataceae และ Pleurotaceae

1.3.2 นำไมซีเลียมของเห็ดที่มีเอนไซม์มาหมักไวน์เปรียบเทียบกับไวน์ที่ผลิตจากยีสต์

1.3.3 ศึกษาลักษณะการป้องกันโรคและคุณสมบัติของไวน์ที่ผลิตได้

1.3.4 ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคต่อไวน์ที่หมักโดยเห็ด

1.4 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดสำหรับเตรียมสารสกัดเซลล์

1.4.2 นำเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงมาทำสารสกัดเซลล์

1.4.3 นำสารสกัดเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีการทางเคมี

1.4.4 นำสารสกัดเซลล์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีส

1.4.4.1 แบบโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

1.4.4.2 แบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

1.4.5 นำเส้นใยเห็ดที่มีเอนไซม์มาทดลองหมักไวน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถใช้เห็ดที่มีเอนไซม์มาใช้ในการหมักไวน์ทดแทนเชื้อยีสต์ได้

1.5.2 ไวน์ที่ผลิตจากไมซีเลียมของเห็ดจะมีสารช่วยป้องกันโรคบางชนิดได้

1.5.3 เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ไวน์ในรูปของอาหารเพื่อสุขภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ไวน์

2.1.1 ความหมาย

ไวน์เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ซึ่งผลิตจากการหมักน้ำองุ่นด้วยเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกแล้ว มีการควบคุมการหมักและควบคุมการผลิตเป็นอย่างดี ไวน์ที่ผลิตจากผลไม้อื่นเรียกว่าไวน์ผลไม้ หรือ Fruit wines ต้องระบุชื่อผลไม้บนฉลาก เช่น ไวน์สับปะรด ไวน์ลิ้นจี่ ไวน์มะเม่า ไวน์มะเกี๋ยง เป็นต้น ไวน์นอกจากจะผลิตจากองุ่นและผลไม้แล้ว ยังผลิตได้จากวัตถุอื่นๆ เช่น ใบไม้ ดอกไม้ พืชผักสมุนไพร เครื่องเทศ ข้าว น้ำตาลสด น้ำผลไม้เข้มข้น น้ำผึ้ง เป็นต้น ไวน์ไม่มีการกลั่น มีแอลกอฮอล์ 8-14 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (ดีกรี)

2.1.2 ประเภทของไวน์

อาจแบ่งประเภทหรือชนิดของไวน์ได้หลายแบบ แล้วแต่ว่าจะถืออะไรเป็นหลัก เช่น

1. สี แบ่งไวน์ได้เป็นไวน์สีขาว ไวน์สีแดง และไวน์สีชมพู (โรเซ่)
2. ความหวาน แบ่งไวน์ได้เป็น
   - 2.1 ไวน์ไม่หวาน (Dry wines) จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์
   - 2.2 ไวน์หวานเล็กน้อย (Semi dry wines) จะมีน้ำตาลรีดิวซ์ 2-5 เปอร์เซ็นต์
   - 2.3 ไวน์หวาน (Sweet wines) จะมีน้ำตาลมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์
3. ปริมาณแอลกอฮอล์ แบ่งไวน์ได้เป็น
   - 3.1 ไวน์ที่มีแอลกอฮอล์ 8-14 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (ดีกรี)
   - 3.2 ไวน์ที่มีแอลกอฮอล์ 15-17 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (ดีกรี)
   - 3.3 ไวน์ที่มีแอลกอฮอล์ 18-22 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (ดีกรี)
4. แก๊สที่ละลายในไวน์ แบ่งไวน์ได้เป็น
   - 4.1 ไวน์นิ่ง (Still wines) ไม่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในไวน์หรือมีแก๊สละลายอยู่น้อย
   - 4.2 ไวน์ฟอง (Sparking wines) มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ละลายในไวน์ปริมาณหนึ่งตามที่กฎหมายกำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเติมกลิ่นรสและสารสกัดสมุนไพรและเครื่องเทศในไวน์ แบ่งไวน์ได้เป็น

5.1 ไวน์ไม่เติมกลิ่นรสและสารสกัดสมุนไพรและเครื่องเทศ

6. วัตถุดิบ แบ่งไวน์ได้เป็น

6.1 ไวน์องุ่น

6.2 ไวน์ข้าว

6.3 ไวน์ผลไม้

6.4 ไวน์จากวัตถุดิบทางการเกษตรอื่นๆ เช่น ดอกไม้ ใบไม้ พืชผัก สมุนไพร เครื่องเทศ น้ำผึ้ง น้ำตาลสด เป็นต้น

7. ความนิยมทั่วไป ใช้กันมาก แบ่งไวน์ได้เป็น

7.1 ไวน์ประจำโต๊ะอาหาร (Table wines) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นไวน์นิ่ง

7.2 ไวน์ฟอง (Sparking wines)

7.3 ไวน์เติมแอลกอฮอล์กลั่นหรือบรั่นดี (Fortified wines) ทำให้ไวน์มีแรงแอลกอฮอล์สูงกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร (ดีกรี) ยังแบ่งย่อยออกเป็น

7.3.1 ไม่เติมกลิ่นรสและสารสกัดสมุนไพรเครื่องเทศ เช่น sherry , Port , Madiera เป็นต้น

7.3.2 เติมกลิ่นรสและสารสกัดสมุนไพรเครื่องเทศ เช่น Vermouth , Martini , Dubonnet เป็นต้น บางตำราเรียกไวน์กลุ่มนี้ว่า Aromatised wines Fortified wines มีทั้งแบบไม่หวานและแบบหวาน มีทั้งสีขาว สีแดง และสีอื่นๆ ถ้าเป็นแบบไม่หวานจะใช้ดื่มก่อนอาหารเพื่อเรียกน้ำย่อย เป็น Appetizer หรือ Aperitif แต่ถ้าเป็นแบบหวานจะดื่มหลังอาหาร เป็น Dessert wines หรือเป็น Digestive wines

7.4 อื่นๆ (Other) เช่น

7.4.1 ไวน์แอลกอฮอล์ต่ำ (Low alcohol wines) มีแรงแอลกอฮอล์ 8 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ไวน์คูลเลอร์อาจจัดอยู่ในประเภทนี้

7.4.2 ไวน์ที่ถูกกำจัดหรือแยกแอลกอฮอล์ออกไป (Dealcoholised wines) อาจมีแอลกอฮอล์ในไวน์บ้างแต่ไม่เกิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร เป็นไวน์ที่ผลิตขึ้นสำหรับผู้อยากดื่มไวน์ แต่แพ้แอลกอฮอล์ หรือสำหรับผู้บริโภคที่นับถือศาสนาอิสลามหรือศาสนาอื่น ซึ่งมีบทบัญญัติห้ามดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์และโทษของไวน์

-ประโยชน์

1. ทำให้อยากอาหาร ดื่มก่อนอาหารเป็นการเรียกน้ำย่อย
2. ช่วยเสริมกลิ่นรสอาหาร ใช้ดื่มควบคู่กับอาหาร หรือเติมลงในอาหารหรือหมักกับวัตถุดิบ
3. ประโยชน์ทางการแพทย์ ต้องอยู่ในความดูแลของแพทย์ ปกติแพทย์จะให้คนไข้ดื่มไวน์วันละประมาณ 2-3 แก้วมาตรฐานเพื่อรักษาหรือบรรเทาอาการของโรคบางอย่าง เช่น ดื่มเพื่อระงับอาการเจ็บปวด ช่วยขับถ่ายปัสสาวะ ช่วยระงับความตื่นเต้น ช่วยรักษาโรคความดันโลหิตต่ำ ช่วยทำให้หลอดเลือดหัวใจไม่ตีบตัน จึงไม่เป็นโรคหัวใจวาย เป็นต้น

-โทษ

เหมือนเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ทั่วไป ดื่มมากขาดสติยับยั้ง ก้าวร้าว เกิดอุบัติเหตุง่าย ดื่มมากเป็นประจำทุกวัน มีโอกาสเป็นโรคตับแข็ง โรคพิษสุราเรื้อรัง (alcoholism) เป็นต้น

2.1.4 หลักการผลิตไวน์

การผลิตไวน์เป็นทั้งวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ ต้องอาศัยประสบการณ์ตำราและเครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ เข้ามาช่วย มีการผลิตไวน์หลายพันปีแล้ว แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากการหมักน้ำผลไม้เป็นเรื่องบังเอิญ ไม่มีใครทราบว่าเกิดขึ้นได้อย่างไรจึงไม่สามารถควบคุมการหมักและการเกิดเป็นไวน์ได้ น้ำผลไม้ที่เกิดการหมักจึงมักเน่าเสีย วิทยาการและเทคโนโลยีการผลิตไวน์ได้พัฒนาอย่างมากในสมัยหลุยส์ ปาสเตอร์ ซึ่งเป็นนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส ได้มีการใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจพบสิ่งที่มีชีวิตเล็กๆนั้นคืออะไร นอกจากนี้ยังมีการค้นพบซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ช่วยไม่ให้ไวน์เกิดการเน่าเสียหลังจากนั้น เทคโนโลยีการผลิตไวน์ รวมทั้งเทคโนโลยีการปลูกองุ่นได้พัฒนาอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง มีความเข้าใจเป็นอย่างดีในกระบวนการหมักของไวน์ เข้าใจบทบาทของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมี เข้าใจความสำคัญของพันธุ์องุ่น ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพขององุ่นต่อสภาพดินฟ้าอากาศ ทำให้สามารถควบคุมการผลิตไวน์ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น การผลิตไวน์จึงเป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ของบางประเทศที่มีภูมิประเทศและสภาพอากาศเหมาะสำหรับการปลูกองุ่นผลิตไวน์พันธุ์ดี

ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่ร้อนชื้น ฝนตกมาก ไม่เหมาะที่จะปลูกองุ่น ไม่ว่าจะเป็นองุ่นใช้รับประทานสดหรือพันธุ์สำหรับผลิตไวน์ แต่นักวิชาการและเกษตรกรได้ผลผลิตพอสมควรถึงดีในประเทศไทย โดยใช้เวลาหลายสิบปี ปัจจุบันได้พบความสำเร็จอย่างน่าพอใจในการปลูกองุ่นชนิดใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รับประทานสดจนสามารถพัฒนาการปลูกเพื่อผลิตในเชิงธุรกิจได้เป็นอย่างดี ส่วนองุ่นพันธุ์สำหรับผลิตไวน์นั้น การคัดเลือกพันธุ์การพัฒนาเทคนิคการปลูกมีความก้าวหน้าพอสมควร ยังต้องใช้เวลาอีกนานในการวิจัยซึ่งต้องใช้เงินทุนและนักวิชาการทางด้านนี้อีกมาก อย่างไรก็ตามปัจจุบันประเทศไทยมีโรงงานทันสมัยที่ผลิตไวน์จากองุ่นเป็นการค้าแล้ว 7 โรงงาน คุณภาพของไวน์ที่ผลิตได้มาตรฐาน แต่ราคาค่อนข้างแพงเมื่อเทียบกับไวน์คุณภาพเดียวกันที่นำเข้าจากต่างประเทศอาจเป็นเพราะยังผลิตได้ปริมาณน้อย ต้นทุนการผลิตสูง ยังมีปัญหาด้านพันธุ์องุ่นผลิตไวน์ที่เหมาะสม ปรับตัวได้ดีในสภาพดินฟ้าอากาศของประเทศไทยให้ผลผลิตปานกลางจนถึงดี ใช้ผลิตไวน์ได้คุณภาพดี ถ้าแก้ปัญหาด้านวัตถุดิบหรือพันธุ์องุ่นได้สำเร็จ อุตสาหกรรมผลิตไวน์ในประเทศไทยจะก้าวหน้ามากกว่านี้ ปัจจุบันพบว่าองุ่นผลิตไวน์ขาวพันธุ์ Chenin blanc และองุ่นแดงพันธุ์ Shiraz เพียง 2 พันธุ์เท่านั้นที่เหมาะสมที่จะใช้ผลิตไวน์เพื่อการค้าในประเทศไทย ยังต้องการงานค้นคว้าวิจัยและพัฒนาเพื่อคัดเลือกพันธุ์องุ่นที่เหมาะสมเพิ่มขึ้นอีก

ในอนาคต ประเทศไทยอาจเป็นแหล่งผลิตไวน์สำคัญของโลก เนื่องจากประเทศไทยอุดมด้วยวัตถุดิบหลักซึ่งพร้อมที่จะใช้ในการผลิตไวน์ เช่น องุ่น ผลไม้ทั้งเมืองร้อน ผลไม้เมืองหนาวปลูกบนที่สูง ข้าวซึ่งมีทั้งข้าวเหนียว ข้าวเจ้า ข้าวหอมมะลิ ข้าวญี่ปุ่น พืชผักสมุนไพรเครื่องเทศ น้ำตาลสด น้ำผึ้ง เป็นต้น วัตถุดิบเหล่านี้มีหมุนเวียนตลอดปี บางฤดูมีผลผลิตออกมามากเกินความต้องการ ทำให้มีราคาถูก จึงเหมาะที่จะนำไปผลิตเป็นไวน์ ไวน์ที่ผลิตในประเทศไทยจึงมีความหลากหลาย เป็นเรื่องน่าสนใจ รัฐบาลควรส่งเสริมและสนับสนุน อาจเป็นสิ่งดึงดูดใจนักท่องเที่ยวหรือเป็นสินค้าส่งออก

2.1.5 ขั้นตอนหลัก 9 ประการในการผลิตไวน์

1. การเตรียมน้ำวัตถุดิบ
2. การยับยั้งและ/หรือทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในน้ำวัตถุดิบ
3. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์และการควบคุมการหมัก
4. การทำให้ไวน์ใส
5. การเก็บและการบ่มไวน์
6. การผสมปรุงแต่งไวน์
7. การทำให้ไวน์อยู่ตัว หรือเสถียร
8. การกรองไวน์ครั้งสุดท้าย
9. การบรรจุ

ทุกขั้นตอนการผลิตมีความสำคัญ เทคนิคในการผลิตแต่ละขั้นตอนที่ควรสนใจมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมน้ำวัตถุดิบ เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก หากเตรียมไม่ถูกต้อง อาจได้ไวน์คุณภาพไม่ดี ไม่ได้มาตรฐานหรือมีความบกพร่อง การเตรียมประกอบด้วย

1.1 คัดเลือกวัตถุดิบ วัตถุดิบต้องมีคุณภาพดี อาจ มีตำหนิบ้างแต่ต้องไม่ช้ำ ปริแตก เน่า มีเชื้อรา มีกลิ่นเปรี้ยวน้ำส้มสายชู

1.2 ล้าง กำจัดสิ่งสกปรกในวัตถุดิบด้วยน้ำสะอาด

1.3 กำจัดส่วนที่ไม่ต้องการ ส่วนที่ต้องการนำมาทำให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วบีบหรือคั้นหรือสกัดเอาน้ำ

1.4 หากจำเป็นต้องเติมน้ำ ต้องเติมในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อรักษากลิ่น รส สี และปริมาณสารอาหาร (nutrients)

1.5 ใช้ Refractometer วัด °Brix ปรับเป็น 21-22 °Brix ด้วยน้ำตาลทรายหรือน้ำวัตถุดิบเข้มข้น ถ้าเติมน้ำผึ้งควรระวังกลิ่นน้ำผึ้งจะกลบกลิ่นวัตถุดิบ

1.6 วิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (%Total Acid) ถ้าจำเป็น อาจชิมดู ก็ได้ปริมาณ TA ในน้ำวัตถุดิบขึ้นกับวัตถุดิบและสไตล์ของไวน์ เช่น ไวน์ข้าวและไวน์พืชผักสมุนไพรจะมี %TA ต่ำกว่าองุ่นและไวน์ผลไม้ปกติไวน์องุ่นจะมี TA ประมาณ 4-6 กรัม/ลิตร (คำนวณเป็นกรดทาร์ทาริก) ลด %TA โดยการเติมน้ำ แต่ไม่นิยม นิยมเติม $CaCO_3$หรือ $NaHCO_3$ หรือเติมน้ำวัตถุดิบที่มี TA ต่ำ อาจเติม Malo-lactic bacteria ก็ได้
เพิ่ม %TA โดยการเติมกรดอินทรีย์ เช่น Tartaric acid, Citric acid และ Fumaric acid ในน้ำองุ่นและน้ำผลไม้ สำหรับไวน์ข้าวการเติม Lactic acid

2. การยับยั้งและ/หรือทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในน้ำวัตถุดิบ บางแห่งไม่ทำขั้นตอนนี้ นิยมให้เกิดการหมักไวน์โดยเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบแต่ไวน์ที่ได้มักมีคุณภาพไม่แน่นอน เป็นการเสี่ยงในการลงทุนทางธุรกิจ ในปัจจุบันจึงนิยมยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในวัตถุดิบโดยใช้

2.1 ความร้อน โดยต้มให้เดือดประมาณ 5 นาที หรือพาสเจอร์ไรซ์ 60-70°ซ. เป็นเวลา 10-15 นาที แล้วรีบทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิ ห้อง

2.2 ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ หรือ SO_2 คือ KMS (Potassium metabisulfite = $K_2S_2O_5$) ในของเหลวที่มี พีเอช ประมาณ 3.5 เกลือ KMS หรือ SMS จะแตกตัวได้ SO_2ประมาณ 100 พีพีเอ็ม ปกติปริมาณของ KMS หรือ SMS ที่เพียงพอในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ในน้ำวัตถุดิบคือ 150-200 พีพีเอ็ม หลังจากเติมเกลือนี้แล้วอย่างน้อย 6 ชั่งโมง จึงเติมกล้าเชื้อยีสต์ลงไปหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์และการควบคุมการหมัก ยีสต์ที่ใช้หมักไวน์เป็น ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* มีหลายสเตรนที่ใช้ในกรผลิตไวน์ เช่น Montrachet , Burgundy, Champagne, Sherry, Ellipsoideus เป็นต้น อาจใช้ในรูปเชื้อยีสต์สดบนวุ้นเลี้ยงเชื้อหรือเป็นยีสต์ผง (Active dry wine yeast หรือ ADY) ก็ได้ในการผลิตไวน์ทางอุตสาหกรรมจะนิยมใช้ยีสต์ผงเพราะสะดวก ใช้ง่าย ราคาไม่แพง เก็บไว้ได้นานเป็นปี หมักไวน์ได้คุณภาพดีและสม่ำเสมอ

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ ถ้าหากเป็นเชื้อสด ต้องเพาะเลี้ยงขยายเชื้อในน้ำวัตถุดิบที่แบ่งมาในปริมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ต้มฆ่าเชื้อปนเปื้อนและทำให้เย็นแล้วกล้าเชื้อยีสต์ควรมีอายุ 1-2 วันและแข็งขัน (active) ถ้าหากเป็นเชื้อยีสต์ผง ก่อนใช้ต้องทำการ reactivate ในน้ำวัตถุดิบ หรือน้ำอุ่นประมาณ 40 องศาเซลเซียสก่อน ปริมาณการใช้และวิธีการใช้จะระบุที่ภาชนะบรรจุยีสต์ผงนั้น

การควบคุมการหมักเป็นเรื่องที่ต้องติดตามดูแลใกล้ชิดทุกวัน ภาชนะที่ใช้หมักควรเป็นวัสดุที่แข็งแรง ทนต่อกรด ต่อแอลกอฮอล์ ไม่เป็นสนิมหรือผุกร่อนรั่วซึม ทำความสะอาดได้ง่าย ถังหมักขนาดใหญ่ควรออกแบบให้เหมาะสม สามารถควบคุมอุณหภูมิของการหมักได้ ไวน์ขาวควรหมักที่ 15-18 องศาเซลเซียส ไวน์แดงควรหมักที่ 15-25 องศาเซลเซียส และต้องหมักทั้งเปลือกและผิวของวัตถุดิบที่มีสีแดง ควรคนหรือกวนไวน์ทุกวันๆ ละ 1-2 ครั้ง เก็บตัวอย่างไวน์ที่กำลังหมักเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง °Brix และ /หรือการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ทุก 1-2 วัน ควรดมกลิ่นตัวอย่างไวน์ด้วยว่ามีความบกพร่องหรือไม่การหมักหรือทันทีที่สิ้นสุดการหมักโดยควรเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการหมักแบบนี้และต้องควบคุมสภาวะให้เหมาะสม จุดประสงค์ของการก่อให้เกิดการหมักแบบ Malo-lactic fermentation

3.1 ลดกรด ทำให้ไวน์มีรสดีขึ้น มีรสเปรี้ยวน้อยลง เนื่องจากการกรดมาลิกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ปริมาณกรดทั้งหมดในไวน์ลดลง

3.2 มีกลิ่นรสที่ซับซ้อนมากขึ้น

3.3 ทำให้ไวน์อยู่ตัว (stable)

4. การทำให้ไวน์ใส หลังจากหมักเสร็จควรถ่ายตะกอนไวน์ (rack) เก็บไวน์ที่อุณหภูมิต่ำ 10-15 องศาเซลเซียส และใส่เกือบเต็มถัง เติม KMS หรือ SMS 60-80 พีพีเอ็ม ควรถ่ายตะกอนไวน์ทิ้ง 1-2 ครั้ง ภายใน 2 สัปดาห์ จากนั้นเร่งทำให้ไวน์ใสโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 ปั่นแยกตะกอน (Centrifugation)

4.2 เติมสารเพื่อตกตะกอนให้ไวน์ใส (Fining) สารตกตะกอนไวน์ (Fining agents) ที่ใส่ในไวน์ ได้แก่ Bentonite, Gelatin, Tannins, Chitin หรือ Chitosan, Casein, Egg white, Ox blood, Isinglass, Silica solution เป็นต้น

4.3 กรองใช้เครื่องกรองไวน์พร้อมไส้กรอง หรือแผ่นกรองที่มีขนาดรูกรองที่เหมาะสม

การทำให้ไวน์ใสเร็วขึ้นอาจใช้วิธีการดังกล่าว 2-3 วิธีช่วยเสริมกัน ไวน์ที่ถูกทำให้ใสในขั้นตอนนี้ไม่ถือว่าเป็นไวน์ที่อยู่ตัว

5. การเก็บและการบ่มไวน์ ควร (store) ไวน์ใสในขวดหรือถังสแตนเลสที่สะอาด ใส่ไวน์ให้เกือบเต็มขวดหรือถัง มีที่ว่างของอากาศในภาชนะที่เก็บไวน์น้อยที่สุด บางครั้งจำเป็นต้องแทนที่อากาศด้วยแก๊สเฉื่อย (inert gas) เช่น CO_2และN_2 แล้วปิดฝาให้มิดชิด อุณหภูมิของไวน์ในถังเก็บที่ประมาณ 10-15 °ซ. รักษาปริมาณของซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ 30-40 พีพีเอ็ม จุดประสงค์ของการเก็บไวน์เพื่อพักไวน์เพื่อพักไวน์ไว้ระยะหนึ่งก่อนที่ไวน์จะเข้าสู่ขั้นตอนต่อไป ไม่ต้องการให้ไวน์คุณภาพดีขึ้น การบ่มไวน์ (Aging) คือการเก็บไวน์ไว้ในภาชนะ ให้มีที่ว่างของอากาศน้อยที่สุดในภาชนะ หรือแทนที่อากาศด้วยแก๊สเฉื่อย เช่น ไนโตรเจน หรือ คาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อป้องกันการสันดาป (ออกซิเดชั่น) อาจบ่มไวน์ในถังสแตนเลส หรือถังไม้โอ๊กก็ได้ ไวน์ผลิตจากองุ่นพันธุ์ดี เช่น Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Shiraz (Syrah), Chardonnay เป็นต้น มักนิยมบ่มในถังไม้โอ๊ก เหตุที่นิยมบ่มไวน์ในถังไม้โอ๊ก เพราะเป็นไม้เนื้อแข็ง เนื้อไม้ละเอียด อากาศผ่านเข้าหรือออกได้เล็กน้อยเนื้อไม้มีสารเคมีสำคัญ ซึ่งเมื่อถูกสกัดด้วยแอลกอฮอล์ในไวน์แล้วจะให้สี กลิ่น และรสที่ดีแก่ไวน์ ถังไม้โอ๊กมีขนาดต่างๆกัน โรงงานไวน์แต่ละแห่งจะบ่มไวน์ในถังไม้โอ๊กทั้งถังใหม่ (ไม่เคยใช้มาก่อน) และถังเก่า (ใช้แล้ว) ถังใหม่จะให้สี กลิ่นและรสของสารสกัดไม้โอ๊กที่เข้มข้นแก่ไวน์ความเข้มข้นของสารสกัดจะลดลงมากเมื่อถังไม้โอ๊กใหม่ผ่านการใช้บ่มไวน์แล้ว 4-5 ปีแต่ทางโรงงานไวน์ก็ยังใช้ถังไม้โอ๊กในการบ่มไวน์ต่อไป อาจใช้งานได้อีก 10-20 ปีโดยใช้บ่มไวน์หลังจากไวน์ผ่านการบ่มในถังไม้โอ๊กใหม่แล้ว หรือใช้บ่มไวน์ที่มีราคาถูกหรือใช้บ่มไวน์ที่ไม่ต้องการสี กลิ่น และรสจากไม้โอ๊กมากนัก

6. การผสมปรุงแต่งไวน์ โดยนำไวน์ตั้งแต่ 2 ชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆ อาจเติมน้ำตาล กรอ หรือสารเพิ่มความฝาดเปื่อนก็ได้ การนำไวน์ใส 2-3 ชนิดมาผสมกันอาจทำให้ไวน์เกิดความขุ่นได้ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของไวน์เปลี่ยนไปจุดประสงค์ของการผสมปรุงแต่งไวน์เพื่อต้องการให้คุณภาพของไวน์ดีขึ้น มีคุณภาพสม่ำเสมอทุกครั้งหรือทุกปีที่ผลิตจำหน่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การทำให้ไวน์อยู่ตัว เป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการผลิตไวน์ ไวน์ไม่อยู่ตัวคือการที่ไวน์เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านความใสและสีหลังจากบรรจุขวดและเก็บไว้ระยะหนึ่ง พบว่าไวน์บางขวดเมื่อตั้งในห้องหรือแช่ในตู้เย็นระยะหนึ่ง จะเกอดความขุ่นหรือเกิดผลึกสีขาวภายในขวด แสดงว่าไวน์ไม่อยู่ตัว เป็นไวน์ไม่เสีย ใช้ดื่มได้แต่แสดงว่าผู้ผลิตมีเทคโนโลยีในการผลิตไม่ดีพอสาเหตุหลักที่ทำให้ไวน์ไม่อยู่ตัวเนื่องจาก

7.1 จุลินทรีย์ ยังมีจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่ในไวน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ทนต่อแอลกอฮอล์และกรด สามารถใช้แอลกอฮอล์และกรดเป็นอาหารของมันได้ หากไวน์ยังมีน้ำตาลเหลืออยู่จะยิ่งมีโอกาสไม่อยู่ตัวมากขึ้นการทำให้ไวน์อยู่ตัวในปัญหานี้ทำได้โดยก่อนบรรจุไวน์ให้

7.1.1 ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อน โดยปริมาณแอลกอฮอล์และคุณภาพไวน์ไม่ลดลง

7.1.2 กรองด้วยเครื่องกรองที่เหมาะสมเพื่อกำจัดจุลินทรีย์

7.2 เคมี มีสารเคมีหลายตัวที่ทำให้ไวน์ไม่อยู่ตัว เช่น

7.2.1 โปรตีน โปรตีนทำให้ไวน์ไม่อยู่ตัว ไวน์จะขุ่น แก้ปัญหานี้ได้โดยตกตะกอนไวน์ด้วย Bentonite หรือทำให้โปรตีน denature ด้วยความร้อนสูงใช้ระยะเวลาสั้น เป็นต้น

7.2.2 ผลึกโปแตสเซี่ยมไบทาร์เทรต หรือ Cream of tatar ผลึกจะจับเป็นแผ่น หรือเป็นแท่งเล็กมาก สีขาวใสเมื่อไวน์ได้รับความเย็นในช่วงระยะเวลาหนึ่ง เช่น เมื่อแช่ไวน์ในตู้เย็นก่อนหน้าก่อนใช้ดื่ม อาจสังเกตเห็นผลึกนี้ในขวดไวน์ แสดงว่าไวน์ไม่อยู่ตัว แก้ปัญหานี้ได้ โดยก่อนบรรจุไวน์ให้ลดอุณหภูมิของไวน์ในถังที่ประมาณ –4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน ถ้าใช้อุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียสจะต้องใช้เวลาให้นานกว่านี้ ผลึกโปแตสเซี่ยมไบทาร์เทตจะตกลงมาหรือเกาะที่ผนังของถัง ให้รีบถ่ายไวน์หรือกรองไวน์ทันที ในขณะที่ก่อให้ไวน์เกิดความขุ่น (Haze) ได้แก่ เหล็ก และ ทองแดง แก้ปัญหานี้ได้โดยการทำ Blue fining, Ion exchange เป็นต้น

8. การกรองไวน์ครั้งสุดท้าย เพื่อกำจัดความขุ่นทุกชนิดที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าเป็นการสร้องความมั่นใจในความใสของไวน์ก่อนทำการบรรจุขวด ทำโดยการกรองด้วยเครื่องกรองแบบ sterile filtration รูแผ่นกรองหรือแท่งกรองมีขนาด 0.4 ไมครอน หรือเล็กกว่า ไวน์ที่จะกรองต้องมีความใสมาก

9. การบรรจุ ก่อนที่จะบรรจุไวน์ ต้องมั่นใจว่าไวน์มีคุณภาพดีตามที่ต้องการผ่านการผสมปรุงแต่งใสและอยู่ตัว ขวดที่ใช้บรรจุควรเป็นขวดสี อาจเป็นสีเขียวหรือสีชา แห้ง สะอาด ไม่ร้าว ควรบรรจุไวน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกือบเต็มขวด มีที่ว่างของอากาศในขวดน้อย อาจแทนที่อากาศในขวดด้วยแก๊สเฉื่อย เช่น CO_2 หรือ N_2มี SO_2 อิสระในไวน์ประมาณ 25-30 พีพีเอ็ม จุกไม้ก๊อกที่ปิดปากขวดไวน์ควรมีคุณภาพดี มีความยาวพอเหมาะฉลากไวน์ที่มีทั้งตัวอักษรและภาพต้องเป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมาย ไม่โอ้อวดคุณภาพไวน์ ควรให้ผู้ปริโภคทราบว่าไวน์ขวดนั้นทำจากวัตถุดิบอะไร ปีผลิต แหล่งผลิตและสไตล์ไวน์ ความหวาน ปริมาณแอลกอฮอล์ และปริมาตรบรรจุ ปัจจุบันมีบางประเทศบังคับให้ระบุชนิดและปริมาณของ SO_2และสารกันบูดที่เติมบนฉลากหลังไวน์ด้วย

2.1.6 ข้อแตกต่างระระหว่างวิธีผลิตไวน์ขาวและไวน์แดงจากองุ่น

ในการแบ่งประเภทหรือกลุ่มของไวน์โดยถือสีเป็นหลัก อาจแบ่งไวน์เป็น 3 ประเภท คือ ไวน์ขาว ไวน์แดงและไวน์โรเซ่ (มีสีชมพูอ่อน แดงอ่อนจนถึงสีม่วงแดงอ่อนๆ) ในการชิมเพื่อประเมินคุณภาพไวน์ด้านประสาทสัมผัส สีของไวน์เป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของไวน์ อาจเดาคุณภาพเบื้องต้นได้จากการดูสี โดยเฉพาะคุณภาพางด้านความหนักหรือเบาของรส ความเก่าหรือความใหม่ของไวน์การเก็บบ่มไวน์ (Aging) ว่าทำอย่างถูกต้องหรือไม่ ความสำคัญอีกประการหนึ่งด้านสีของไวน์ทางการค้าคือเป็นปัจจัยกระตุ้นให้ผู้บริโภคอยากซื้อและอยากลองดื่ม

กระบวนการผลิตไวน์ขาว ไวน์แดงและไวน์โรเซ่(Rose) มีความแตกต่างกัน ในที่นี้จะกล่าวเปรียบเทียบกระบวนการที่แตกต่างกันในการผลิตไวน์ขาวและไวน์แดงจากองุ่นนั้น ซึ่งความแตกต่างพอประมวลได้ดังนี้

1. สีและพันธุ์ขององุ่น

ไวน์ขาวย่อมผลิตจากองุ่นเขียว อาจผลิตจากองุ่นแดงได้ โดยบีบเพื่อคั้นเอาเฉพาะน้ำองุ่นมาหมัก ไวน์แดงผลิตจากองุ่นแดงเท่านั้น พันธุ์องุ่นที่ใช้ผลิตไวน์ขาวและผลิตไวน์แดงย่อมแตกต่างกัน

2. การบีบเพื่อคั้นน้ำองุ่น (Pressing)

ไวน์ขาวจะผลิตโดยบีบเพื่อคันน้ำองุ่นก่อนทำการหมัก ส่วนไวน์แดงจะหมักทั้งเปลือกองุ่นระยะหนึ่งก่อนที่จะทำการคั้นเอาเปลือกองุ่นทิ้งไป เอาน้ำไวน์สีแดงมาหมักต่อจนหมดความหวาน

3. การหมัก ภาชนะที่ใช้หมัก และอุณหภูมิของการหมัก

การหมัก ไวน์ขาวจะผลิตโดยหมักเฉพาะน้ำองุ่น ส่วนไวน์แดงจะผลิตโดยหมักทั้งเปลือกหรือผิวสีแดงขององุ่นที่ผ่านการกำจัดก้านและบีบให้ผิวแตกแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาชนะที่ใช้หมัก จะใช้ภาชนะที่แข็งแรง ทนทาน ไม่เป็นสนิมหรือทนต่อกรดต่อด่าง ต่อแอลกอฮอล์ ทำความสะอาดง่าย ไวน์ขาวจะหมักโดยใช้ถังหมักที่ปิดสนิท มีอุปกรณ์ง่ายๆ เพื่อให้แก๊สที่เกิดจากการหมักระบายออกไป แต่ไม่ยอมให้อากาศภายนอกเข้าไปในถังหมัก ไวน์แดงมักจะหมักในถังเปิด มีแผ่นพลาสติกหรือแผ่นไม้กระดานปิดไว้แต่ไม่สนิท เพื่อกันแมลงและสัตว์เล็กตกลงไปในถังหมัก และเพื่อความสะดวกในการเปิดฝาถังการคนหรือกวนไวน์ (Punch down or pump over)ให้ผิวองุ่นได้สัมผัสกับน้ำไวน์ที่กำลังหมัก เพื่อสกัดสี กลิ่นและรสชาติจากผิวองุ่น เป็นการระบายความร้อนและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากการหมักด้วย การหมักไวน์แดงในภาชนะที่ปิดสนิทต้องออกแบบภาชนะเป็นพิเศษ

อุณหภูมิของการหมักไวน์ ไวน์ขาวจะหมักอุณหภูมิต่ำกว่าไวน์แดง การควบคุมอุณหภูมิของการหมักไวน์ขาวค่อนข้างจะคงที่กว่าการหมักไวน์แดง

4. การบ่มไวน์ (Aging)

หากต้องบ่มไวน์ในถังไม้โอ๊ก ไม่ว่าจะเป็นถังใหม่หรือถังใช้แล้ว ไวน์ขาวจะในเวลาบ่มในถังไม้โอ๊กสั้นกว่าไวน์แดง ทั้งนี้เพราะไวน์ขาวไม่ต้องการสีที่เหลืองเข้มและไม่ต้องการกลิ่นไม้โอ๊กที่รุนแรง ต้องการความนุ่ม (delicate) และความสดของกลิ่นองุ่น (frest and fruity aroma) มีไวน์ขาวจากองุ่นเพียงบางพันธุ์เท่านั้นที่ต้องการกลิ่นซับซ้อน (complex flavors) จากการบ่มในถังไม้โอ๊กในระยะเวลาที่พอเหมาะจะทำให้คุณภาพดีขึ้น

ส่วนไวน์แดงนั้นส่วนใหญ่จะบ่มในถังไม้โอ๊กนานกว่าไวน์ขาว เนื่องจากไวน์แดงหมักทั้งเปลือกหรือผิวองุ่น มีความเฝื่อนและฝาด (astringency) มาก รสและกลิ่นจะดีและซับซ้อนขึ้นจากการบ่มในถังไม้โอ๊กทั้งไม่และใช้แล้วในเวลาที่เหมาะสม สีของไวน์แดงก็จะดีขึ้นเช่นกัน ไม่เป็นสีแดงสดหรือม่วงแดง แต่จะมีสีน้ำตาลปนอยู่ (brownish red) ยกเว้นไวน์จากองุ่นแดงบางชนิดเท่านั้นที่ไม่ต้องการกลิ่นไม้โอ๊กต้องการกลิ่นสดหอมคล้ายดอกไม้ (flowery) รสเบาและอายุการเก็บไม่นาน เช่น Beaujolasis Nouveau หรือไวน์แดงที่ผลิตโดยใช้กรรมวิธี Carbonique Maceration การบ่มไวน์ในขวด (bottle aging) ก็เช่นเดียวกัน ไวน์ขาวมักจะใช้เวลาบ่มสั้นกว่าไวน์แดง ความหรือดื่ม (mature) ในการบ่มในขวดเร็วกว่าไวน์แดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

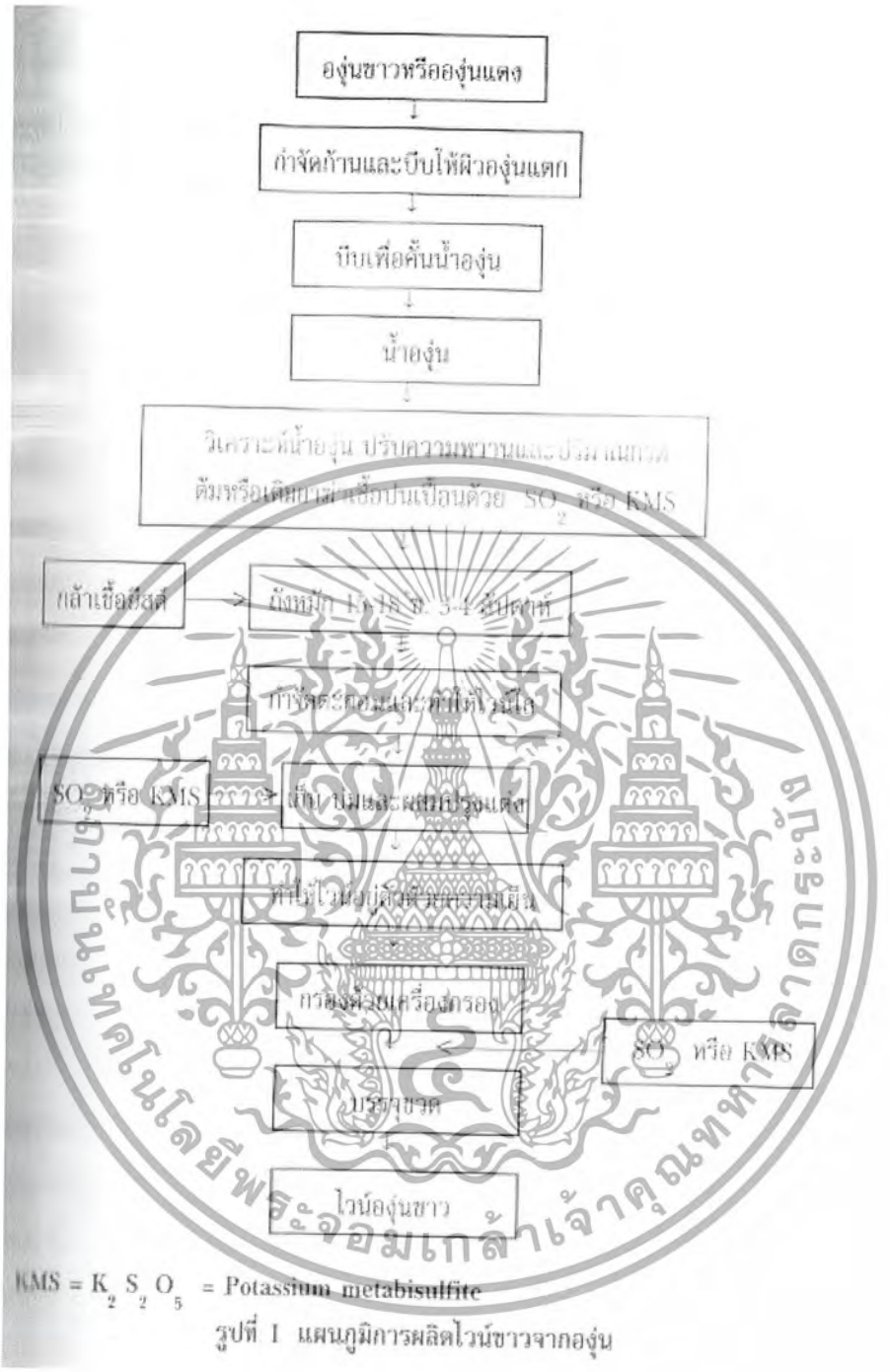
2.1.7 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักไวน์

มีการผลิตไวน์มาหลายพันแล้วไวน์ที่ผลิตในสมัยโบราณเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นโดยบังเอิญ โดยผลองุ่นที่ผิวแตกช้ำหรือน้ำองุ่นค้นเกิดการหมักขึ้นเองตามธรรมชาติ น้ำองุ่นมีกลิ่นรสแอลกอฮอล์และกลิ่นอื่นๆ เกิดขึ้น กลิ่นรสของน้ำองุ่นเปลี่ยนไป บางครั้งเป็นกลิ่นรสที่ดีขึ้น เป็นที่ยอมรับ แต่ส่วนใหญ่นั้นองุ่นจะเกิดการเน่าเสีย ในสมัยนั้น ไม่มีใครทราบว่าเป็นเพราะสาเหตุใด

เมื่อประมาณ 130 กว่าปีที่ผ่านมา หลุยส์ ปาสเตอร์ นักวิทยาศาสตร์ผู้มีชื่อเสียงชาวฝรั่งเศส เป็นคนแรกที่ใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องดูหยดน้ำองุ่นที่เกิดการหมักตามธรรมชาติ ได้พบจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการหมักในน้ำองุ่น แต่ หลุยส์ ปาสเตอร์ ไม่ทราบว่าเป็นอะไร แต่กล่าวว่าการที่น้ำองุ่นเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้เพราะเกิดการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตบางชนิด ต่อมานักวิทยาศาสตร์รุ่นหลังได้ทำการแยกจุลินทรีย์ตัวเล็กๆ มองด้วยตาเปล่าไม่เห็นเหล่านี้ออกจากน้ำองุ่น ทำให้แต่ละเชื้อบริสุทธิ์ ทำการชันสูตรจำแนกสายพันธุ์ทางวิชาการในห้องปฏิบัติการ ทำให้ทราบชื่อสายพันธุ์จุลินทรีย์แต่ละชนิด ว่าชนิดใดหมักน้ำองุ่นแล้วได้ไวน์คุณภาพดี ชนิดใดทำให้ไวน์เสีย มีการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้หมักไวน์ให้ดีขึ้นโดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ในการตัดต่อพันธุกรรมของยีสต์ การควบคุมการผลิตไวน์จึงไม่ใช่ความลับหรือความบังเอิญอีกต่อไป คุณภาพของไวน์ที่หมักโดยเติมเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกแล้วลงไปในน้ำองุ่นจะได้ไวน์ที่มีคุณภาพตามต้องการ ไม่ต้องเสี่ยงเหมือนการหมักโดยใช้เชื้อจากธรรมชาติ อุตสาหกรรมผลิตไวน์จึงพัฒนาและก้าวหน้าเป็นลำดับ ไวน์จึงเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่สำคัญและนิยมดื่มในเกือบทุกประเทศ

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักไวน์มีหลายชนิด ส่วนใหญ่จะเป็นยีสต์ซึ่งมีทั้งยีสต์ที่ดีที่ใช้ในการผลิตไวน์ยังมียีสต์ที่ทำให้ไวน์เสีย กลิ่นไม่ดี ส่วนใหญ่จะก่อให้เกิดแผ่นฟิล์มบางๆ บนผิวไวน์ขณะเริ่มหมักหรือหมักเสร็จแล้วแต่เก็บไม่ดีมีบักเตรีเกี่ยวข้องกับการหมักไวน์ 2 ชนิด ชนิดที่ต้องการหรือต้องคัดเลือกและเติมลงไปให้เกิดการหมักเพื่อลดกรดในไวน์คือพวกมาโล-แลคติก บักเตรี ส่วนชนิดที่ไม่ต้องการมักเป็นพวกที่ปนเปื้อนในไวน์ ไวน์ขาดซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระในปริมาณที่เพียงพอ ไวน์ถูกอากาศมากหรือมีที่ว่างของอากาศเหนือผิวไวน์มาก ภาชนะที่เก็บบ่มไวน์มีเชื้อบักเตรีชนิดผลิตน้ำส้มสายชูปนเปื้อนอยู่แล้ว เชื้อรามีความเกี่ยวข้องกับการผลิตไวน์น้อยเป็นเชื้อราที่พบปนเปื้อนที่ผิวองุ่นและที่จุกไม้ก๊อก ไม่พบในระหว่างกระบวนการหมักไวน์การทราบเรื่องจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักไวน์จะทำให้สามารถควบคุมกระบวนการผลิตไวน์ ไวน์จะมีคุณภาพดีตามที่ต้องการไม่เกิดการเน่าเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์

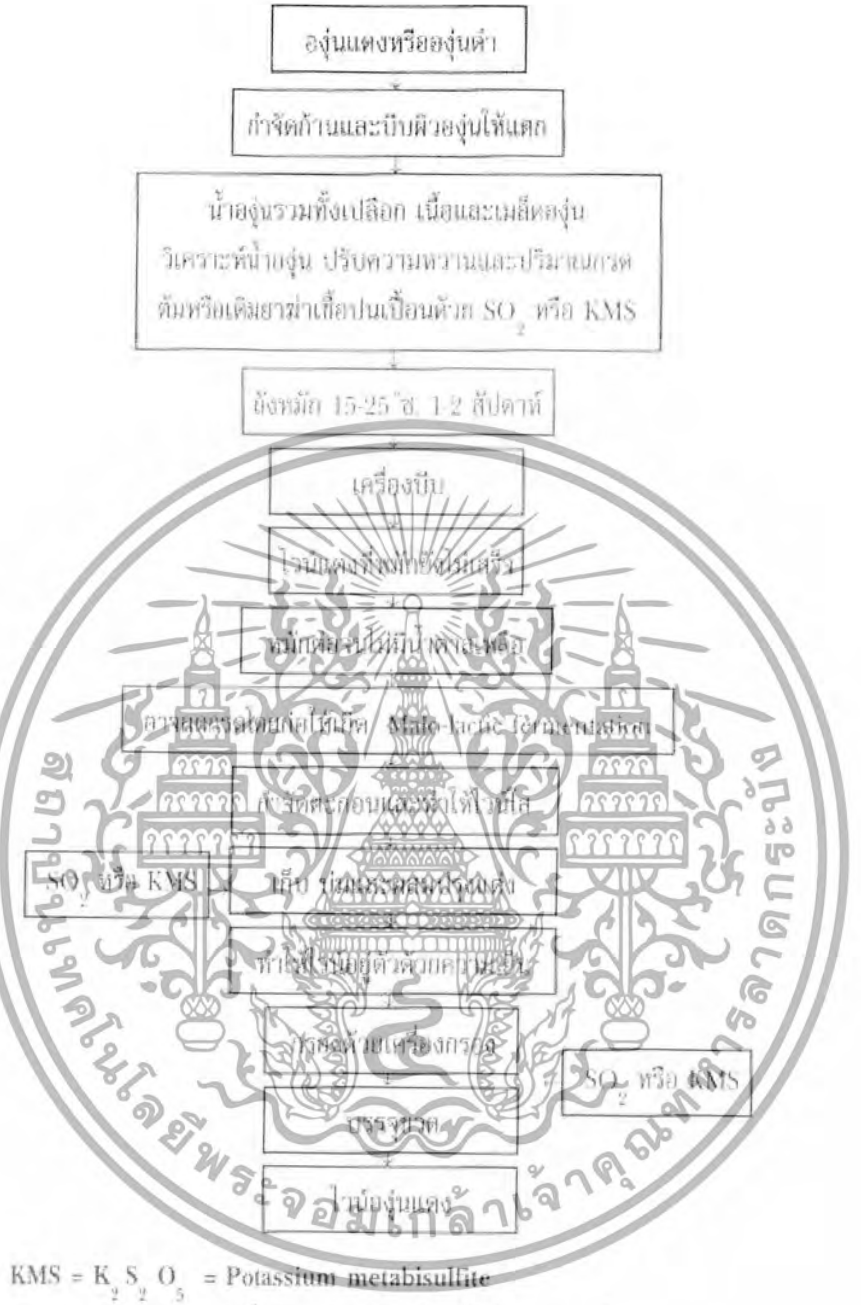
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ I แผนภูมิการผลิตไวน์ขาวจากองุ่น

รูปที่ 1 แผนภูมิการผลิตไวน์ขาวจากองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



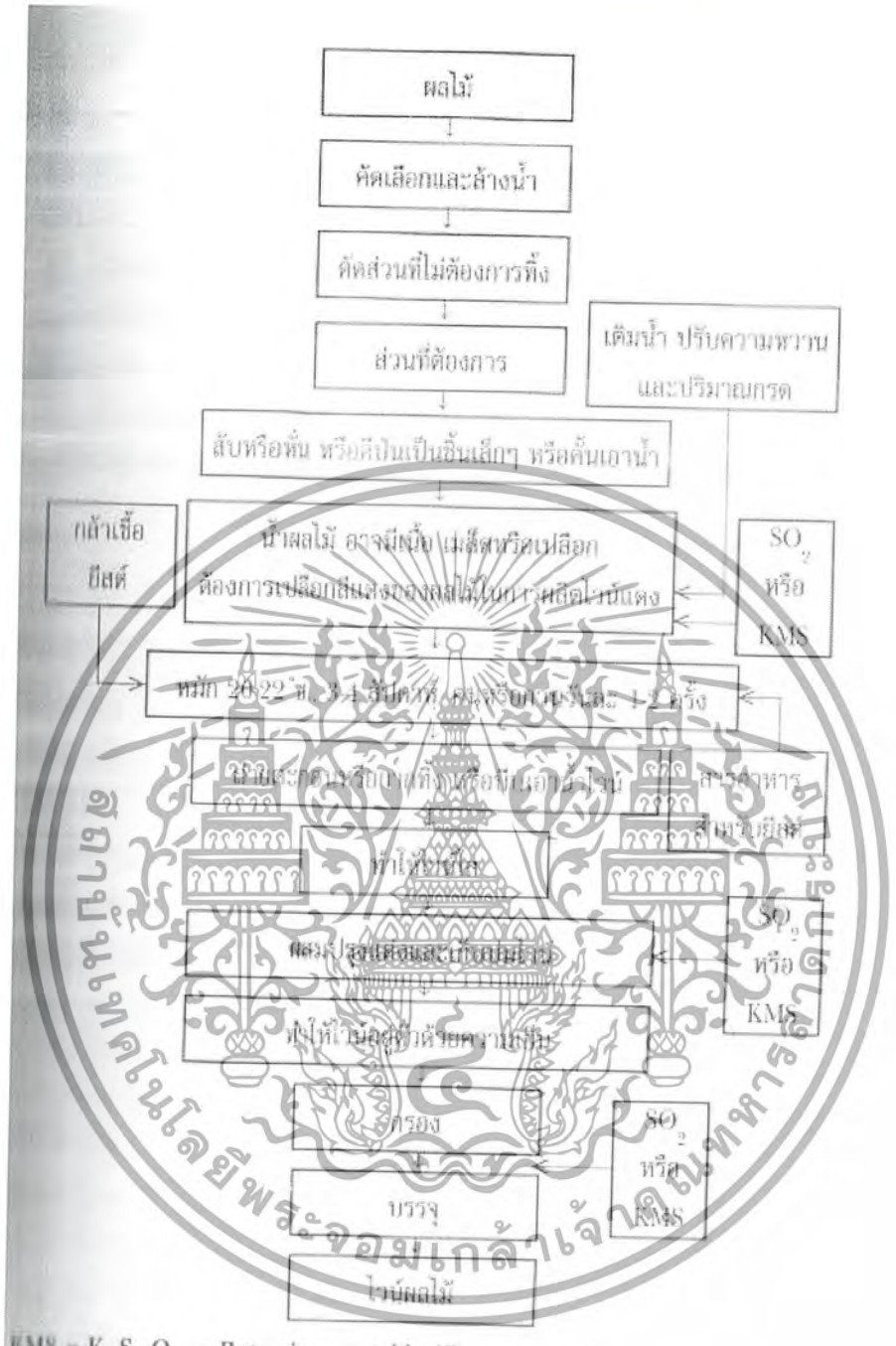
KMS = $K_2S_2O_5$ = Potassium metabisulfite

รูปที่ 2 แผนภูมิการผลิตไวน์แดงจากองุ่น

รูปที่ 2 แผนภูมิการผลิตไวน์แดงจากองุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



KMS = $K_2S_2O_5$ = Potassium metabisulfite

รูปที่ 3 แผนภูมิการผลิตไวน์จากผลไม้

รูปที่ 3 แผนภูมิการผลิตไวน์จากผลไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

58548

2.2 เห็ด

เห็ดเป็นราที่มีความสำคัญต่อมนุษย์มาก ทั้งด้านอาหาร ยาและสิ่งแวดล้อม ในโลกนี้มีเห็ดประมาณ 38,000 ชนิด แต่คนรู้จักนำมารับประทานได้เพียง 2,000 ชนิด คนส่วนมากมักคิดถึงประโยชน์ของเห็ดในด้านการประกอบอาหารและปรุงอาหารให้มีรสชาติที่อร่อยขึ้นเท่านั้น ความจริงแล้ว เห็ดมีความสำคัญกว่าที่คิด ทั้งในอดีตจนถึงปัจจุบันนี้ เห็ดหลายชนิดมีความสำคัญในด้านสุขภาพโดยตรงด้วย โดยใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อบำบัดโรค และเป็นผลิตภัณฑ์ผลิตอาหาร

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

มนุษย์รู้จักนำเห็ดมาใช้ประกอบอาหารมาตั้งแต่อดีต ซึ่งเห็ดถือว่าเป็นอาหารที่ดีทั้งด้านเนื้อสัมผัสและกลิ่นรส รวมทั้งสารอาหารที่สมบูรณ์ คือมีโปรตีน แร่ธาตุและเส้นใยมาก แต่มีแคลอรีและไขมันต่ำ ในช่วงปี ค.ศ. 1991-1994 อุตสาหกรรมการเพาะเห็ดได้เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 30.5 โดยเห็ด 6 ชนิดแรกที่มีการเพาะกันมากได้แก่ เห็ดกระดุม เห็ดหอม เห็ดกลุ่มบางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนู เห็ดฟาง และเห็ดเข็มทอง ซึ่งส่วนใหญ่ใช้บริโภคเป็นอาหาร แต่เห็ดมีประโยชน์มากกว่านั้นโดยสามารถนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคได้ เมื่อมีความเจริญก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้นทำให้เราทราบว่า โพลีแซคคาไรด์ที่แยกได้จากเห็ดชนิดต่างๆ เช่น *Lentinus edodes Schizophyllum commune* และ *Coriolus versicolor* เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เห็ดมีคุณสมบัติทางยาได้ โดยมีผลช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ยับยั้งการเกิดโรคมะเร็ง ลดระดับคอเลสเตอรอลได้ จึงได้มีการวิจัยและพัฒนาเห็ดเพื่อนำมาทำให้เกิดประโยชน์และเพิ่มคุณค่ามากขึ้น ในบทความนี้ได้ยกตัวอย่างการวิจัยและพัฒนาเห็ดมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมัก เทคโนโลยีชีวภาพในด้านการพัฒนาการผลิตอาหารหมักมีความสำคัญไม่น้อย มนุษย์รู้จักการใช้เทคโนโลยีชีวภาพด้านอาหารหมักมานานแล้วในรูปการถนอมอาหาร แปรรูปอาหาร เช่น การหมักไวน์ เบียร์ นมเปรี้ยว การผลิตอาหารหมักประเภทเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เริ่มตั้งแต่ หลุย ปาสเตอร์ (Louis pasteur) ได้ค้นพบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นตัวกลางในการหมักแอลกอฮอล์ในเบียร์และไวน์ โดยผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ซึ่งในปัจจุบันนี้เราพบว่าเห็ดบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ได้เช่นเดียวกัน เช่น *Pleurotus ostreatus Flammulina velutipes* และ *Agaricus blazei* โดยคาดหวังว่าการดื่มผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ที่ได้จากเห็ดนี้ จะได้รับประโยชน์ทางยาที่มีอยู่ในเห็ดด้วย ซึ่งจะมีผลช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และป้องกันเลือดจับตัวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นลิ่มทำให้เกิดการอุดตันเส้นโลหิต (thrombosis) ได้ ในการศึกษานี้จึงได้ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติทางยาของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ที่ได้จากเห็ด (Tokumitsu Okamura และคณะ. 2001)

2.2.1 เห็ดหูหนู JEW'S EAR MUSHROOM

เห็ดหูหนูเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในสภาพดินฟ้า อากาศของประเทศไทย และเป็นเห็ดที่ประชาชนทั่วไปนิยมรับประทานกันมาก เพราะเห็ดหูหนูเป็นเห็ดที่มีรสชาติดี กลิ่นหอม กินอร่อย และเห็ดหูหนูยังมีคุณสมบัติพิเศษที่เมื่อ ไม่ว่าจะนำมาปรุงอาหารประเภทใดเห็ดหูหนูก็ยังคงสภาพความกรอบอยู่เสมอ นอกจากนี้ เห็ดหูหนูยังมีปริมาณของโปรตีน วิตามิน เกลือแร่ ฯลฯ ในปริมาณที่สูง และยังมีคุณสมบัติเป็นยาอายุวัฒนะอีกด้วย ชาวจีนเชื่อว่า เห็ดหูหนูสามารถรักษาโรคคอเจ็บ โรคโลหิตจาง และแก้โรคร้อนในเป็นอย่างดี เห็ดหูหนูเมื่อนำมาตากแห้งจะสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานานโดยไม่เสื่อมคุณภาพ จึงทำให้ความต้องการด้านตลาดของเห็ดชนิดนี้ นับวันจะสูงมากขึ้นตามลำดับ สำหรับประเทศไทยได้มีการสั่งเห็ดหูหนูเข้าประเทศในปีหนึ่งๆ หลายสิบล้านบาท

ในสภาพธรรมชาติ เห็ดหูหนูเจริญได้ดีในเขตร้อน โดยเฉพาะสภาพภูมิ อากาศเขตเอเชียตะวันตกออกเฉียงใต้ โดยเห็ดหูหนูจะเจริญเติบโตบนขอนไม้ที่เริ่มเปื่อยผุพัง ชาวจีนนับเป็นชาติแรกที่รู้จักวิธีการเพาะ และบริโภคเห็ดหูหนูกันมานานแล้ว เห็ดหูหนูที่นำมาเพาะกันมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีรูปร่างลักษณะ ขนาด และสีสัน ตลอดจนลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างกัน ในสมัยก่อนชาวจีนเพาะเห็ดหูหนูโดยการตัดไม้โอ๊คเป็นท่อนๆ มาเพาะ แต่สำหรับประเทศไทยได้ทดลองเพาะเห็ดหูหนูโดยการตัดไม้แคมากองสุมไว้ พอถึงฤดูฝนไม้จะเริ่มผุและมีเห็ดหูหนูเกิดขึ้น จากนั้นก็สามารถเก็บดอกเห็ดหูหนูได้เรื่อยๆ จนกว่าขอนไม้จะผุ เห็ดหูหนูจัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศแทบทุกภาคของประเทศไทย จึงเหมาะอย่างยิ่งที่จะนำมาส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะกัน ทั้งนี้ เนื่องจากประเทศไทยมีวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดหูหนูอย่างเหลือเฟือ เช่น ฟางข้าว ไม้เนื้ออ่อน ขี้เลื่อย ขุยมะพร้าว ซังข้าวโพด ฯลฯ และแรงงานภายในประเทศไทยยังถูกกว่าในต่างประเทศมาก แต่ปัญหาในการเพาะเห็ดหูหนูที่สำคัญก็คือความผันแปรของเชื้อเห็ดและเชื้อเห็ดยังเสื่อมได้ง่ายกว่าเห็ดชนิดอื่นๆจึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกพันธุ์การปรับปรุงพันธุ์อยู่ตลอดเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) ลักษณะประจำพันธุ์ของเห็ดหูหนู

1. เห็ดหูหนูพันธุ์บาง *(Auricularia auricular)* เป็นเห็ดที่สามารถเกิดได้ตามธรรมชาติทั่วทุกภาคของประเทศไทย เห็ดชนิดนี้ถ้าเกิดในบริเวณที่สูงจากระดับ น้ำทะเลมากๆ จะมีสีค่อนข้างคล้ำคล้ายเห็ดหูหนูของจีน เห็ดหูหนูพันธุ์ลักษณะของดอกจะบาง มีสีน้ำตาลอ่อนหรือสีดำคล้ายเยลลี่ การออกดอกส่วนมากเป็นดอกเดี่ยวๆ ผิวเรียบ ไม่มีขนทั้งด้านบนและด้านล่าง บางพันธุ์ดอกมีลักษณะหยิกบางชนิดมีขนาดใหญ่มาก ดอกเห็ดหูหนูสดจำนวน 10-13 กิโลกรัม เมื่อนำมาตากแห้งจะได้น้ำหนัก 1 กิโลกรัม

2. เห็ดหูหนูพันธุ์หนา *(Auricularia polyricha)* ดอกเห็ดชนิดนี้มีความหนามากกว่าเห็ดชนิดแรกมาก เมื่อตัดขอบดอกออกก็สามารถลอกดอกเห็ดออกเป็น 2 ชั้นได้ง่าย ผิวด้านบนของหมวกดอกมีลักษณะเรียบ ส่วนผิวด้านล่างของหมวกดอกหรือด้านหลังจะเป็นริ้วมีขนละเอียด เห็ดแต่ละชนิดจะมีลักษณะขนและสีของขนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์เห็ด และที่สำคัญก็คือ เห็ดหูหนูหนามีสรรพคุณทางยาและคุณค่าทางอาหารสูงกว่าพันธุ์บาง และเมื่อนำไปปรุงอาหาร ปรากฏว่า เห็ดหูหนูไม่เป็นเมือก แต่มีความกรอบมากกว่าพันธุ์บาง เห็ดพันธุ์นี้มีก้านดอกสั้นมากหรือแทบไม่มีเลยดอกเห็ดจะบานคงทนกว่า น้ำหนักดี ดอกเห็ดสด 6-8 กิโลกรัม เมื่อนำมาตากแห้งจะได้น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัมจากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของกรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงอุตสาหกรรม เปรียบเทียบกันระหว่างเห็ดหูหนูและเห็ดหูหนูสด จะมีส่วนประกอบคุณค่าทางอาหารต่างกัน

2) วงจรชีวิตของเห็ดหูหนู

เห็ดหูหนูมีวงจรชีวิตแบบ Heterothallic วงจรชีวิตของเห็ดหูหนูมีดังนี้

1. เริ่มจากเห็ดหูหนูเจริญเติบโตเต็มที่ จะมีการสร้างสปอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีขาวหล่นบนพื้นหรือปลิวไปตามลม
2. เมื่อสปอร์ของดอกเห็ดปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสม เช่น ความชื้น อุณหภูมิ และอาหารที่เหมาะต่อการเจริญของเห็ดหูหนู สปอร์ก็จะงอกเส้นใยขั้นแรก (primary mycelium) ออกมาเส้นใยของเห็ดหูหนูจะมีผนังกั้น (septate hyphae) และภายในแต่ละช่องจะมีนิวเคลียส 1 อัน เส้นใยของเห็ดหูหนูจะมีการแตกกิ่งก้านมากมาย แต่ไม่สามารถจะรวมกันและพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้
3. เส้นใยของเห็ดหูหนูพวก primary mycelium จะต้องมีการผสมกันหรือรวมกันระหว่างเส้นใยที่เกิดจากต่างสปอร์กัน แต่สามารถเข้าหากันได้ (compatible) หลังจากเกิดการรวมตัวกันก็จะได้เส้นใยชั้นที่สอง (secondary mycelium) เส้นใยชั้นที่สองจะมีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เล็กกว่าขั้นแรกเล็กน้อย และภายในเส้นใยแต่ละช่อง (spectum) จะมี 2 นิวเคลียส เส้นใยชั้นที่สองนี้ระหว่างเซลจะมีข้อยึดเรียกว่า Clamp connection เส้นใยขั้นที่สองจะเจริญและมีการสะสมอาหารไว้ในเส้นใยจนสามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้ต่อไป

รูปที่ 4 แสดงลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดหูหนู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 เห็ดหลินจือ LINGZHI MUSHROOM

เห็ดหลินจือ หรือเห็ดหมื่นปี จัดเป็นเห็ดที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งที่มีสรรพคุณทางด้านเภสัช หรือเป็นยารักษาโรค เห็ดชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย แต่ชาวบ้านทั่วๆไป จะรู้จักเห็ดหลินจือในนามของ เห็ดจ้วกงู ซึ่งกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้มีการทดลองศึกษาเห็ดชนิดนี้มานานแล้ว แต่ประชาชนส่วนใหญ่ไม่ค่อยให้ความสนใจเท่าที่ควร ต่อมามีข่าวทางหน้าหนังสือพิมพ์เกี่ยวกับการพบเห็ดชนิดนี้ขึ้นตามธรรมชาติ บริเวณโคนไม้ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้มีการตั้งชื่อเห็ดชนิดนี้ว่า *เห็ดหมื่นปี*

นอกจากนี้ ดร.ปรีชา กลิ่นเกษร ได้ทำการศึกษา ค้นคว้า และรายงานว่าพบเห็ดหลินจือเจริญเติบโตตามธรรมชาติ ในบางท้องที่ของประเทศไทย ประกอบกับได้มีการเชิญ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ฟูกูมิ โมริชิเงะ และคณะ มาบรรยายเกี่ยวกับประสบการณ์ในการใช้เห็ดหลินจือรักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็งที่มหาวิทยาลัยมหิดล และกรมวิชาการเกษตร ศูนย์รวม สวนเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ร่วมมือกันทำการศึกษา วิจัย และเก็บรวบรวมข้อมูลต่างๆเกี่ยวกับสูตรอาหารเพาะเห็ด เทคนิคการเพาะเห็ด และสรรพคุณเห็ดในการรักษาโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็งถ้าพบว่าเห็ดหลินจือมีสรรพคุณดังกว่าแล้ว เห็ดชนิดนี้ก็จะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและทำรายได้ให้แก่ประเทศอย่างมหาศาลทีเดียว ดังนั้น นายแพทย์ เภสัชกร และนักวิชาการเกษตร ควรให้ความสนใจทดลอง ค้นคว้าเกี่ยวกับสรรพคุณของเห็ดหลินจืออย่างจริงจัง และติดตามผลงานวิจัยของต่างประเทศใกล้ชิดตลอดเวลา

จากการที่ชาวจีนส่วนใหญ่เชื่อว่าเห็ดชนิดนี้เป็นยาอายุวัฒนะ ทำให้ผู้บริโภคมีอายุยืนยาวจึงเรียกชื่อเห็ดพวกนี้ว่า เห็ดหลินจือ ซึ่งคนไทยเรียกว่า เห็ดหมื่นปี เพื่อให้มีความหมายสอดคล้องกับคุณสมบัติของเห็ด โครงสร้างของเห็ดชนิดนี้ จะมีลักษณะแห้งและแข็งเหมือนไม้ ถ้าหากนำดอกเห็ดมาชุบยากันแมลง แล้วอบให้แห้งจะสามารถเก็บเห็ดชนิดนี้ได้นานนับชั่วอายุคน แต่ไม่ใช่หมายความว่าดอกเห็ดหลินจือที่เจริญเติบโตตามธรรมชาติจะมีอายุถึงหมื่นปี อย่างไรก็ตาม เห็ดหลินจือจัดเป็นเห็ดที่ค่อนข้างใหม่สำหรับวงการเพาะเห็ดเป็นอาชีพ ประกอบกับการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับเห็ดหลินจือยังต้องทำอีกมาก นอกจากนี้ นักวิชาการหลายท่านยังเป็นห่วงว่าเห็ดชนิดนี้อาจเป็นเห็ดทีทำลายป่าไม้ก็ได้ ดังนั้นในการที่จะเพาะเห็ดหลินจือเป็นอาชีพ ผู้เพาะควรคิดให้รอบคอบเสียก่อน โดยพิจารณาตลาดที่จะจำหน่ายเป็นปัจจัยอย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการเพาะเห็ดหลินจือในถุงพลาสติกที่ฟาร์มเห็ดอรัญญิกและฟาร์มอื่นๆ ถ้าผู้เพาะเห็ดสนใจ ก็สามารถหาซื้อหัวเชื้อมาเพาะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) ลักษณะธรรมชาติของเห็ดหลินจือ

เห็ดหลินจือจัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีในธรรมชาติ โดยเจริญเติบโตตามโคนไม้ ในเขตอบอุ่นและเขตร้อน จากการศึกษาพบว่า เห็ดหลินจือเจริญเติบโตได้ดีบนตอไม้ที่ตายแล้ว โดยเฉพาะต้นคูน ก้ามปู หางนกยูงฝรั่ง ยางพารา ฯลฯ แต่ในบางครั้งพบว่าเห็ดชนิดนี้เป็นปรสิตของรากบัว จึงทำให้[illegible] อาจจะไปทำลายป่าไม้หรือพืชผลบางชนิดก็ได้ ทั้งนี้ เนื่องจากมีรายงานจากประเทศมาเลเซียว่าเห็ดชนิดนี้เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคลำต้นเน่าในต้นปาล์ม และโรครากเน่าในยะพร้าว

2) ส่วนประกอบของเห็ดหลินจือ

เห็ดหลินจือจัดเป็นเห็ดพวก Polypore เห็ดพวกนี้เรียกอีกชื่อว่ามีลักษณะเป็นรูอยู่ใต้หมวกดอกประกอบกับเห็ดหลินจือเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีในหลายพื้นที่ของประเทศ เห็ดหลินจือที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิด (species) คนทั่วไปเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า เห็ดกิ่ง ซึ่งมีลักษณะคล้ายเห็ดในสกุล Ganoderma เห็ดหิ้งบางชนิดอาจไม่ใช่เห็ดหลินจือก็ได้ตามปกติเห็ดหลินจือมีรูปร่างและส่วนประกอบดังนี้

(1) หมวกดอก (cap) ดอกเห็ดหลินจือ อาจเกิดเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มๆ ละ 3-4 ดอกที่มีโคนดอกติดกัน หมวกดอกที่เกิดออกมาใหม่ๆ จะมีลักษณะเป็นแท่งสีเหลือง สีของดอกเห็ดจากยอดลงมาจะมีสีขาว สีเหลือง และสีน้ำตาล ตามลำดับ ต่อมาส่วนบนของหมวกดอกจะแผ่ออกคล้ายพัดดอกเห็ดในขณะที่ยังอ่อนอยู่จะมีสีขาวหรือสีเหลือง กลางหมวกดอกจะเข้มมากขึ้น เนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดจะมีเส้นใยสีน้ำตาล ความหนาของผิวหมวกดอกไปจนรูที่อยู่ใต้หมวกดอกจะหนาประมาณ 0.2-1.0 ซม. ผิวของหมวกดอกมีลักษณะเป็นเงามันคล้ายทาด้วยแชลแลค มีสีน้ำตาลแดง หรือสีเซสนัส

(2) ครีบดอก (gills) ครีบดอกของเห็ดหลินจือ จัดเป็นพวก Polypore ใต้หมวกดอกมีลักษณะเป็นรูเล็กๆ สีขาวหรือสีเหลืองจำนวนมากมาย ภายในรูเป็นแหล่งกำเนิดของสปอร์ เมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างสปอร์และปล่อยสปอร์ออกมามากมายสปอร์บางส่วนจะปลิวตกลงบนพื้น แต่สปอร์บางส่วนจะลอยขึ้นไปปกคลุมผิวของหมวกเห็ด มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเมื่อนำสปอร์มาชิมดูจะพบว่ามีรสขม สปอร์ของเห็ดหลินจือมีสีน้ำตาลเป็นผง สปอร์มีรูปร่างกลมรีปลายด้านหนึ่งตัด มีผนังหนา 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียบ ส่วนผนังชั้นในมีลักษณะคล้ายหนาม ยื่นออกมาชนผนังชั้นนอก

(3) ก้านดอก (stalk) เห็ดหลินจืออาจจะมีก้านดอกหรือไม่ก็ได้โดยเฉพาะเห็ดหลินจือที่ขึ้นตามตอไม้ อาจไม่พบก้านดอกก็ได้ ก้านดอกอาจจะอยู่ถึงกลาง หรือค่อนไปข้างใดข้างหนึ่งของหมวกดอกก็ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) คุณสมบัติของเห็ดหลินจือในการรักษาโรค

เห็ดหลินจือเป็นเห็ดสมุนไพร ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นยาอายุวัฒนะ ทำให้ผู้บริโภค มีอายุยืนนานโดยเฉพาะชาวจีนเชื่อกันว่า เห็ดหลินจือมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคมา ตั้งแต่สมัยโบราณนับเป็นพันๆปีมาแล้ว ประกอบกับเห็ดหลินจือที่ขึ้นตามธรรมชาติ มีน้อยมาก จึงทำให้เห็ดหลินจือมีราคาแพงมาก ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับ สรรพคุณ เห็ดหลินจือในการรักษาโรคต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่นได้ให้ความสนใจเห็ดชนิดนี้เป็นอย่างมาก ส่วนประเทศไทยเริ่มให้ความสนใจเห็ดหลินจือเมื่อไม่นานมานี้

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ฟูมิ โมริชิเงะ ซึ่งเป็นชาวญี่ปุ่นและคณะ ได้รับเชิญมาบรรยายที่มหาวิทยาลัยมหิดล และกรมวิชาการเกษตร เกี่ยวกับประสบการณ์ในการใช้เห็ดหลินจือช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก ซึ่งมีประชาชนและผู้สนใจเข้าฟังการบรรยายอย่างมากมาย นอกจากเห็ดหลินจือจะช่วยในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งแล้ว ยังช่วยให้อาการคนไข้ฟื้นคืนสู่สภาพปกติอย่างรวดเร็วหลังจากการผ่าตัดเอาเนื้อร้ายออก แต่ก็ยังไม่มีรายงานว่าเห็ดหลินจือที่เจริญเติบโตในประเทศไทยมีคุณสมบัติดังกล่าว อย่างไรก็ตาม กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตรฟาร์มเห็ดอรัญญิก คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยมหิดล และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ร่วมกันวิจัยเพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับสรรพคุณของเห็ดหลินจือในการรักษาโรค ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อวงการแพทย์ และการส่งเห็ดหลินจือเป็นสินค้าออก

2.2.3 เห็ดนางรม OYSTER MUSHROOM

เห็ดนางรม (Oyster mushroom) จัดเป็นเห็ดที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางถิ่น ประเทศแถบยุโรป เห็ดพวกนี้ เจริญเติบโตได้ดีในพวกไม้โอ๊ก (oak) ไม้เมเบิ้ล (maple) ไม้พีช (peach) ฯลฯ และสามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไปในเขตอบอุ่น ต่อมาได้มีการนำเข้ามาทดลองเพาะเลี้ยงในประเทศไทย พบว่าเห็ดชนิดนี้สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตได้ดีในประเทศไทย จึงได้มีการเผยแพร่วิธีการเพาะเห็ดชนิดนี้ จนเป็นที่รู้จักของประชาชนทั่วๆไป เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่ประชาชนนิยมรับประทานกันมาก ทั้งนี้ เนื่องจากเห็ดนางรมเป็นเห็ดที่มีสีขาวสะอาด มีคุณค่าทางอาหารสูง และมีรสชาติหอมหวาน นอกจากนี้เนื้อของเห็ดนางรมยังไม่ เหนียวมากเหมือนเห็ดมะม่วงหรือเห็ดขอนขาว และที่สำคัญก็คือ เห็ดนางรมมีสารบางอย่างที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคไม่แพ้เห็ดชนิดอื่นๆ จึงทำให้ประชาชนรู้จักเห็ดชนิดนี้เป็นอย่างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดนางรม จัดเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเฉพาะโปรตีน คาร์โบไฮเดรท วิตามิน ไม่แพ้เห็ดชนิดอื่นๆ นอกจากนี้เห็ดนางรมยังให้ปริมาณแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส โปแทสเซี่ยม และยังให้พลังงานค่อนข้างสูง เห็ดนางรมมีวิตามินบี 1 วิตามินบี 2 สูงกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ และยังมีกรดโฟลิค สูงกว่าพืชผักและเนื้อสัตว์ กรดพวกนี้ช่วยป้องกันรักษาโรคโลหิตจางได้ จึงเหมาะสมสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และยังเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักตัว เพราะมีปริมาณของไขมันน้อยและมีปริมาณโซเดียมต่ำจึงเหมาะที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ที่เป็นโรคหัวใจและโรคไตอักเสบ ประกอบกับเห็ดนางรมเป็นเห็ดที่เพาะง่าย สามารถเจริญเติบโตได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย จึงได้มีการเพาะเห็ดชนิดนี้กันอย่างแพร่หลาย เห็ดนางรมที่นิยมเพาะกันทั่วไปมี 2 ชนิดคือ

(1) เห็ดนางรมสีขาว (white type) หรือ Florida type จัดเป็นเห็ดนางรมที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิสูง จึงเหมาะที่จะนำมาเพาะในช่วงฤดูร้อน เห็ดชนิดนี้จะออกดอกได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส หมวกดอกมีสีขาว และมีน้ำหนักมากกว่าเห็ดนางรมสีเทา แต่หมวกดอกของเห็ดนางรมสีขาวจะมีขนาดเล็ก และบางกว่าเห็ดนางรมสีเทา

(2) เห็ดนางรมสีเทา (Gray type) หรือ winner type เห็ดพวกนี้เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำ จึงเหมาะที่จะนำมาเพาะช่วงฤดูหนาว โดยเห็ดจะออกดอกได้ดีที่ระดับอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส หมวกดอกหนาและมีขนาดใหญ่ แต่ผลผลิตจะต่ำกว่าเห็ดนางรมสีขาว

1) รูปร่างลักษณะของดอกเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ด ที่มีรูปคล้ายหอยนางรม จึงเรียกเห็ดนี้ว่า Oyster mushroom ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

(1) หมวกดอก (cap) หรือ Pileus หมวกดอกมีลักษณะคล้ายหอยนางรม หมวกดอกมีลักษณะแบนราบไม่เหมือนเห็ดฟาง กลางหมวกดอกมีลักษณะเว้าเป็นแอ่ง หมวกดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-15 เซนติเมตรหมวกดอกอาจมีสีขาวหรือสีเทาก็ได้ และลักษณะของหมวกดอกจะเป็นเนื้อเดียวกับก้านดอก

(2) ก้านดอก (Stalk) เป็นส่วนที่ใช้ชูก้านดอกขึ้นไปในอากาศ ก้านดอกค่อนข้างสั้นและเจริญเข้าหาแสงสว่าง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) วงจรชีวิตของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบ Heterothallic ซึ่งเกิดจากดอกเห็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างเบซิดิโอสสปอร์ (Basidiospore) เมื่อสปอร์พวกนี้ปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสม ก็จะงอกเส้นใยขั้นที่ 1 (primary mycelium) ออกมา เส้นใยขั้นที่ 1 จะมีนิวเคลียสเดี่ยวอันเดียว (haploid) ต่อมาเส้นใยขั้นที่ 1 ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต่างกัน จะรวมตัวกันแล้วพัฒนาไปเป็นเส้นใยขั้นที่ 2 (Secondary mycelium) ซึ่งมีนิวเคลียส 2 อัน เส้นใยขั้นที่ 2 นี้ อาจจะเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Dikaryotic mycelium เส้นใยขั้นที่ 2 จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงเส้นใยขั้นที่ 2 เส้นใยขั้นที่ 3 (Teritiary mycelium) จากนั้น เส้นใยจะค่อยๆ พัฒนาไปเป็น fruiting body และเจริญไปเป็นดอกเห็ดต่อไป

3) ธรรมชาติของเห็ดนางรม

เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีการดำรงชีพแบบ Saprophytic fungi แต่ในบางครั้งก็จัดเป็นพวกปาราสิต (Parasite) โดยเจริญเติบโตบนต้นไม้ที่มีชีวิตและเมื่อต้นไม้ตาย เห็ดนางรมก็ยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อีก การดำรงชีพตามธรรมชาติของเห็ดนางรมมีดังนี้

(1) เห็ดนางรมจัดเป็นเห็ดที่มีความสามารถย่อยสารประกอบ ที่มีโมเลกุลซับซ้อนได้ดีกว่าเห็ดฟาง โดยเฉพาะพวกเซลลูโลส ลิกนิน ฯลฯ จึงทำให้วัสดุที่ใช้ในการเพาะ โดยเฉพาะขี้เลื่อยไม้ยางพาราไม่จำเป็นต้องผ่านการหมักก็ได้

(2) ความสามารถในการดำรงชีวิต ในกรณีที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เห็ดนางรมสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยการสร้างคลามัยโดสปอร์ (Chlamydospore) อยู่ตามตอไม้ เมื่ออากาศชุ่มชื้นและสภาพแวดล้อมเหมาะสมเห็ดนางรมก็จะงอกเส้นใยออกมา จากนั้นเส้นใยก็จะพัฒนาไปเป็นดอก และมีการสร้างสปอร์แพร่พันธุ์ต่อไป และเห็ดนางรมยังสามารถเจริญเติบโตบนท่อนไม้ได้ อย่างดี

(3) เห็ดนางรม จัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดเล็กน้อยหรือมี พีเอช 5.0-5.2 การผสมขี้เลื่อยหรือวัสดุที่ใช้เพาะไม่จำเป็นต้องใส่ปูนขาวลงไป

(4) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด ควรอยู่ประมาณ 30-32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะต่อการออกดอก หรือสร้างดอกประมาณ 25 องศาเซลเซียส

(5) เส้นใยของเห็ดนางรมมีความสามารถในการเจริญเติบโตและมีการเชื่อมต่อของเส้นใยได้เร็วมาก จึงทำให้เส้นใยเดินเต็มก้อนเชื้อได้เร็วกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ และยังมีความสามารถในการใช้น้ำตาลที่อยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรทได้อย่างดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 5 แสดงลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดนางรม

2.2.4 เห็ดนางฟ้า SAJOR-CAJU MUSHROOM

เห็ดนางฟ้า จัดเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดนางรมและถือเป็นเห็ดค่อนข้างใหม่ในการนำมาผลิตเพื่อการค้า เห็ดชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดแถบภูเขาหิมาลัย ประเทศอินเดีย ในสภาพธรรมชาติ เห็ดนางฟ้าชอบเจริญเติบโตตามตอไม้ผุๆ ในบริเวณที่มีอากาศชื้นและเย็น เห็ดพวกนี้มีลักษณะคล้ายเห็ดนางรมและเห็ดเป๋าฮื้อ แต่ดอกเห็ดจะมีสีขาวจนถึงสีน้ำตาลอ่อน เห็ดนางฟ้าสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 15- 35 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จัดเป็นอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุด

เห็ดนางฟ้า ได้ถูกนำเข้ามาทดลองเพาะในประเทศไทย ครั้งแรก โดย ดร.ประสิทธิ์ ใจเย็น ได้ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดนางฟ้าพันธุ์ที่ได้รับพระราชทานจากสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ปรากฏว่าเห็ดชนิดนี้ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพ ภูมิอากาศของประเทศไทย ต่อมา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้นำมาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ปรากฏว่า เห็ดนางฟ้าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารทุกชนิด พบว่าเห็ดชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดี วิธีการเพาะเลี้ยงง่าย เหมาะให้เกษตรกรรายย่อย จึงได้มีการเพาะเห็ดชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายในรูปการค้ามากขึ้น เพราะเห็ดนางฟ้าเป็นเห็ดที่มีขนาดดอกใหญ่ เนื้อแน่น รสชาติดี เหมาะที่จะนำมาแปรรูปบรรจุกระป๋อง

1) ลักษณะทางอัณฐานวิทยา

เห็ดนางฟ้าจัดเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป๋าฮื้อ แต่เห็ดนางฟ้าจะมีหมวกดอกหนาและเนื้อแน่นกว่าเห็ดนางรม ลักษณะของดอกทั่วๆ ไป ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

(1) หมวกดอก (cap) หมวกดอกจะมีเนื้อแน่น และมีสีคล้ำคล้ายเห็ดเป๋าฮื้อ แต่สีของหมวกดอกจะจางกว่า หมวกดอกจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-6 นิ้ว ดอกอาจจะออกมาเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือเป็นกระจุกก็ได้

(2) ก้านดอก (Stalk) ก้านดอกของเห็ดนางฟ้าจะเป็นเนื้อเดียวกับหมวกดอก คล้ายเห็ดนางรม แต่มีเนื้อแน่นสีขาว และไม่มีวงแหวนรอบก้านดอก ถ้าเห็ดนางฟ้าเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติตามขอนไม้ ดอกเห็ดจะมีลักษณะเรียงรายลดหลั่นกันเป็นชั้นๆ ก้านดอกจะสั้นมาก

(3) ครีบดอก (Gills) ครีบดอกของเห็ดนางฟ้าจะมีสีขาว ยาวตลอด และบริเวณครีบดอกจะเป็นแหล่งสร้างสปอร์ของเห็ดนางฟ้า

(4) เส้นใยของเห็ดนางฟ้า (Mycelium) เส้นใยจะมีลักษณะค่อนข้างละเอียด และมีสีขาวมากกว่าเห็ดนางรมเล็กน้อย การเจริญเติบโตของเส้นใยจะมีลักษณะคล้ายเห็ดนางรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) คุณค่าทางอาหารของเห็ดนางฟ้า

จากการที่เห็ดนางฟ้าเป็นเห็ดที่มีกลิ่นหอม เนื้อแน่น เจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูฝน ต่อต้นฤดูหนาว ประมาณเดือน [illegible] จึงทำให้เห็ดนางฟ้าจัดเป็นเห็ดที่น่าสนใจชนิดหนึ่ง [illegible] เห็ดนางฟ้ายังจัดเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางโภชนาการและธาตุค่อนข้างสูง เห็ดนางฟ้าประกอบด้วยคุณค่าทางอาหาร ดังต่อไปนี้

1. ปริมาณของธาตุอาหาร (Nutrients) [illegible] ดังต่อไปนี้ (Bano et al. 1981)

แคลเซียม	(Ca)	20	mg/100 gm
ฟอสฟอรัส	(P)	760	mg/100 gm
โปแทสเซียม	(K)	3260	mg/100gm
เหล็ก	(Fe)	124	ppm
แคดเมี่ยม	(Cd)	0.3	ppm
สังกะสี	(Zn)	12.0	ppm
ทองแดง	(Cu)	12.2	ppm
ตะกั่ว	(Pb)	3.2	ppm

2. ปริมาณของกรดอะมิโน (amimo acid) ปริมาณของกรดอะมิโน คำนวณในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัม ของ Crude protein nitrogen (*Jamdalk and Kapoor, 1976*)

Isoleucine	78.4
Leucine	68.1
Lysine	73.5
Methionine + Cystine	62.7
Phenylalanine + Tyrosine	137.8
Threonine	88.0
Tryptophan	91.6
Valine	76.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ทฤษฎีของอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุฟ้าในสนามไฟฟ้า พอลิเมอร์ทางชีวภาพ (biological polymer) ส่วนใหญ่มีประจุจึงสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ อาศัยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแมโครโมเลกุล (maccromoleule) ตัวอย่างเช่น มวลโมเลกุล (molecular mass) ของโปรตีน (protein) ความแตกต่างของโมเลกุลในแง่ประจุสุทธิและรูปร่างของมัน รวมทั้งการแยกโมเลกุลที่ต่างกันด้วย

อนุภาคมีประจุสุทธิ q อยู่ในตัวกลาง (medium) ที่เป็นฉนวน เมื่อนำอนุภาคนี้เข้าสู่สนามไฟฟ้า อนุภาคจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วคงที่ ซึ่งเป็นสมดุลระหว่างแรงไฟฟ้า (electrical force) และแรงเสียดทาน (frictional force) ของตัวกลาง

แรงไฟฟ้า (F) เป็นผลมาจากประจุสุทธิบนอนุภาคและความต่างศักย์ไฟฟ้า (voltage, E) หรือเกรเดียนต์ของความต่างศักย์ไฟฟ้า (potential gradient)

$$F = Eq$$

แรงเสียดทานของตัวกลาง (F') ขึ้นกับขนาดและรูปร่างของอนุภาครวมทั้งความหนืด (viscosity) ของสารละลาย

$$F' = 6\pi r\eta v$$

r = รัศมีของอนุภาคที่มีรูปร่างกลม

η = ความหนืดของสารละลาย

v = ความเร็วของการเคลื่อนที่ผ่านสารละลายที่มีความหนืดในสนามไฟฟ้า

เนื่องจาก $F = F'$

จะได้สมการ $Eq = 6\pi r\eta v$

$$v = \frac{Eq}{6\pi r\eta}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Electrophoretic mobility (m) หมายถึง ระยะทาง (d) ของการเคลื่อนที่ของอนุภาคต่อหน่วยเวลา (t) และหน่วยความต่างศักย์ไฟฟ้า

$$m = \frac{d}{tE} \text{ หรือ } m = \frac{v}{E}$$

$$m = \frac{q}{6\pi r\eta}$$

จะเห็นว่าค่า m เพิ่มขึ้นเมื่อ q เพิ่มขึ้น แต่เมื่อขนาดของอนุภาคและความหนืดของสารละลายเพิ่มขึ้นค่า m จะลดลง และจะมีค่าเป็นศูนย์เมื่ออนุภาคไม่มีประจุ

ความต่างศักย์ไฟฟ้ามีค่าเท่ากับอัตราส่วนของความหนาแน่นของกระแสไฟฟ้า (current density หรือ J) และการนำไฟฟ้าจำเพาะ (specific conductivity หรือ k) เพราะฉะนั้นความเร็วของการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุมีค่าดังนี้

$$v = Em = \frac{mJ}{k}$$

โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีทั้งหมู่ที่แสดงประจุบวกและหมู่ที่แสดงประจุลบบนโมเลกุล ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสวิตเตอร์ไอออน (zwitterion) เนื่องจากค่าคงที่ของการแตกตัว (dissociation constant หรือ pK) ของหมู่ที่แสดงประจุเหล่านี้แตกต่างกันมาก จึงทำให้ประจุสุทธิบนโมเลกุลขึ้นกับ pH ของสิ่งแวดล้อม เพราะฉะนั้นค่า pH จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเมกุล นอกจากนี้ค่าไอออนิกสเตรนจ์ (ionic strength หรือ μ) ของสารละลายก็มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ด้วยความเร็วของการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุเป็นสัดส่วนกลับกับรากที่ 2 ของ $\mu\left(\sqrt{\mu}\right)$ ถ้าไอออนิกสเตรนจ์ต่ำ ความเร็วของการเคลื่อนที่จะสูงขึ้นในขณะที่ถ้าไอออนิกสเตรนจ์สูงจะทำให้ความเร็วของการเคลื่อนที่ช้าลง แต่จะได้แถบ (band) ของโมเลกุลที่แยกออกจากกันคมชัดกว่าสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) ที่มีค่าไอออนิกสเตรนจ์ต่ำ อย่างไรก็ตามเมื่อสารละลายบัฟเฟอร์มีไอออนิกสเตรนจ์สูงขึ้นจะทำให้เกิดการนำไฟฟ้าที่สูงขึ้นและเกิดความร้อนสูงตามไปด้วย เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการแพร่ (diffusion) ของไอออน (ion) และการเคลื่อนที่ของไอออนจะเพิ่มขึ้น (ประมาณ 2.4 % ต่อทุกๆ องศาเซลเซียส) และในขณะเดียวกันความหนืดของตัวกลางจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้ความต้านทานฟ้าจะลดลงและที่ความต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศักย์ไฟฟ้าคงที่กระแสไฟฟ้าจะเพิ่มขึ้นทำให้เกิดความร้อนออกมาเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพราะฉะนั้น การเลือกบัฟเฟอร์ที่มีไอออนิกสเตรนจ์ที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญทั้งนี้เนื่องจากมันเป็นตัวกำหนดกำลังไฟฟ้า (power) ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กำลังไฟฟ้าสูงเกินไปจะมีผลให้เกิดความร้อนสูงทำให้ตัวทำละลาย (solvent) ระเหยออกจากตัวกลางได้ ซึ่งมีผลต่อการแยกทำให้ได้แถบซ้อนกัน นอกจากนี้ยังอาจทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ (เกิด denaturation) ได้ หรือถ้าเป็นเอนไซม์ (enzyme) ก็อาจทำให้สูญเสียแอกติวีตี (activity) ได้ ในทางตรงกันข้ามใช้กำลังไฟฟ้าต่ำเกินไปสามารถขจัดปัญหาการเกิดความร้อนสูงได้ แต่ผลการแยกจะไม่ดีเนื่องจากเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะนานขึ้น ทำให้เพิ่มการแพร่ของไอออนหรือโมเลกุล

2.3.1 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซน (Zone Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซน เป็นเทคนิคที่สารละลายตัวอย่าง (sample solution) ถูกหยดเป็นจุด (spot) หรือถูกเคลือบเป็นแถบบางๆ บนตัวกลางค้ำจุนที่เฉื่อยต่อสารเคมี ตรงบริเวณที่ห่างจากอิเล็กโทรด (electrode) พอควร แล้วปล่อยให้องค์ประกอบที่ผ่านตัวทำละลายไปบนตัวกลางที่อยู่ในสนามไฟฟ้า ตัวกลางอาจเป็นกระดาษกรอง เซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate) หรือเจล (gel) อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซนนี้มีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารผสม หาความบริสุทธิ์ของสารและเตรียมสารให้บริสุทธิ์ เนื่องจากโมเลกุลถูกเคลือบเป็นแถบบางบนตัวกลางจึงใช้ปริมาณของสารตัวอย่างน้อย

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซนแบ่งออกเป็นหลายชนิดตามชนิดของตัวกลางค้ำจุนที่ใช้ดังนั้นคือ

1. อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ (paper electrophoresis)
2. อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต (celllose acetate electrophoresis)
3. อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล (gel electrophoresis)

2.3.2 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ

สมัยก่อนนิยมใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษในการแยกโปรตีนและแมโครโมเลกุลอื่นๆ แต่ในปัจจุบันไม่นิยมใช้เทคนิคนี้ เพราะกระดาษกรองมีขนาดรูพรุนไม่สม่ำเสมอและสามารถดูดซับสารบางชนิดโดยเฉพาะโปรตีนได้ ซึ่งมีผลทำให้ได้แถบกว้าง ให้ผลการแยกต่ำและบางครั้งแบบที่ได้จะเป็นทางๆ ตัวอย่างเช่นถ้าใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษแยกโปรตีนในซีรัมปกติจะเห็นแถบของโปรตีนแค่ 5 แถบเท่านั้น ทั้งนี้เพราะแบนที่ได้ไม่คมชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้กระดาษกรองเป็นตัวกลางสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในปัจจุบันมีขีดจำกัด โดยใช้แยกเฉพาะโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโน (amino acid) เพปไทด์ (peptide) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าค่อนข้างสูงเป็น high-voltage paper electrophoresis (ประมาณ 200 โวล์ต/เซนติเมตร) ถ้าใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำเป็น low-voltage paper eletrophoresis ตัวอย่างเช่นที่ 20โวล์ต /เซนติเมตรจะมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอที่จะแยกโมเลกุลเล็กๆ เช่น กรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ได้เลย ทั้งนี้เพราะโมเลกุลเหล่านี้มีประจุน้อย ทำให้มีการเคลื่อนที่ช้า การแยกโมเลกุลก็เกิดขึ้นช้าตามไปด้วยและเกิดการแพร่ได้เนื่องจากเป็นโมเลกุลขนาดเล็ก เมื่อใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำแยกกรดอะมิโน จะสามารถแยกกรดอะมิโนเป็น 3 กลุ่มเท่านั้น คือ กลุ่มที่เป็นกรด กลุ่มที่เป็นกลาง และกลุ่มที่เป็นด่าง ถ้าใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงการแยกจะเกิดขึ้นเร็ว แต่จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าสูงและเกิดความร้อนขึ้นจึงจำเป็นต้องมีระบบทำความเย็นระบายความร้อนที่เกิดขึ้น

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษที่ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงในการแยกกรดอะมิโนและเพปไทด์อาจได้ผลไม่สมบูรณ์ จึงนิยมทำร่วมกับโครมาโทกราฟี (chromatography) เป็นเทคนิคการแยกแบบ 2 มิติ (two-dimensional separation tecchnique) ซึ่งอาจทำอิเล็กโทรโฟรีซิสก่อนแล้วจึงทำโครมาโทกราฟีหรืออาจจะทำโครมาโทกราฟีก่อนแล้วตามด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสก็ได้

รูปที่ 6 เครื่องมือสำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ และแบบเซลลูโลสอะซีเตต

2.3.3 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเซลลูโลสอะซีเตต

ตัวกลางซึ่งเป็นแผ่นเซลลูโลสอะซีเตตมีขนาดรูพรุนสม่ำเสมอ ไม่ดูดซับแมโครโมเลกุลชีวภาพ (biological macromolecule) เช่น โปรตีน ในขณะที่เซลลูโลส (cellulose) ในแผ่นกระดาษกรองมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) สามารถดูดซับสารได้ การดูดซับนี้จะขัดขวางการเคลื่อนที่ของสารทำให้แถบหรือจุดที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นหางยาวซึ่งมีผลลดประสิทธิภาพในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยก แผ่นเซลลูโลสอะซีเตตมีหมู่ไฮดรอกซิลส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนไปเป็นหมู่อะซีเตต (acetate group) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ดูดซับสาร ทำให้ได้ผลการแยกที่ดีกว่าเมื่อใช้กระดาษกรองเป็นแผ่นตัวกลาง และการแยกเกิดขึ้นได้เร็วกว่าที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ นอกจากนี้คุณสมบัติของเซลลูโลสอะซีเตตที่ไม่ดูดซับสารหรือดูดซับสารน้อยนี้ยังมีผลลดพื้นหลัง (background) หลังจากการย้อมสี (staining) ทำให้เพิ่มความไว (sensitivity) ในการตรวจวัด ข้อดีของเซลลูโลสอะซีเตตอีกข้อหนึ่งคือ เป็นสารโปร่งใสจึงช่วยในการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีสเปกโทรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) และสามารถใช้สารละลายหลายชนิดในการชะสารที่แยกออกจากแผ่นเมมเบรน(membrane) นี้ได้

การแยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ นิวคลีโอไทด์ และไธออล (thiol) สามารถใช้แผ่นเซลลูโลสอะซีเตตโดยใช้วิธีเหมือนกับการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษทั้งบัฟเฟอร์ สภาวะต่างๆ และวิธีการตรวจวัดและลักษณะการทำเป็นแบบแนวนอน (horizontal)

2.3.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล

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

2.3.5 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแป้งเจล (Starch Gel Electrophoresis)

แป้งเป็นเม็ดเล็กๆ (granule) ที่ประกอบด้วยส่วนผสมของอะไมโลส (amylose) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของหน่วยกลูโคส (glucose) ที่มีความยาวประมาณ 300 หน่วย แต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ไกลโคซิดิก ($\alpha(1 \rightarrow 4)$ glycosidic bond) และอะมีโลเพกติน (amylopectin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของหน่วยกลูโคสที่เชื่อมกันด้วยพันธะ $\alpha(1 \rightarrow 4)$ ไกลโคซิดิก แต่มีการแตกกิ่งก้านสาขาด้วยพันธะ $\alpha(1 \rightarrow 6)$ ไกลโคซิดิก เมื่อสารแขวนลอย (suspension) ของแป้งที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูงในน้ำหรือในบัฟเฟอร์ถูกความร้อนจะได้สารละลายที่ข้นหนืด ซึ่งถ้าปล่อยให้เย็นจะกลายเป็นเจล

เนื่องจากแป้งเป็นผลผลิตจากธรรมชาติ ส่วนประกอบของแป้งจึงเปลี่ยนแปลงได้ โดยมีสัดส่วนของอะมีโลสและอะมีโลเพกตินที่ต่างกัน ทำให้มีผลต่อความสามารถในการเกิดเป็นเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และความสามารถใสการแยกสาร การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้งมีผลทำให้เจลมีความเหนียวข้นไม่เท่ากันและมีขนาดรูพรุนแตกต่างกัน ซึ่งมีผลทำให้ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิอะคริลาไมด์เจลแล้วแป้งมีข้อเสียคือการคำนวณหาปริมาณโดยใช้เครื่องวัดความทึบแสง (densitometer) จะยุ่งยากและไม่ถูกต้องแน่นอน ถึงแม้ว่าแป้งจะถูกเปลี่ยนให้โปร่งใสได้ โดยแช่ในสารผสมของน้ำ : กลีเซอรอล (glyceral) : กรดอะซีติก (acetic acid)(อัตราส่วน 5:5:1 โดยปริมาตร) ก่อนแล้วแช่ใน กลีเซอรอลค้างคืนก็ตาม ด้วยเหตุนี้จึงนิยมทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจลมากว่าแบบแป้งเจล

อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแป้งเจลเป็นเทคนิคที่เห็นแถบของโปรตีนได้ง่ายโดยการย้อมด้วยสารเคมี และสามารถชะล้างสารที่เห็นแถบของโปรตีนได้ง่าย โดยเฉพาะในการแยกเอนไซม์และชะล้างเอนไซม์ออกมาเพื่อนำไปหาแอคิวิตีของเอนไซม์ ในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาและวิเคราะห์ไอโซเอนไซม์ (isoenyme) ลักษณะการทำเป็นแบบสแล็บเจลในแนวนอน (horizontal slab gel)

2.3.6 อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจลหรือที่เรียกย่อๆว่า PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสม ถึงว่าเทคนิคการแยกแบบ 2 มิติจะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการแยกโปรตีนแต่อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล 1 มิติก็ยังคงเป็นที่นิยมใช้และให้ผลที่ดี

ไอออนที่มีประจุหรือหมู่ที่มีประจุเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ได้ โปรตีนก็เช่นเดียวกัน เป็นแมโครโมเลกุลที่มีประจุที่ พีเอช ต่างๆ เพราะฉะนั้นจึงเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้าและอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุ (charge density) ของโปรตีน ความหนาแน่นของประจุหมายถึงอัตราส่วนของประจุต่อมวล (charge/mass) ถ้าอัตราส่วนนี้สูงโมเลกุลจะเคลื่อนที่ได้เร็ว เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับสารละลายโปรตีนผสม โปรตีนแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกันทำให้แยกออกจากกันได้

PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสที่มีตัวกลางค้ำจุนเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีในระหว่างเกิดกระบวนการแยก ตัวกลางค้ำจุนพวกกระดาษเซลลูโลสอะซีเตตสามารถลดการพา (convection) ได้การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางค้ำจุน 2 อย่างนี้ จะขึ้นกับความหนาแน่นของประจุของโปรตีนที่ค่า พีเอช หนึ่งๆที่เลือกส่วนตัวกลางค้ำจุนพวกเจลสามารถลดการแพร่และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกันการเกิดการพา ทำให้การแยกได้แถบที่คมชัด รวมทั้งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลได้เมื่อปรับขนาดของรูพรุนให้เหมาะสม เพราะฉะนั้น การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นเจลจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาดของสารที่ต้องการแยก ด้วยเหตุนี้โปรตีน 2 ชนิดที่มีขนาดต่างกัน แต่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากันจึงไม่ไม่ถูกแยกออกจากันเมื่อใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แบบกระดาษ ในขณะที่ถ้าใช้เทคนิค PAGE ขนาดรูพรุนของเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดเล็กกว่า ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากันได้

ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลของเจลนี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเจลว่ามีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของอนุภาคที่เคลื่อนที่หรือไม่ ขนาดรูพรุนของอะกาโรสเจลค่อนข้างใหญ่ทำให้ความสามารถในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลของโปรตีนส่วนใหญ่ลดลง การแยกจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุอย่างเดียว ในขณะที่แป้งเจลและพอลิอะคริลาไมด์เจลมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับขนาดของโมเลกุลโปรตีนทำให้การแยกขึ้นกับขนาดและความหนาแน่นประจุ อย่างไรก็ตามผลการแยกโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีวิสแบบแป้งจะขึ้นกับคุณภาพของแป้งเจลด้วย ทั้งนี้เนื่องจากแป้งเจลเตรียมมาจากผลผลิตทางชีวภาพจึงอาจมีสารปนเปื้อนซึ่งมีผลต่อการแยกสารได้ในขณะที่พอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) ของอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ (acrylamide monomer) ซึ่งเตรียมจากสารที่มีความบริสุทธิ์สูง และยังเป็นสารที่เฉื่อยต่อสารเคมี เสถียร (sable) ที่ช่วง พีเอช อุณหภูมิและไอออนิกสเตรนจ์ กว้าง และยังโปร่งใส ข้อดีของพอลิอะคริลาไมด์เจลอีกข้อคือสามารถเตรียมเจลที่มีขนาดรูพรุนได้ขนาดต่างๆกัน ซึ่งต่างจากแป้งเจลที่มีขนาดรูพรุนค่อนข้างจำกัด ด้วยเหตุนี้พอลิอะคริลาไมด์เจลจึงเป็นตัวกลางค้ำจุนที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีน โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซน ถึงแม้ว่าแป้งเจลจะนิยมใช้เป็นตัวกลางค้ำจุนในการวิเคราะห์ไอโซเอนไซม์ และอะกาโรสเจลเป็นตัวกลางค้ำจุนในการแยกโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ โดยเฉพาะพวกกรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein) ก็ตาม

1) พอลิอะคริลาไมด์เจล

โครงสร้างของพอลิอะคริลาไมด์เจล

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 โครงสร้างของอะคริลาไมด์ บิส และพอลิอะคริลาไมด์

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

ส่วนประกอบของพอลิอะคริลาไมด์เจลมีตัวแปรเสริม (parameter) อยู่ 2 ชนิด คือ %T และ %C

ค่า %T หมายถึงความเข้มข้นของมอโนเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างเจล (อะคริลาไมด์และบิส) มีหน่วยเป็นกรัมต่อ100 มิลลิลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

a = น้ำหนักเป็นกรัมของอะคริลาไมด์

b = น้ำหนักเป็นกรัมของบิส

m = ปริมาตรเป็น มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์

ค่า %C หมายถึง น้ำหนักเป็นกรัมของบิสเมื่อเทียบเป็น เปอร์เซ็นต์ กับน้ำหนักเป็นกรัม ของอะคริลาไมด์และบิส

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

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

$$C = 6.5 - 0.3T$$

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

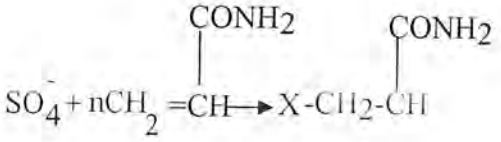
2) กลไกการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระเพอร์ซัลเฟลนี้จะเปลี่ยนอะคริลาไมด์มอโนเมอร์ไปเป็นอนุมูลอิสระดังปฏิกิริยา



แล้วอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิริริยากับมอโนเมอร์ที่ยังไม่ถูกแอกติเวต (unactivated monomer) เพื่อเริ่มปฏิกิริยาการสร้างสายโซ่พอลิอะคริลาไมด์ สายโซ่พอลิเมอร์ที่มีความยาวเพิ่มขึ้นนั้นแต่ละสายโซ่จะถูกเชื่อมโยงซึ่งกันและกันเป็นตาข่ายร่างแหอย่างสุ่ม (random) ด้วยบิส

3) ระบบของตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst System)

ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันของอะคริลาไมด์เริ่มต้นด้วยระบบตัวเร่งปฏิกิริยา-รีดอกซ์ (catalyst-redox system) ดังนี้คือ

1.แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (0.07เปอร์เซ็นต์)—TEMED (0.03เปอร์เซ็นต์)

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

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

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

ระบบแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต-TEMED เป็นวิธีที่ใช้ที่สุดในการเตรียมเจลในช่วงความเข้มข้น (%T) 3-40 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจนในอากาศและที่ละลายอยู่ในสารละลายสามารถยับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้ จึงต้องไล่ ออกซิเจน (degas) ออกจากส่วนผสมเจลก่อนที่จะใช้เตรียมเจล ระบบของไรโบฟลาวิน-TEMED ใช้เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นต่ำในช่วง (%T) 2.5-4 เปอร์เซ็นต์

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

2.3.7 ผลของขนาดรูพรุน (Pore Effects)

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีในปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (Chemicals in Polymerisation Reaction)

2.3.8 อะคริลาไมด์

สารที่ทำให้เกิดเจลขึ้นได้แก่มอโนเมอร์พวกอะคริลาไมด์ และบิส รวมทั้งตัวเริ่มต้น เช่น แอโมเนียมเพอร์ซัลเฟต และ TEMED ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันนี้ไม่ต้องมีแสง ดังนั้น อะคริลาไมด์และบิสจึงควรเก็บไว้ในขวดสีชาไม่ให้ถูกแสง และเก็บที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเช่นนี้มอโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่เป็นของแข็งจะเสถียร แต่ถ้าเป็นสารละลายจะเสถียรน้อยกว่าและไม่ควรเก็บไว้นานเกินกว่า 1-2 เดือน (ที่4องศาเซลเซียส) ทั้งอะคริลาไมด์และบิสมีความเป็นพิษสูงต่อระบบประสาทกลาง (central nervous system) สามารถถูกดูดซึมเข้าทางผิวหนังหรือเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดเอาฝุ่นของสารเหล่านี้เข้าไป เมื่อมอโนเมอร์ทั้ง 2 ชนิดเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันขึ้นเป็นเจล แล้วจะไม่เป็นพิษและสามารถจับต้องได้อย่างปลอดภัย แต่อย่างไรก็ตามควรจะสวมถุงมือเป็นการป้องกันการสัมผัสมากเกินไป

เนื่องจากอะคริลาไมด์เป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดในสารละลายมอโนเมอร์ เพราะฉะนั้นอะคริลาไมด์จึงเป็นแหล่งที่สำคัญของสารปนเปื้อน (contaminant) ที่อาจไปรบกวนปฏิกิริยาได้

อะคริลาไมด์คุณภาพต่ำประกอบด้วยสารปนเปื้อนดังต่อไปนี้คือ

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

2. พอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้น (linear polyacrylamide) ในระหว่างการผลิตและการเก็บอะคริลาไมด์บริสุทธิ์สิ่งปนเปื้อนที่มีคุณสมบัติของการเป็นตัวเร่งสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันด้วยตนเอง (autopolymerisation) ได้ มีผลทำให้เกิดพอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นในมอโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอร์แห้ง พอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นนี้มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเพราะมันทำหน้าที่เป็นนิวเคลียส (nucleus) สำหรับปฏิกิริยาผลที่เกิดขึ้นคือขนาดรูพรุนของเจลไม่สม่ำเสมอและการเคลื่อนที่ของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกผิดปกติไป พอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นไม่ละลายน้ำหรือแอลกอฮอล์ (alcohol) จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการตรวจสอบสารชนิดนี้ และปริมาณของพอลิอะคริลาไมด์เชิงเส้นควรมีน้อยกว่า ออกซาร์ดีมล์(น้ำหนัก/น้ำหนัก)

3. สารปนเปื้อนไอออนิก (ionic contaminant) สารปนเปื้อนไอออนิกทั้งตัวยับยั้งและตัวเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน เช่น โลหะ (metal) พวกคอปเปอร์ (copper) สามารถยับยั้งจลพอลิเมอไรเซชันได้ นอกจากนี้โลหะบางชนิดยังสามารถเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่จับโลหะ (metal binding protein) เช่น แคลโมดูลิน (calmodulin) และสามารถยับยั้งการย่อยสลายของกรดนิวคลีอิกที่ถูกแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิกอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยการทำงานของเรสตริกชันเอนไซม์ (restriction enzyme) การตรวจพบสารปนเปื้อนไอออนิกทำได้ทางอ้อมโดยตรวจผลของมันต่อปฏิกิริยาพอลิมอไรเซชัน (ทั้ง chemical และ photo-chemical polymerisation) และโดยการวัดการนำไฟฟ้าของสารละลายมอโนเมอร์

2.3.9 บิส

ในสารละลายมอโนเมอร์มีบิสในปริมาณที่น้อยกว่าอะคริลาไมด์ อย่างไรก็ตามถ้าบิสไม่บริสุทธิ์จะมีสิ่งปนเปื้อนเหมือนอะคริลาไมด์ซึ่งรวมทั้งผลผลิตของการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันด้วยตนเองและสิ่งปนเปื้อนไอออนิก

เมื่อต้องเตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลเองมีข้อควรระมัดระวังดังต่อไปนี้ คือ

1.สวมถุงมือทุกครั้งที่ต้องเตรียมสารละลายอะคริลาไมด์และบิส

2.ถ้าสารละลายอะคริลาไมด์และบิสถูกผิวหนังให้รีบล้างด้วยสบู่และล้างด้วยน้ำปริมาณมากๆ ทันที

3.ทำในตู้ควัน หลีกเลี่ยงการกวนสารละลายอย่างรุนแรงและพยายามอย่าทำให้ฝุ่นผงของอะคริลาไมด์และ บิสฟุ้งกระจาย

4.เมื่อต้องการทิ้งสารละลายอะคริลาไมด์และบิส ต้องเปลี่ยนสภาพจากสารละลายให้กลายเป็นเจลก่อนโดยเติมตัวเร่งปฏิริริยาอย่างมากเกินพอเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันเป็นเจล แล้วจึงทิ้งเจลไป

5.มีรายงานน้อยมากที่กล่าวถึงความเป็นพิษของสารเคมีชนิดอื่นนอกเหนือจากอะคริลาไมด์และบิสเพราะฉะนั้นจึงควรระมัดระวังเหมือนกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.10 ตัวเริ่มปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันทางเคมีเกิดขึ้นได้เมื่อเติมแอมโอเนียมเพอร์ลัลเฟตและ TEMED ในขณะที่ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันทางชีวภาพจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีไรโบฟลาวิน (หรือไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต) และ TEMED หรือโดยการรวมตัวระหว่างไรโบฟลาวิน TEMED และแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ตัวเริ่มต้นเหล่านี้เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายโดยเฉพาะแอมเนียมเพอร์ซัลเฟต เช่น เดออกซิเดชัน (oxidation) หรือเกิดการสลายตัว (decomposition) ได้ง่ายสารปนเปื้อนของตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาก็คือ ผลผลิตของการสลายตัวมันนั่นเอง

ตัวเริ่มต้นปฏิกิริยาได้แก่

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

2.แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เมื่ออยู่ในสภาพเป็นของแข็งจะเสถียรและเก็บไว้ได้นาน 1 ปี แต่จะเริ่มสลายตัวเกือบทันทีเมื่อละลายน้ำ เพราะฉะนั้นจึงทำให้สูญเสียแอกติวีตีอย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นต้องเตรียมสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตใหม่ทุกครั้งที่เตรียมเจล ปริมาณของแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตที่มากเกินพอสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับโปรตีน และกรดนิวคลีอิก และกรดนิวคลีอิก เมื่อต้องการทิ้งสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตต้องเจือจางด้วยน้ำปริมาณมากๆ

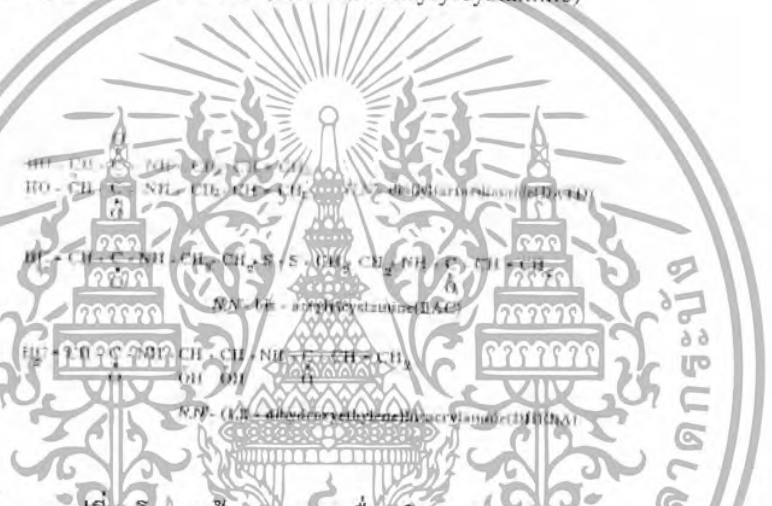
3.ไรโบฟลาวินและไรโบฟลาวิน-5'-ฟอสเฟต ในสภาพเป็นของแข็ง สารทั้ง 2 ชนิด นี้เก็บที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 ปี ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายเสถียรได้นาน 1 เดือน และต้องเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดสีชาเพื่อไม่ให้ถูกแสง เนื่องจากไรโบฟลาวิน- 5'-ฟอสเฟตละลายน้ำได้ดีกว่า จึงนิยมใช้มากกว่าไรโบฟลาวิน ข้อดีของไรโบฟลาวินคือ มันแอกติฟที่ความเข้มข้นต่ำมาก (ประมาณ 5-10 $\mu g / ml$) ด้วยเหตุนี้ถ้าใช้ไรโบฟลาวินร่วมกับ TEMED และแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ปริมาณของตัวเริ่มต้นทั้ง 3 ที่ต้องการต้องน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเชื่อมโยงชนิดอื่น (Altrenative Crosslinker)

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

สารเชื่อมโยงนอกเหนือจากบิสและ PDA แล้วเป็นชนิดที่ใช้สำหรับงานที่มีจุดประสงค์เฉพาะ ได้แก่ DATD (*N,N'*-diallyltartardiamide) DHEBA (*N,N'* (1,2-dihydroyethlene) bisacrylamide) และ BAC (*N,N'*-bis-acrylylcystamine)



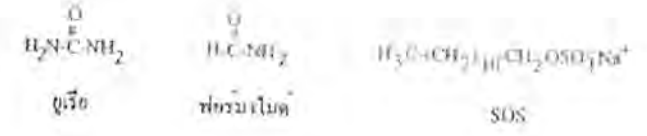
รูปที่ 8 โครงสร้างของสารเชื่อมโยงบางชนิด

2.3.11 สารเติมแต่งในเจล (Gel Additive)

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

สารละลาย SDS ต้องในและไม่มีสี ถ้าใช้น้ำที่อุณหภูมิต่ำเกินไป SDS จะละลายน้ำได้ไม่หมดจึงต้องใช้ความร้อนช่วยให้ SDS ละลายอย่างสมบูรณ์ สารละลาย SDS เสถียรที่อุณหภูมิห้องนานหลายสัปดาห์ แต่ถ้าถูกความเย็นจะตกตะกอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ยูเรีย ฟอร์มาไมด์ SDS

รูปที่ 9 โครงสร้างของสารเติมแต่งในเจล

2.3.12 สารปนเปื้อนในบัฟเฟอร์ (Contaminant in Buffer)

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

2.3.13 ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

อุณหภูมิ

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

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเจลคือที่ 25-30 องศาเซลเซียส สารละลายมอโนเมอร์ แผ่นกระจกหรือหลอดแก้วควรมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเมื่อเทเจล เนื่องจากสารละลายมอโนเมอร์และสารละลายบัฟเฟอร์เก็บได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จึงควรปล่อยให้สารละลายที่เก็บไว้นี้มีอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้องเสียก่อนจึงเตรียมเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจน

การเตรียมเจลโดยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันซึ่งใช้อนุมูลอิสระถูกยับยั้งได้โดยธาตุหรือสารประกอบที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ ออกซิเจนก็เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) ตัวหนึ่ง ออกซิเจนในอากาศและ ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายเจล สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องไล่อากาศออกจากสารละลายเจลก่อนที่จะให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายมอโนเมอร์ที่เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีความสามารถละลายเก็บ ออกซิเจนได้ดีกว่าการไล่อากาศหรือ ออกซิเจนออกจากสารละลายใช้เวลารวดเร็วกว่าและสมบูรณ์มากว่าถ้าสารละลายมีอุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปไล่อากาศ นอกจากนี้ถ้านำสารละลายเจลที่เย็นมาไล่อากาศออกภายใต้สุญญากาศจะทำให้สารละลายยังคงเย็นอยู่ และการไล่อากาศเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำสารละลายที่เย็นมาเตรียมเจลบ จะทำให้มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาและคุณภาพของเจลที่เตรียมขึ้นด้วย ด้วยเหตุดังกล่าว การเตรียมที่มีคุณภาพดีทำให้การแยกสารได้ผลดี จึงจำเป็นต้องทำให้สารละลายเจลมีอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงนำมาไล่อากาศออก การไล่อากาศควรใช้เวลาอย่างน้อย 15 นาที ที่ 23-25 องศาเซลเซียส ภายใต้สุญญากาศ 125 torr ถ้าแช่น้ำหรือกวนสารละลายด้วยจะใช้เวลาน้อยลง ประมาณ 8-10 นาที

พีเอช

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

2.3.14 การเลือกระบบของเจลและบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ตัวอย่างที่แสดงถึงผลของรูพรุนเจลหรือความเข้มข้นของเจลต่อการแยกสารอยู่ใน

รูปที่ 10 ผลของความเข้มข้นของเจล (%T) ต่อการเคลื่อนที่ของสาร

โปรตีน 2 ชนิด คือ A และ B A มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า B แต่ B มีประจุสุทธิที่สูงกว่า ถ้าใช้เจล T = 5เปอร์เซ็นต์ B จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า A และจะแยกออกจากกันได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของเจลเพิ่มขึ้น คือ T มากกว่า 5เปอร์เซ็นต์ แล้ว ผลของตะแกรงร่อน โมเลกุลจะเพิ่มขึ้น ทำให้ B ถูกขัดขวางการเคลื่อนที่ได้มากว่า A จนกระทั่งเมื่อ T มีค่าประมาณ 9เปอร์เซ็นต์ โปรตีนทั้ง 2 ชนิดจะไม่แยกออกจากกัน เมื่อ T มีค่ามากกว่า 9เปอร์เซ็นต์ A และ B จะแยกออกจากกันแต่ครั้งนี้ A มีการเคลื่อนที่ที่เร็วกว่า B

ในกรณี C และ D C มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า D แต่มีประจุสุทธิสูงกว่าจึงทำให้มีการเคลื่อนที่เร็วกว่าในเจลที่มีขนาดรูพรุนใหญ่ และถ้าความเข้มข้นของเจลเพิ่มขึ้นจะทำให้การแยกเกิดได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลมีข้อสังเกตดังนี้คือ

1. เมื่อต้องการแยกสารผสมของโปรตีน ต้องไม่เลือกความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลการแยกสารชนิดใดชนิดหนึ่งออกจากสารที่เหลือทั้งหมด แต่จะต้องเลือกความเข้มข้นของเจลที่ให้ผลการแยกของสารทุกชนิดดี

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

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

โดยทั่วไปพวกโปรตีนด่าง (basic protein) เช่น ฮีสโทน ให้ผลการแยกดีที่สุดที่ พีเอช เป็นกรด เนื่องจากการเคลื่อนที่จะค่าสูงสุด ในขณะที่โปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ในช่วง พีเอช 4-7.5 จึงเป็นโปรตีนกรดอ่อนๆ (weakly acidic protein) ที่ถูกแยกได้ดีที่สุดในเจลที่มี พีเอช เป็นด่าง โปรตีน 2 ชนิดที่มีขนาดเท่ากัน แต่มีค่า pI ต่างกันสามารถแยกออกจากกันได้ที่ค่า พีเอช ส่วนใหญ่

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่นานซึ่งมีผลต่อการเกิดสารสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเพิ่มขึ้น และแถบที่ได้จะไม่คมชัดเนื่องจากเกิดการแพร่ขึ้น

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

คอลัมน์เจลหรือเจลรูปแท่งและสแล้บเจล (Column Gel or Rod Gel and Slab Gel)

การทำ PAGE มีวิธีการทำเจลได้ 3 แบบ คือ

1.สแล้บเจลในแนวนอน (horizontal slap gel)

2. สแล้บเจลในแนวตั้งตรง (vertical slab gel)

3. เจลรูปแท่งในแนวตั้งตรง (vertical rod gel)

ในช่วงเริ่มต้นของการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซนมักนิยมใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลมีลักษณะเป็นแท่งในหลอดแก้ว หรือเจลรูปแท่ง แต่ปัจจุบันนิยมใช้เจลเป็นแผ่นหรือสแล้บเจลซึ่งมีความหนาประมาณ 0.75-1.5 มิลลิเมตร หรือเป็นเจลแผ่นบางมากซึ่งมีความหนาประมาณ 0.1-0.5 มิลลิเมตรทั้งนี้เนื่องจากสารตัวอย่างและสารโปรตีนมาตรฐานจำนวนมากสามารถทำ PAGE ได้ในเจลแผ่นเดียวกัน ภายใต้สภาวะที่เหมือนกันซึ่งทำให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบ แต่เมื่อใช้เจลรูปแท่งสารตัวอย่างแต่ละชนิดจะถูกวิเคราะห์บนแท่งเจลที่แยกกัน ทำให้ยากต่อการเปรียบเทียบที่จะให้ผลถูกต้องแน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการยากที่จะรักษาสภาวะในเจลทุกแท่งให้เหมือนกันตลอดการทดลอง

สแล้บเจลมีข้อดีดังนี้คือ

1.ลดการผิดส่วนบิดเบี้ยวของแถบโปรตีนเนื่องจากผลของความร้อน ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ถ้าเป็นสแล้บเจลความร้อนที่เกิดขึ้นจะถูกกระจายไปได้ง่ายกว่า เจลรูปแท่งที่มีความหนากว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

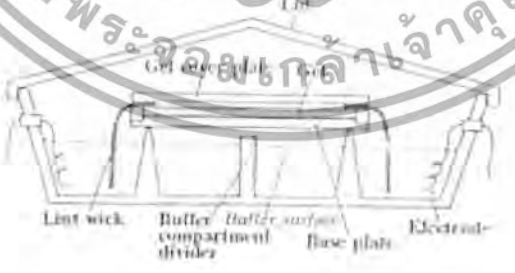
2.มีพื้นที่หน้าตัดที่เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าจึงทำให้ง่ายต่อการวัดความทึบแสงและการถ่ายรูป นอกจากนี้ ยังง่ายต่อการเก็บแห้ง หรือการทำภาพรังสีในตัว (autoradiography)

3.การเตรียมเจลใช้เวลาน้อยกว่า สำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้สารตัวอย่างจำนวนมากภายใต้สภาวะเดียวกัน แผ่นสแล็บเจล 1 แผ่นสามารถแยกสารตัวอย่างได้ถึง 25 สาร

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเจลรูปแท่งจะมีข้อเสียเปรียบกว่าสแล็บเจล แต่ก็ยังคงทำอยู่ เช่น ในงานที่ต้องการตัดเจลหลังจากเจลเพื่อนำไปหาแอกติวีตีทางชีวภาพ (biological activity)

สแล็บเจลในแนวนอน

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



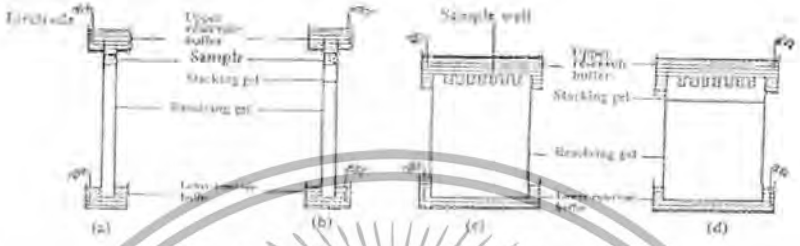
รูปที่ 11 เครื่องมือการทำ PAGE แบบสแล็บเจลในแนวนอน

สแล็บเจลและเจลรูปแท่งในแนวตั้งตรง

การทำ PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งแบบสแล็บเจลและเจลรูปแท่ง สารตัวอย่างจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วอิเล็กโทรดขั้วเดียวเท่านั้น เพราะฉะนั้นจึงต้องเลือก พีเอช ที่ทำให้สารทุกชนิดเคลื่อนที่ไปใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทิศทางเดียวกัน ทั้งสแล้บเจล และเจลรูปแท่ง ในแนวตั้งตรงสามารถใช้ระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน (continuous buffer system) และที่ต่างกัน (discontinuous หรือ multiphasic buffer system) ได้



รูปที่ 12 การทำ PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งแบบสแล้บเจลและเจลรูปแท่งในระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน (a) และ (c) และระบบสารละลายบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน (b) และ (d)

2.3.15 คุณสมบัติของพอลิอะคริลาไมด์เจล

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

2.3.16 การเลือกระบบของบัฟเฟอร์

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

ระบบของบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันหมายถึง ไอออนของบัฟเฟอร์เหมือนกันทั้งในสานตัวอย่าง ในเจล และในอ่างอิเล็กโทรด (electrode reservoir) และมี พีเอช คงที่เท่ากัน ส่วนระบบของบัฟเฟอร์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างกัน หมายถึง ไอออนของบัฟเฟอร์ต่างกันในส่วนของเจลแลในอ่างอิเล็กโทรด และมี พีเอช ไม่เท่ากัน

2.3.17 การเลือกพีเอช

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

2.3.18 การเตรียมสารตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่างต้องให้โปรตีนละลายอย่างสมบูรณ์ และต้องหลีกเลี่ยงการใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าไอออนิกสเตรนจ์ สูงปริมาณของสารตัวอย่างที่หยอดลงบนเจลขึ้นกับจุดประสงค์ของการทำ PAGE และวิธีการย้อมที่ใช้ ตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารตัวอย่างต้องใช้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นของโปรตีนสูงประมาณ 0.1-20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตรของสารตัวอย่างต้องน้อยด้วยเนื่องจากเป็นระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันจึงไม่มีการรวมสารตัวอย่างเป็นแถบแคบๆ เหมือนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน โดยทั่วไปใช้ปริมาตรสารตัวอย่าง 5-25 ไมโครลิตรสำหรับเจลรูปแท่งเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ถ้าใช้ปริมาตรสูงประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ความหนาของสารตัวอย่างจะมีผลต่อความคมชัดของแถบและการแยก ถ้าการทำ PAGE เป็นแบบแนวตั้ง (ทั้งสแล็บเจลและเจลรูปแท่ง) การหยดสารตัวอย่างต้องใช้ไมโครปิเปต (micropipette) หรือ "microsyringe" หยอดสารตัวอย่างผ่านบัฟเฟอร์ในอ่างอิเล็กโทรดบนลงในช่องหรือหลุม (sample well) ที่เจาะไว้ตรงส่วนบนของแผ่นสแล็บเจล หรือลงบนผิวหน้าของเจลรูปแท่ง การหยอดสารตัวอย่างในลักษณะนี้ต้องเติมซูโครส (sucrose) 2-10เปอร์เซ็นต์ หรือกลีเซอรอล (gylceral) 5-10เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเล็กน้อยลงในสารตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความหนาแน่นให้สูงกว่าบัฟเฟอร์ ทำให้สารตัวอย่างไม่ฟุ้งกระจายแพร่ปะปนกับบัฟเฟอร์ในอ่างบนนอกจากนี้ยังต้องเติมสีย้อมเป็น "tracking dry" ปริมาณน้อยประมาณ 0.002เปอร์เซ็นต์ ลงในสารตัวอย่างด้วย สีย้อมที่เหมาะสมสำหรับบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างคือโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) ส่วนสีย้อมชนิดเมธิลลีนกรีน (methylene green) และเมธิลลีนบลู (methylene blue) หรือไพโรนีน Y (pyronine Y) เหมาะสำหรับบัฟเฟอร์ที่เป็นกรด "tracking dry" เป็นตัวแสดงถึงการสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากมันเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่สูงกว่าส่วนประกอบที่เป็นแมโครโมเลกุลในสารตัวอย่าง เพราะฉะนั้นเมื่อสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ถึงบริเวณห่างจากปลายล่างของเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

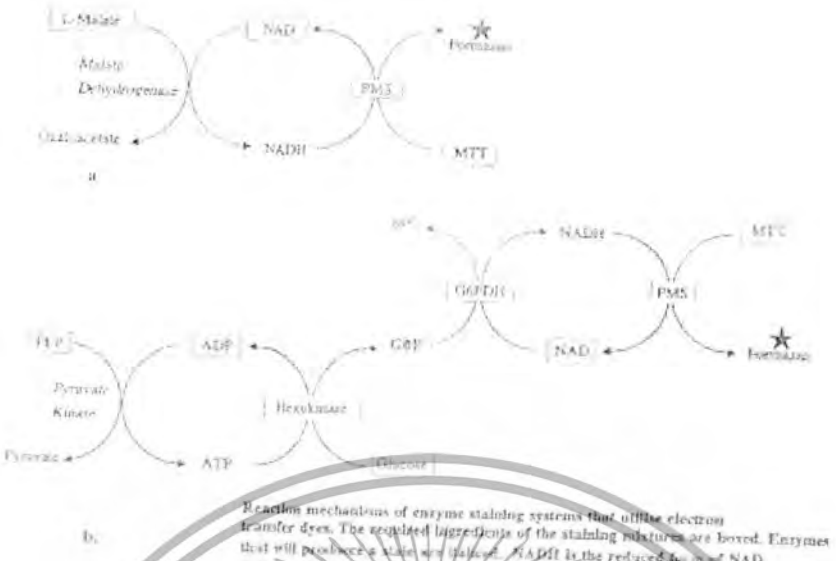
ให้หยุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ ตำแหน่งของสีย้อมหรือ "tracking dry" ใช้เป็นจุดอ้างอิง (reference point) ในการเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสารต่างๆ ในสารตัวอย่าง เมื่อหยอดสารตัวอย่างแล้วให้เริ่มต้นทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทันทีเพื่อหลีกเลี่ยงการแพร่ของสารตัวอย่าง

2.3.19 การย้อมด้วยเอนไซม์ (Enzyme Stain)

การย้อมด้วยเอนไซม์เป็นการตรวจวัดโปรตีนที่จำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง หลังจากที่ทำการแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส เพราะฉะนั้นต้องระวังไม่ให้สูญเสียแอกติวิตีระหว่างการทำอิเล็คโทรโฟรีซีส เช่น ใช้บัฟเฟอร์ที่เสถียรต่อเอนไซม์ หรือใช้อุณหภูมิต่ำ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Reaction mechanisms of enzyme staining systems that utilize electron transfer dyes. The coupled ingredients of the staining mixtures are boxed. Enzymes that will produce a stain are italicized. NADH is the reduced form of NAD.

รูปที่ 13 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้การย้อมด้วยเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

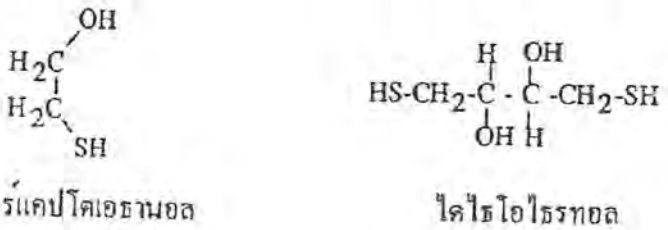
2.4 อิเล็คโทรโฟรีซิสแบบเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

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

SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการศึกษาน้อยเป็น ไมโครกรัม มีประโยชน์ในการศึกษาพวกเอนไซม์ที่ประกอบด้วยหน่วยหลายหน่วย โปรตีนที่ถูกแยกโดย SDS-PAGE สามารถนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่นๆต่อไปได้ โดยการชะแต่ละแถบที่แยกออกจากกันจากเจลแล้วกำจัด SDS หรือสารเคมีอื่นๆ จากนั้นจึงนำไปศึกษา เช่น วิเคราะห์กรดอะมิโน แผนที่เพปไทด์ (peptide map) หาปลาย N- หรือหาปลาย C- เป็นต้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2-เมอร์แคปโตเอธานอล ไดไธโอไธรทอล

รูปที่ 14 แสดงสารไธออล

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

2.4.1 คุณสมบัติของเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจล

1) การเลือกความเข้มข้นของเจล

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

2) การเลือกระบบบัฟเฟอร์

ระบบบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนระบบทริส-โซเดียมอะซีเตต ได้ถูกดัดแปรโดยการลดความเข้มข้นของ SDS ในบัฟเฟอร์เป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ผลการแยกดีขึ้น ระบบอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ (imidazole buffer system) มีการนำไฟฟ้าที่ต่ำกว่าระบบฟอสเฟตมาก จึงใช้เมื่อต้องการแยกสารโดยเร็วหรือเมื่อใช้ฟอสเฟสไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การเตรียมสารตัวอย่าง

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

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

ถ้าทำ SDS-PAGE ในแนวตั้งตรงทั้งเจลรูปแท่งและสแล็บเจลต้องใส่ซูโครสเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของสารตัวอย่าง และใช้โบรโมฟีนอลบลูเป็น “tracking dye”

2.4.2 การใช้เจลที่มีเกรเดียนต์ของความเข้มข้น

สมัยก่อนนิยมใช้เทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลมีความเข้มข้นคงที่ (thomogeneous gel) ในการหามวลโมเลกุลของพอลิเพปไทด์ แต่ปัจจุบันได้มีการปรับปรุงเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจลที่มีเกรเดียนต์ของความเข้มข้น (concentration gradient gel) เพื่อให้ได้ผลที่ดีกว่า เจลแบบนี้เรียกว่าเกรเดียนต์เจล

อิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้นหรืออิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเกรเดียนต์เจลมีข้อดีกว่าอิเล็กโทรโฟรีซิสที่เจลมีความเข้มข้นคงที่สม่ำเสมอคือให้แถบที่คมชัด (เนื่องจากขีดจำกัดของขนาดรูพรุนรวมทั้งการเพิ่มความหนืดของเจลจะขัดขวางการแพร่) ให้ผลการแยกที่ดี ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง่าย และการเปลี่ยนขนาดรูพรุนของเจลทำให้เกิดผลของตะแกรงร่อนโมเลกุล เพราะฉะนั้นจึงสามารถแยกโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่างกันในช่วงกว้างได้บนเจลแผ่นเดียวกัน

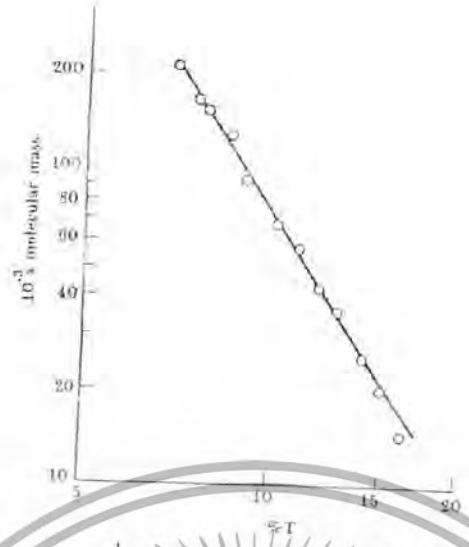
ในเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเกรเดียนต์เจล โปรตีนมีการเคลื่อนที่ในเจลในทิศทางที่เจลมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นหรือมีขนาดรูพรุนเล็กลง โปรตีนขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้าลง และจะหยุดเมื่อถึงบริเวณที่เจลมีความเข้มข้นที่ทำให้ขนาดรูพรุนเล็กเกินกว่าที่จะเคลื่อนที่ต่อไปได้ เกิดผลของตะแกรงร่อนโมเลกุลทำให้แถบของโปรตีนที่แยกออกจากกันคมชัด

2.4.3 คุณสมบัติของเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลแบบเกรเดียนต์เจล

1) การเลือกความเข้มข้นของเจล

การทำ SDS-PAGE แบบเกรเดียนต์เจลมีวิธีการทำเกรเดียนต์ของความเข้มข้นเป็น 2 แบบ คือ แบบ "linear" และแบบ "exponential" หรือแบบ "concave" การเลือกช่วงเกรเดียนต์ของความเข้มข้นจะขึ้นอยู่กับขนาดหรือมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยก ในกรณีที่เป็นแบบ "non-linear" ความสัมพันธ์เช่นนี้ก็เป็นเส้นตรง และการคำนวณ %T ก็ใช้การคำนวณเหมือนเกรเดียนต์แบบ "linear" ตัวอย่างเช่น พอลิเพปไทด์ที่มีการเคลื่อนที่เป็นครึ่งทางของเจลที่มีเกรเดียนต์ในช่วง %T = 5-20 จะเคลื่อนที่ไปถึง %T = 12.5 เพราะฉะนั้นการเขียนกราฟระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลกับ $\log_{10}$ %T จะได้กราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหามวลโมเลกุลของโปรตีนในสารตัวอย่าง ช่วงของมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ทำให้มีความสัมพันธ์กับกราฟมาตรฐานจะขึ้นกับช่วงเกรเดียนต์ของความเข้มข้นเจล ตัวอย่างเช่น ช่วงเกรเดียนต์ %T = 7-25 (%C = 1) เหมาะสำหรับมวลโมเลกุลช่วง 14300-330000 %T = 5-20 (%C = 2.6) เหมาะสำหรับมวลโมเลกุลช่วง 14300-210000 และ %T = 3-30 (%C = 8.4) เหมาะสำหรับมวลโมเลกุลช่วง 13000-950000 ถ้าพอลิเพปไทด์มีมวลโมเลกุลน้อยถึงประมาณ 1500 ต้องใช้ช่วงเกรเดียนต์ %T = 10-18 แต่ต้องมี 7 โมลาร์ ยูเรีย อยู่ในบัฟเฟอร์ ในทางปฏิบัติ ไม่สามารถเตรียมเจลที่มี %T ต่ำกว่า 3 หรือสูงกว่า 30 ได้เนื่องจากมีปัญหาในการจับต้องเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานเมื่อเขียนระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลและ $\log_{10}$ %T
สำหรับเกรเดียนสแล็บเจลช่วง 5-20 %T

2) การเตรียมเจล

การเตรียมเจลเกรเดียนต์เจลแบบ "linear" เตรียมได้โดยผสมสารละลาย "dense" และ "light" ที่มีปริมาณเท่ากันในภาชนะผสมเกรเดียนต์ (gradient mixer) ปัจจุบันใช้สแล็บเจลที่มีความบางมาก (ultrathin) มีความหนา 0.1-0.5 มิลลิเมตร เจลที่มีความบางเบามากนี้มีข้อดีคือ

1. ระบบทำความเย็นให้กับเจลจะมีประสิทธิภาพสูงความร้อนที่เกิดขึ้นในขณะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะถูกกำจัดออกไปอย่างสม่ำเสมอ
2. สามารถใช้ความเข้มของสนามไฟฟ้า (field strength) ได้สูงกว่า
3. การแยกใช้เวลาสั้นลงและให้ผลการแยกที่ดี
4. การย้อมเจลและการชะสีย้อมออกจากพื้นหลังใช้เวลาสั้นกว่า
5. ประหยัดสารเคมีในทุกขั้นตอน

3) ระบบบัฟเฟอร์

ใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างมี ไอออนิกสเตรนจ์ ต่ำ และมีพีเอชสูง จะทำให้ส่วนประกอบทั้งหมดหรือส่วนใหญ่มีประจุลบจึงเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก (anode) สำหรับงานส่วนใหญ่ใช้ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์พีเอช 8.8 เฉพาะโปรตีนที่เป็นโปรตีนด่างเท่านั้นที่ต้องใช้บัฟเฟอร์เป็นกรด

4) การเตรียมสารตัวอย่าง

ถ้าเป็นเจลที่มีความหนา 0.5 มิลลิเมตร สารตัวอย่างต้องมีความเข้มข้นประมาณ 4 มิลลิกรัม / แถบในปริมาตร 5 มิลลิลิตร จึงจะใช้การย้อมสีด้วยโคแมสซีบลู (Coomassic Blue) แต่ถ้าสารตัวอย่างเจือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จางกว่านี้ต้องใช้การย้อมด้วยซิลเวอร์ ถ้าเป็นเจลหนา 1.0 มิลลิเมตร การหยอดสารตัวอย่างบนเจลต้องเพิ่มเป็น 2 เท่า เพิ่มปริมาตรเป็น 2 เท่า เมื่อเติม SDS และ 2 – เมอร์แคปโตเอธานอล หรือ DTT ลงในสารตัวอย่างแล้วต้มที่ 95^{o} -100องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 3 นาที เพื่อให้โปรตีนในสารตัวอย่างสูญเสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์และไม่ถูกย่อยสลายโดยโปรตีเอส

2.4.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัส (Discontinuous Electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซนที่มีระบบบัฟเฟอร์ต่างกันทั้งส่วนประกอบของบัฟเฟอร์และ พีเอช สารตัวอย่าง เจลและบัฟเฟอร์ในอ่างอิเล็กโทรด ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโซนที่มีลักษณะเช่นนี้เรียกว่าอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัส หรือเรียกย่อๆว่า "disc electrophoresis"

เจลที่ใช้สำหรับระบบนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้คือ

1. ส่วนบนสุด เรียกว่าแซมเปิลเจล (sample gel) อาจมีหรือไม่มีก็ได้
2. ส่วนกลาง เรียกว่า สแตคกิงเจล (stacking gel) หรือ สเปเซอร์เจล (spacer gel) ถ้าไม่มีแซมเปิลเจล สแตคกิงเจลจะอยู่บนสุด แซมเปิลเจลและสแตคกิงเจลเตรียมจากเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ จึงมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่ ทำให้สารเคลื่อนที่ได้เร็ว สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเจลทั้ง 2 ส่วนนี้เป็นทริส /HCl มี ค่าไอออนิกสเตรนจ์ ต่ำ และ พีเอช ต่ำที่ประมาณ 6.7 จึงทำให้มีความต้านทานไฟฟ้าสูง เพราะฉะนั้นสนามไฟฟ้าในเจล 2 ส่วนนี้จึงสูง มีผลทำให้สารเคลื่อนที่ได้เร็ว
3. ส่วนล่างสุด เรียกว่า เซเปเรติงเจล (separating gel หรือ resolving gel) เจลส่วนนี้มีขนาดรูพรุนที่เล็กกว่าเจล 2 ส่วนบน เพราะเตรียมจากเจลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเซเปเรติงเจลเป็นทริส/HCl มี ค่าไอออนิกสเตรนจ์ สูงกว่าและมี พีเอช สูงกว่าคือ 8.9 เจลส่วนนี้จะถูกเตรียมก่อนเมื่อเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันอย่างสมบูรณ์แล้วจึงเตรียมส่วนสแตคกิงเจลและแซมเปิลเจลตามลำดับ

ข้อได้เปรียบที่สำคัญของเทคนิคนี้คือสามารถใช้สารตัวอย่างที่เจือจางในปริมาตรมากได้และได้ผลการแยกดี ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนจะถูกทำให้เข้มข้นเป็นแถบแคบมากในระหว่างการเคลื่อนที่ผ่านส่วนสแตคกิงเจล แล้วจึงเกิดการแยกในระหว่างการเคลื่อนที่ในส่วนเซเปเรติงเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. กลไกการแยกสารด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัส

สารละลายบัฟเฟอร์ที่อยู่ในอ่างอิเล็กโทรดเป็นทริส-ไกลซีน มี พีเอช 8.3 ซึ่งค่า พีเอช นี้อาจเท่ากับ พีเอช ของสารละลายบัฟเฟอร์ของเจลส่วนเซเปเรติงเจลก็ได้ ไกลซีนเป็นกรดอ่อนมีค่า pK = 9.6 เพราะฉะนั้นที่ พีเอช 6.7 ในสารตัวอย่างและในสแตคกิงเจล ไกลซีนแตกตัวได้น้อยมากทำให้เคลื่อนที่ช้าจึงเรียกไกลซีนว่าไอออนตาม (trailing ion) ในขณะที่ Cl ไอออนมีการเคลื่อนที่สูงเป็นไอออนนำ (leading ion) ส่วนโปรตีนมีการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง Cl ไอออนและไกลซีน เมื่อเริ่มต้นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ไอออนนำอยู่ในเจลในขณะที่ไอออนตามอยู่ในอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ต่อมาเมื่อให้สนามไฟฟ้าไอออนทั้ง 2 ชนิดจะเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก (anode) โดยที่ Cl ไอออนเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโปรตีนและไกลซีน Cl ไอออนจะเคลื่อนที่ห่างจากไกลซีนโดยมีแถบที่มีการนำไฟฟ้าที่ต่ำกว่าอยู่ข้างหลัง เนื่องจากค่าการนำไฟฟ้าจำเพาะเป็นสัดส่วนกลับกันความเข้มข้นของสนามไฟฟ้า เพราะฉะนั้นแถบนี้จึงมีเกรเดียนต์ของความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สูงกว่า ซึ่งจะเร่งให้ไกลซีนเคลื่อนที่ไล่ตาม Cl ไอออน การเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีประจุสบและไกลจะถูกเร่งจนกระทั่งไอออนที่มีประจุเหล่านี้ มีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่เท่ากัน ทำให้โปรตีนถูกทำให้เข้มข้นเป็นแถบที่แคบมากเรียกว่า “protein stack” มีความหนาเพียง 2-3 ค่าไอออนิกสเตรนจ์เท่านั้น เนื่องจากส่วนสแตคกิงเจลมีขนาดรูพรุนใหญ่ จึงไม่มีการแยกโดยอาศัยขนาดรูพรุนหรือผลของตะแกรงร่อนโมเลกุล

เมื่อแถบของโปรตีนเคลื่อนที่เข้าสู่ส่วนของเซเปเรติงเจลจะพบความแตกต่างของความเข้มข้นของเจลระบบบัฟเฟอร์และ พีเอช ในส่วนนี้มีค่าสูงกว่ามาก คือเท่ากับ 8.9 มีผลทำให้ไกลซีนแตกตัวเพิ่มขึ้นหลายเท่าเพราะฉะนั้นจึงเคลื่อนที่ได้เร็วทำให้ไล่ทันโปรตีน และเริ่มที่จะเคลื่อนที่ตามหลัง Cl ไอออนอย่างใกล้ชิด ในขณะเดียวกับขนาดรูพรุนก็จะเล็กลงอย่างเด่นชัด ทำให้ลดการเคลื่อนที่ของโปรตีนโดยผลของตะแกรงร่อนโมเลกุลของเจล ผลต่างๆเหล่านี้ทำให้โปรตีนไม่ถูกบีบเป็นแถบแคบๆ แต่ละเคลื่อนที่ในบริเวณที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าที่สม่ำเสมอและมีค่า พีเอช คงที่ และจะถูกแยกเป็นแถบๆ ตามความแตกต่างของขนาดและประจุสุทธิ

2. คุณสมบัติของอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัส

1) การเตรียมเจล

เจล 2 ชั้นที่เตรียมมีระบบบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน การเตรียมเจลต้องเตรียมส่วนเซเปเรติงเจลก่อนแล้วจึงเตรียมส่วนสแตคกิงเจลอยู่ส่วนบน สแตคกิงเจลต้องมีความสูงไม่น้อยกว่า 2 เท่าของความสูงและปริมาตรของสารตัวอย่างหรือมีความสูงประมาณ 5-10เปอร์เซ็นต์ ของความสูงของเซเปเรติงเจล โดยทั่วไปมีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตรเพียงพอสำหรับปริมาตรของสารตัวอย่าง ส่วนใหญ่ใช้ความสูง 2 เซนติเมตร ความเข้มข้นของสแตคกิงเจลคือ 3.125 กรัม/ 100มิลลิเมตร (%T = 3.125) อัตราส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของอะคริลาไมด์ต่อบิส เท่ากับ 4:1 ความเข้มข้นของเซเปเรติงเจล %T = 7.5 อัตราส่วนของอะคริลาไมด์ต่อบิส เท่ากับ 30:1

เมื่อเตรียมเจลเสร็จเรียบร้อยแล้วควรใช้ทันที เพราะจะเกิดการแพร่ได้ในระหว่างการเก็บ เนื่องจากบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเตรียมเจล 2 ส่วนต่างกัน และต่างจากอ่างอิเล็กโทรด อีกวิธีหนึ่งที่เก็บเจลไว้ คือ เตรียมเซเปเรติงเจลให้เสร็จเรียบร้อยแล้วเคลือบผิวหน้าด้วยบัฟเฟอร์สำหรับเซเปเรติงเจล แล้วจึงเก็บเจลไว้ เมื่อต้องการใช้เจลจึงเทบัฟเฟอร์ที่เคลือบเจลออกให้หมด แล้วเตรียมส่วนสแตคกิงเจลก่อนที่จะอิเล็กโทรโฟรีซิส

2) การเตรียมสารตัวอย่าง

สารโปรตีนผสมที่สนใจต้องมีซูโครสประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้กลีเซอรอล 10-20 เปอร์เซ็นต์ โดยมี "tracking dye" 0.003เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเล็กน้อย (อาจใช้โบรโมฟีนอลบลูหรือโบรโมฟีนอลเรดก็ได้) โปรตีนผสมต้องถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์โดยต้มที่ 95 – 100 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และต้องมี SDS และสารไธออลในปริมาณมากเกินพอ ถ้าสารตัวอย่างมีค่าไอออนิกสเตรนจ์ สูงจำเป็นต้องกำจัดออกโดยวิธีไดแอลิซิส (dialysis) หรือเจลฟิลเทรชัน (gel filtration)

3) การเลือก พีเอช ของระบบบัฟเฟอร์

เมื่อใช้เทคนิค SDS-PAGE SDS-พอลิเพปไทด์คอมเพลกซ์ที่เกิดขึ้นมีประจุสุทธิที่ พีเอช ช่วงกว้าง ทำให้ พีเอช ของระบบฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เป็นระบบที่เหมือนกัน (homogeneous หรือ continuous phosphate buffer system) ไม่มีปัญหา แต่ถ้าเป็น พีเอช ของระบบบัฟเฟอร์แบบดิสคอนทินูอัสต้องระมัดระวังเพราะ พีเอช มีความสำคัญต่อการทำให้สารเข้มข้นในบริเวณของสแตคกิงเจล ทริส-ไกลซีนบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้

4) การเลือกตัวเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

โดยทั่วไปนิยมใช้ระบบแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต-TEMED เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันทั้งส่วนเซเปเรติงเจลและสแตคกิงเจล สำหรับส่วนสแตคกิงเจลสามารถใช้ได้ทั้งแอมโมเนียมซัลเฟตและไรโบฟลาวิน

ถ้าต้องการแยก "native protein" ที่มีความไวต่อเพอร์ซัลเฟตไอออนซึ่งใช้ในการเตรียมเจลในระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน จำเป็นต้องกำจัดเพอร์ซัลเฟตไอออนที่มากเกินพอออกในช่วง "pre-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

electrophoresis" ก่อนที่จะหยอดสารตัวอย่าง ซึ่งถ้าเป็นระบบบัฟเฟอร์ที่ต่างกันของ "disc gel" จะทำเช่นนี้ไม่ได้ เพราะฉะนั้นจึงต้องเตรียมเจลอย่างน้อยส่วนของสแตคกิงเจลด้วยไรโบฟลาวิน

3. การทำกราฟมาตรฐาน

เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่ว่าจะเป็น PAGE SDS-PAGE หรืออิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล เสร็จเรียบร้อยแล้ว ต้องวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ "tracking dye" จากบริเวณเริ่มต้น (origin) ก่อนการย้อมสีด้วยวิธีต่างๆ หลังจากย้อมสีแล้วจึงวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานโดยใช้จุดกึ่งกลางของแต่ละแถบที่ปรากฏให้เห็น การวัดอาจใช้ไม้บรรทัดวัดบนเจลที่ย้อมสีแล้ว หรือรูปถ่ายของเจลหรือใช้เครื่องวัดการทึบแสง นำระยะทางการเคลื่อนที่มาคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative migration) หรือค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์เป็นค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนเมื่อเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของ "tracking dye"

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

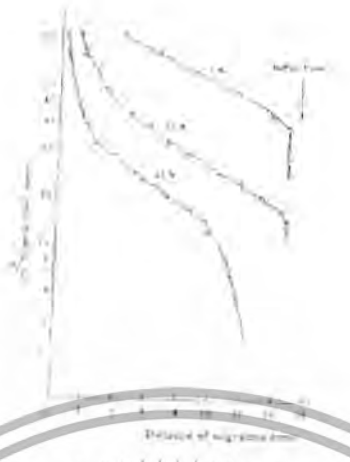
นำค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐานและค่า $\log_{10}$ มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานมาเขียนกราฟมาตรฐาน จากกราฟนี้สามารถหาตำแหน่งที่ตรงกับค่า R_f ของโปรตีนที่ไม่ทราบค่ามวลโมเลกุล ทำให้ทราบถึงมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนที่สนใจบนแผ่นเจลเดียวกัน เพื่อให้สภาวะเหมือนกันทุกอย่าง

กราฟมาตรฐานนี้จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงในช่วงมวลโมเลกุลที่จำกัดที่ความเข้มข้นของเจลค่าหนึ่ง เช่น เมื่อใช้ระบบ SDS- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ กราฟมาตรฐานจะเป็นเส้นตรงในช่วงดังนี้คือ

ที่ %T = 15 กราฟเป็นเส้นตรงในช่วง 12,000-45,000
ที่ %T = 10 กราฟเป็นเส้นตรงในช่วง 15,000-70,000
ที่ %T = 5 กราฟเป็นเส้นตรงในช่วง 25,000-200,000

ถ้าสารตัวอย่างเป็นโปรตีนที่เจือจางต้องใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบดิสคอนทินูอัสเจล เพื่อให้ได้การแยกที่ดีความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานจะเป็นเส้นตรงที่ %T = 15 สำหรับที่ %T = 10 และ 5 พอลิเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 16,000 และ 60,000 ตามลำดับ จะเคลื่อนที่ไปตาม "tracking dye"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานที่เขียนระหว่าง $\log_{10}$ มวลโมเลกุลกับระยะทางการเคลื่อนที่เมื่อทำ SDS-PAGE โดยใช้สแล็บเจลที่ %T ต่างกัน

4. คุณสมบัติที่ผิดปกติของพอลิเพปไทด์

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

ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) จำนวนมากมีคุณสมบัติที่ผิดปกติถึงแม้ว่าจะเติม SDS และสารไธออลในปริมาณที่มากเกินพอ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะมันจับกับ SDS เฉพาะตรงส่วนที่เป็นโปรตีนเท่านั้น ทำให้มีผลต่อประจุสุทธิของโปรตีน เพราะฉะนั้นเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วนำผลมาคำนวณหามวลโมเลกุลจะได้ค่าที่สูงเกินความเป็นจริง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การย้อมเจล

2.5.1 วิธีการย้อมสีเจล (Gel Staining Method)

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

2.5.2 การตรึง (Fixing)

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

การตรึงมีหน้าที่ดังนี้คือ

1. ตรึงสารที่ถึงแยกออกจากกันเช่นโปรตีนในเจลเพื่อขัดขวางการแพร่หรือการสูญเสียสารออกจากเจลไปในระหว่างการย้อมและการล้างสีย้อม
2. กำจัดสารเคมีที่อาจรบกวนวิธีการย้อมได้แก่ สารซักฟอก สารรีดิวซิง หรือส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ เช่น ไกลซีน

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

ตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสีย้อมเป็นสารที่สามารถทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติได้อย่างอ่อน เพราะฉะนั้นจึงเท่ากับเป็นการตรึงโปรตีนในขณะย้อมสีเจล แต่ปัญหาจะเกิดขึ้นเมื่อโปรตีนที่แยกออกจากกันเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ทำให้ตรึงโปรตีนไม่เพียงพอ เพราะฉะนั้นจึงต้องมีขั้นตอนการตรึงเพิ่มขึ้นอีก 1 ขั้นตอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 การย้อมโดยใช้โคแมสซีบลู

การย้อมสำหรับการตรวจวิเคราะห์การแยกโปรตีนโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลที่นิยมมากที่สุด คือ การย้อมด้วยโคแมสซีบลู หรือ "Coomassie Brilliant Blue R 250" (R มาจากคำว่า reddish hue และ 250 เป็นตัวเลขแสดงความเข้มของสี) สีย้อมโคแมสซีบลูสามารถเก็บและใช้ได้หลายครั้ง และสามารถตรวจพบแถบของโปรตีนที่มีความเข้มข้นจำกัดประมาณ 1 ไมโครกรัม/แถบได้ ถ้าโปรตีนมีความเข้มข้นสูงการจับระหว่างสีย้อมและโปรตีนจะเริ่มไม่เป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการหาปริมาณของโปรตีนในเจล การย้อมด้วยวิธีนี้จะได้แถบที่สม่ำเสมอ เสถียรและเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่องวัดความทึบแสง

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

2.5.4 กลไกการย้อมด้วยโคแมสซีบลู

การย้อมด้วยโคแมสซีบลูต้องการตัวกลางที่เป็นกรดเพื่อให้เกิดแรงทางไฟฟ้า (electrostatic force) ระหว่างโมเลกุลของสีย้อมกับหมู่อะมิโน (NH_3^+) ของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีแรง van der Waal (van der Waal's force) ที่ทำให้เกิดคอมเพลกซ์ระหว่างสีย้อมและโปรตีน ทั้งพันธะนอน-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 การย้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

รูปที่ 17 สีย้อมโคแมสซีบลูที่ใช้ตรวจสอบการแยกโปรตีนโดยเทคนิค PAGE

2.6 การเตรียมสแล็บเจลในแนวตั้งตรง

เจลถูกเตรียมขึ้นระหว่างแว่นกระจกหรือแผ่นพลาสติก 2 แผ่นที่สะอาด โดยแช่ในกรดโครมิกค้างคืน ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วตามด้วยเอธานอล วางแผ่นกระจกบนกระดาษที่สะอาดโดยให้ด้านที่สัมผัสเจลหงายขึ้นแล้วเช็ดด้วยอะซีโตน (acetone) หลังจากนั้นล้างด้วยเอธานอลแล้วปล่อยให้แห้ง แผ่นกระจกอาจมีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าหรือสี่เหลี่ยมจัตุรัสแต่ต้องมีขนาดเท่ากัน แผ่นกระจกแผ่นหนึ่งที่ขอบด้านบนถูกเจาะให้เป็นช่องลึก 20 มิลลิเมตร ประกบแผ่นกระจกทั้ง 2 เข้าด้วยกันโดยมี "spacer" รูปตัว U คั่นระหว่างแผ่นกระจก "spacer" เป็นตัวกำหนดความหนาของเจล เพราะฉะนั้น "spacer"จึงมีความหนาหลายขนาดขึ้นกับความต้องการว่าจะใช้เจลที่มีความหนาหรือเจลที่มีความบางมาก ยึดแผ่นกระจกด้วยที่หนีบกระดาษ แล้ววางให้ตั้งตรง ใช้ปิเปตดูดสารละลายอะคริลาไมด์แล้วปล่อยลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกทั้ง 2 หวีพลาสติกมีหลายขนาดขึ้นกับจำนวนสารตัวอย่างและปริมาณสารตัวอย่างที่จะหยอด หลังจากเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันอย่างสมบูรณ์ ประมาณ 30-60 นาที (ในกรณีของ "disc gel" ต้องเตรียมเจลส่วนเซเปเรติงเจลก่อน แล้วจึงเตรียมสแตคกิงเจล ในส่วนสแตคกิงเจลต้องเสียบหวีลงไปเพื่อให้เกิดช่องหรือหลุมสำหรับหยอดสารตัวอย่างในเจลส่วนนี้) ให้เอาหวีออก จะเกิดเป็นลักษณะเป็นช่องหรือหลุมสำหรับหยอดสารตัวอย่าง ถ้าใช้เจลทันทีให้ล้างหลุมหรือช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหล่านี้ด้วยบัฟเฟอร์สำหรับอ่างอิเล็กโทรดโดยใช้ “syrige” หรือพลาสเจอร์ปิเปต แต่ถ้ายังไม่ใช้เจล ให้เก็บเจลโดยล้างหลุมด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้เตรียมเจล แล้วเติมทุกหลุมด้วยบัฟเฟอร์ให้เต็มเก็บไว้ในตู้เย็นจนกระทั่งใช้ เอาที่หนีบกระดาษออกแล้วจึงเอา “spacer” ออกจากแผ่นกระจกทั้ง 2 นำแผ่นกระจกที่มีเจลอยู่มาใส่ในอ่างอิเล็กโทรด โดยหันหน้าด้านแผ่นกระจกที่มีช่องหรือหลุมสำหรับหยอดสารตัวอย่างเข้าด้านในตรงอ่างอิเล็กโทรดบน ยึดแผ่นกระจกเข้ากับอ่างอิเล็กโทรดด้วยที่หนีบกระดาษ ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ในอ่างอิเล็กโทรดทั้งบนและล่าง สารละลายบัฟเฟอร์ในอ่างบนต้องท่วมส่วนบนของเจล และในอ่างล่างปลายสุดของเจลต้องสัมผัสกับสารละลายบัฟเฟอร์ สารละลายตัวอย่างต้องเติมซูโครส หรือกลีเซอรอลเพื่อเพิ่มความหนาแน่นให้กับสารตัวอย่าง เวลาหยอดลงในหลุมหรือช่องจะได้ไม่ฟุ้งกระจายในสารละลายบัฟเฟอร์ รวมทั้งต้องมี “tracking dye” ด้วย ใช้ “syrige” ดูดสารตัวอย่างแล้วค่อยๆ ปล่อยลงในช่องหรือหลุมอย่างช้าๆ

รูปที่ 18 การเตรียมสแล้บเจลในแนวตั้งตรง

เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสร็จเรียบร้อยแล้ว นำเอาแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกทั้ง 2 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ “tracking dye” แล้วจึงนำแผ่นเจลมาตรึงและย้อมสี เมื่อได้แถบของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่แยกออกจากกันแล้วถ่ายรูปเก็บไว้แล้วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละแถบเพื่อนำไปคำนวณหาค่า R_f

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

2.7 เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ปฏิกิริยาในการเปลี่ยน glucose ไปเป็น pyruvate นั้นเกิดขึ้นเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและเกิดขึ้นในทุกเซลล์ แต่ pyruvate ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงไปได้มากมาย ปฏิกิริยาที่สำคัญ คือ การเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น ethanol ซึ่งเกิดขึ้นในยีสต์และจุลินทรีย์หลายชนิด การเปลี่ยนแปลงขั้นตอนแรก คือ การเกิด decarboxylation ของ pyruvate ได้เป็น acetaldehyde ซึ่งปฏิกิริยานี้เร่งด้วยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase โดยมี thiamine pyrophosphate เป็น co-enzyme ขั้นที่ 2 จะเกิดปฏิกิริยา reduction ของ acetaldehyde ไปเป็น ethanol โดยใช้ NADH ซึ่งปฏิกิริยานี้เร่งด้วยเอนไซม์ Alcohol Dehydrogenase (ADH) ดังนี้

$$\text{Acetaldehyde} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Ethanal} + \text{NAD}^+$$

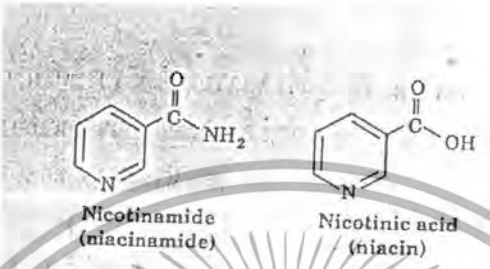
เอนไซม์ (ADH) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ของแอลกอฮอล์ และเร่งปฏิกิริยา reduction ของ aldehyde (acetaldehyde) เอนไซม์นี้พบในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดและพบมากในตับและไต โมเลกุลของเอนไซม์มี Zinc เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์นี้ถูกกระตุ้นโดย glutathione และ EDTA และถูกยับยั้งด้วยโลหะหนัก ADH ที่สกัดได้จากตับของม้ามีมวลโมเลกุล 80,000 ขณะที่ ADH ที่ได้จากยีสต์มีมวลโมเลกุล 141,000

ADH ใช้มากในการวิเคราะห์ ethanol ในของเหลวทางชีวภาพ ซึ่งจะนำไปใช้ในปฏิกิริยาคู่ควบในการวิเคราะห์ของเหลวทางชีวภาพ โดย optimum pH ของ ADH คือ 8.6 – 9.0 แต่สามารถขยายได้ถึง pH 12.6 และ isoelectric point ของ ADH คือ 5.4 เอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นด้วย sulfhydryl reagent เช่น mercaptoethanol และ dithiotreitol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 นิโคตินาไมด์ (nicotinammide) หรือไนอาซินาไมด์ (niacinamide)

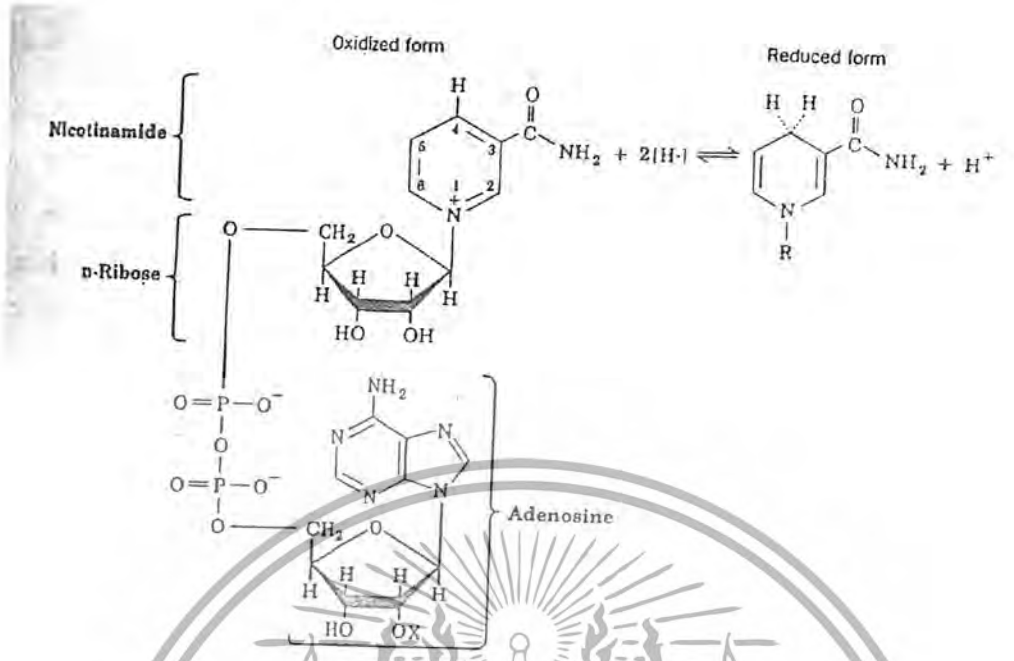
รูปกรดคาร์บอกซิลิก คือ กรดนิโคตินิก (nicotinic acid) หรือไนอาซิน (niacin) เป็นอนุพันธ์ของไพริดีน(pyridine) พบทั่วไปในพืชและเนื้อเยื่อของสัตว์ เนื่องจากพืชและสัตว์ส่วนใหญ่สามารถสังเคราะห์นิโคตินาไมด์ จากกรดอะมิโนทริปโตเฟน



รูปที่ 19 โครงสร้างของกรดนิโคตินิก (ไนอาซิน) และนิโคตินาไมด์

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NAD^+) และ
นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ($NADP^+$)

นิโคตินาไมด์ นิวคลีโอไทด์ ทั้ง 2 ชนิดทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ พวกดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชัน ตัวอย่างเช่น

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

ปฏิกิริยานี้เกี่ยวข้องกับการกำจัดไฮโดรเจนอะตอม 2 อะตอม ออกจากสับเสตรท คือ เอธานอล ซึ่งจะถูกออกซิไดส์ไปเป็นอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) 2 อิเล็กตรอน และ 2 โปรตอน (H^+) จะถูกกำจัดออกจากสับเสตรทในรูปของไฮไดรด์ไอออน (H^-) และโปรตอน (H^+) กลไกการเกิดรูปรีดิวซ์ของ NAD^+ ($NADP^+$) อธิบายได้โดย H^- จากสับสเตรท จะเข้าทำปฏิกิริยากับตำแหน่งที่ 4 ของส่วนที่เป็นนิโคตินาไมด์ของนิวคลีโอไทด์รูปออกซิไดส์ ส่วน H^+ ที่ถูกกำจัดจากสับสเตรทจะไม่เข้าไปเกี่ยวข้องกับโมเลกุลของ NAD^+ ($NADP^+$) ทั้งนิโคตินาไมด์นิวคลีโอไทด์รูปออกซิไดส์และรีดิวซ์ มีคุณสมบัติในการดูดแสงต่างกัน โดยที่รูปรีดิวซ์สามารถดูดแสงได้ในช่วงคลื่น 340 นาโนเมตร (nm) แต่รูปออกซิไดส์ไม่ดูดแสงที่ช่วงคลื่นนี้ เพราะฉะนั้นเราสามารถที่จะติดตามการเกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือออกซิเดชันของโคเอนไซม์ตัวนี้ได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร ในขณะที่เกิดปฏิกิริยา เช่น ปฏิกิริยารีดักชันของ NAD^+ เมื่อมีเอธานอลและเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ชนิดของเห็ด

เห็ดที่ใช้ในการทดลองมี 6 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 3 วงศ์ (Family) ดังนี้

1) Family Auriculariaceae

- *Auriecularia auricular* ชื่อสามัญ เห็ดหูหนู

2) Family Ganodermataceae

- *Ganoderma lucidum* ชื่อสามัญ เห็ดหลินจือ

3) Family Pleurotaceae

- *Pleurotus citrinopileatus* ชื่อสามัญ เห็ดนางรมทอง
- *Pleurotus flabellatus* ชื่อสามัญ เห็ดนางนวล
- *Pleurotus ostreatus* ชื่อสามัญ เห็ดนางรมฮังการี
- *Pleurotus sajor-caju* ชื่อสามัญ เห็ดนางฟ้า

3.1.2 แหล่งที่มาของเชื้อเห็ด

หัวเชื้อเห็ดสั่งซื้อมาจากบ้านสวนเห็ดอรัญญิกและกรมวิชาการเกษตร ในรูปของเส้นใย (Mycelium) บนอาหารวุ้นหรือเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่าง

3.2 วัสดุ-อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)
- ตู้แช่เยือกแข็ง (Ultra-Low Temperature Freezer)
- เครื่องฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนชื้น (Auto clave)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (Tissue Growth Chambers)
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker)
- เครื่องดูดอากาศ (GE motors)
- เครื่องเขย่าหลอด (Minishaker)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบแนวตั้ง (Electrophoresis Chamber)
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)
- คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร (Cuvette)
- จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ฟลาสก์ (flask)
- คอร์ก บอยเลอร์ (cork boiler)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่จากขวดหัวเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อลงบนจานอาหาร PDA (ภาคผนวก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้เส้นใยเจริญเติบโตฟูเต็มจานเพาะเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มจานนำไปเก็บที่ 20 องศาเซลเซียสเพื่อให้เส้นใยเจริญช้าลง สามารถเก็บไว้เป็นหัวเชื้อสำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนอื่นๆ (รูปที่ 21-26)

3.3.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ด

นำเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.1 มาเจาะบริเวณปลายโคโลนีโดยใช้คอร์กบอยเลอร์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแทงชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ด้วยคอร์ก บอยเลอร์ จำนวน 6 ชิ้นใส่ลงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว PDB ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 (ภาคผนวก) ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ให้ชิ้นวุ้นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลว อุดด้วยจุกสำลี นำไปเพาะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 8, 11, 14, 17 และ 21 วัน (รูปที่ 27 และ 28)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ดจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยง

เก็บเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.2 ที่อายุ 5, 8, 11, 14, 17 และ 21 วัน มาเท อาหารเหลวออกแล้ว ล้างเส้นใยในฟลาส 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Saline Solution) ที่แช่เย็น 10 องศาเซลเซียส เทน้ำเกลือทิ้งแล้วใช้ forcet คีบแผ่นเส้นใยเห็ดวางลงบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ นำไปวางบนกรวยกรองลดความดัน ฉีดล้างเส้นใยเห็ดด้วยน้ำเกลือในกระบอกฉีด พร้อมทั้งเปิดเครื่องดูดอากาศ ใช้ forcet คีบแผ่นเส้นใยเห็ดที่สะเด็ดน้ำวางบนโกร่งที่เย็น บดด้วยสากโดยเติมไนโตรเจนเหลวระหว่างบดเพื่อป้องกันเอนไซม์เสียสภาพจากความร้อน ใช้ช้อนตักเศษเซลล์ที่ได้จากการบดเก็บลงใน eppendorf เติม Extraction Buffer 100ไมโครลิตร แช่ eppendorf ลงในน้ำแข็งก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที ใน ไมโครปิเปตดูดส่วนใสที่แยกออกจากเศษเซลล์ใส่ลงใน eppendrof ใหม่ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –80 ในตู้แช่เยือกแข็ง (รูปที่ 29 และ 30)

3.3.4 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีการทางเคมี

ใช้คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตรจำนวน 2 อันใส่ Control Solution 950 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) ลงในคิวเวตอันหนึ่งและ Sample Solution 950 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) ลงในคิวเวตอีกอันหนึ่ง เติมสารสกัดเซลล์เห็ดจากข้อ 3.3.3 ลงไปคิวเวตละ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำคิวเวตที่เติม Control Solution ใส่ลงในเครื่องสเปกโตรโฟรโตมิเตอร์ที่ตำแหน่ง blank และใส่คิวเวตที่เติม Sample Solution ลงที่ตำแหน่ง sample วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของเห็ดแต่ละชนิดที่อายุต่างๆ (รูปที่ 31 และ 32) นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ นำค่าที่คำนวณได้ไปวาดกราฟหาอายุเห็ดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด (รูปที่ 33)

3.3.5 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล ประกอบชุดแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นโดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75 – 1 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใส่โดยใส่ Stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร เหนือ Separating gel เตรียมสารละลาย Separating gel โดยเติมสารละลาย Acrylamide-bis 2.5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 4.85 มิลลิลิตร และ Separating gel buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ เติม 10% Ammonium persulfate 70 ไมโครลิตรและ TEMED 5 ไมโครลิตร วนบีกเกอร์เบาๆให้สารละลายผสมกัน เท Separating gel ระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ให้ห่างจากขอบบน 2 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทับผิวหน้าเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งเทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทิ้ง เตรียมสารละลาย Stacking gel โดยเติมสาร Acrylamide-bis 2.6 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 12.2 มิลลิลิตร และ Stacking gel buffer 5 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ เติม 10% Ammonium persulfate 100 ไมโครลิตร และ TEMED 12.5 ไมโครลิตร วนบีกเกอร์ให้สารละลายผสมกัน เทสารละลาย Stacking gel เททับบน Separating gel พร้อมกับใส่หวีลงใน Stacking gel ทิ้งไว้จนแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง ประกอบเข้ากับชุดอิเล็คโทรโฟรีซีส ใส่ Electrode buffer 300 มิลลิลิตร

นำสารสกัดเซลล์เห็ด 10 ไมโครลิตร ต่อการทำอิเล็คโทรโฟรรีซีส 1 ตัวอย่างโดยผสมสารสกัดเซลล์เห็ดกับ Sample buffer 5 ไมโครลิตรก่อนใส่ในช่องบนเจล หยอดตัวอย่างลงบนเจลแต่ละช่องๆ ละ 1 ตัวอย่าง จำนวน 15 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจายผ่านกระแสไฟฟ้า 70 มิลลิแอมแปร โดยควบคุมความต่างศักย์ที่ 110 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 1 ชั่งโมง รอจนตัวอย่างเคลื่อนที่มาจนห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้าแล้วนำตัวอย่างออกจากอิเล็คโทรโฟรรีซีส เติมสีย้อมเอนไซม์ (ภาคผนวก)ให้ท่วมเจลตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อเกิดแถบสีน้ำเงินแล้วเทสีย้อมทิ้งแล้วเติมสารละลาย Destrain ให้ท่วมเจลเพื่อล้างสีที่ส่วนเกินออกตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วเท Destrain ออก ทำซ้ำอีก 2 ครั้งโดยครั้งสุดท้ายไม่ต้องเท Destrain ออก ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงเท Destrain ทิ้งแล้วเติม 10% Glycerol แช่ไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำกระดาษแก้วแช่ใน 10% Glycerol 10 นาที นำเจลมาห่อด้วยกระดาษแก้ว รีดเอาฟองอากาศออกให้หมด ขึงไว้กับกระจกให้ตึงโดยใช้คริปหนีบขอบไว้ ทิ้งไว้จนเจลแห้ง (รูปที่ 34 และ 35)

3.3.6 การวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีล ซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล ประกอบชุดแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นโดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75 – 1 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใส่โดยใส่ Stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร เหนือ Separating gel เตรียมสารละลาย Separating gel โดยเติมสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acrylamide-bis 2.5 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำกลั่น 4.85 มิลลิลิตร และ Separating gel buffer 2.5 มิลลิลิตร เติม 10% (W/V) SDS 100 ไมโครลิตร ลงในบีกเกอร์ เติม 10% Ammonium persulfate 70 ไมโครลิตรและ TEMED 5 ไมโครลิตร วนบีกเกอร์เบาๆให้สารละลายผสมกัน เท Separating gel ระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ให้ห่างจากขอบบน 2 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทับผิวหน้าเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งเทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทิ้ง เตรียมสารละลาย Stacking gel โดยเติมสาร Acrylamide-bis 2.6 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 12.2 มิลลิลิตร และ Stacking gel buffer 5 มิลลิลิตร เติม 10% (W/V) SDS 100 ไมโครลิตร ลงในบีกเกอร์ เติม 10% Ammonium persulfate 100 ไมโครลิตร และ TEMED 12.5 ไมโครลิตร วนบีกเกอร์ให้สารละลายผสมกัน เทสารละลาย Stacking gel เททับบน Separating gel พร้อมกับใส่หวีลงใน Stacking gel ทิ้งไว้จนแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปประกอบกับชุดอิเล็คโทรโฟรีซีส ใส่ Electrode buffer 300 มิลลิลิตรที่มี10%(W/V) SDS

นำสารสกัดเซลล์เห็ด 10 ไมโครลิตร ต่อการทำอิเล็คโทรโฟรรีซีส 1 ตัวอย่าง ผสมสารสกัดเซลล์เห็ดกับ Sample buffer 5 ไมโครลิตรที่มี10%(W/V) SDS ก่อนใส่ในช่องบนเจล นำไปหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (ภาคผนวก) ให้มีปริมาณโปรตีนในช่วง 50-100 ไมโครกรัมต่อช่อง ถ้ามีปริมาณโปรตีนมากเกินไปให้เพิ่มปริมาณ Sample buffer ต่อปริมาณสารสกัดเซลล์เห็ด นำไปต้มที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาที หยอดตัวอย่างลงบนเจลแต่ละช่องๆ ละ 1 ตัวอย่าง จำนวน 15 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ฟุ้งกระจาย หยอด LMW Marker Kit เป็น Maker ที่ช่องแรกและช่องสุดท้าย ผ่านกระแสไฟฟ้า 70 มิลลิแอมแปร โดยควบคุมความต่างศักย์ที่ 110 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 1 ชั่งโมง รอจนตัวอย่างเคลื่อนที่มาจนห่างจากขอบล่าง 1 เซนติเมตร จึงหยุดกระแสไฟฟ้าแล้วนำตัวอย่างออกจากอิเล็คโทรโฟรรีซีส วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye เติมสีย้อมโปรตีน (ภาคผนวก) ให้ท่วมเจลตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อเกิดแถบสีน้ำเงินแล้ว เทสีย้อมทิ้งแล้วเติมสารละลาย Destrain ให้ท่วมเจลเพื่อล้างสีที่ส่วนเกินออกตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วเท Destrain ออก ทำซ้ำอีก 2 ครั้งโดยครั้งสุดท้ายไม่ต้องเท Destrain ออก ทิ้งไว้ข้ามคืนจึงเท Destrain ทิ้งแล้วเติม 10% Glycerol แช่ไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำกระดาษแก้วแช่ใน 10% Glycerol 10 นาที นำเจลมาห่อด้วยกระดาษแก้ว รีดเอาฟองอากาศออกให้หมด ขึงไว้กับกระจกให้ตึงโดยใช้คริปหนีบขอบไว้ ทิ้งไว้จนเจลแห้ง (รูปที่ 36)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักไวน์

นำเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.1 มาเจาะบริเวณปลายโคโลนีโดยใช้คอร์ก บอยเลอร์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแทงชิ้นวุ้นที่เจาะไว้ด้วยคอร์ก บอยเลอร์ จำนวน 6 ชิ้นใส่ลงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว PDB ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลี นำไปให้อากาศโดยการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (รูปที่ 37 และ 38)

3.3.8 การทดสอบการหมักโดยใช้สารสกัดมอลล์

นำเส้นใยที่เพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.2 มาทำอาหารเหลวออกภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (รูปที่ 39) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม และเติมสารสกัดมอลล์ร้อยละ 10 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เป็นชุดทดสอบการหมัก (รูปที่ 40) บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน นำออกมาทดสอบการปนเปื้อนเชื้อยีสต์ด้วยอาหาร GYA (ภาคผนวก) และวัดปริมาณแอลกอฮอล์โดยเครื่อง Ebulliometer (ภาคผนวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

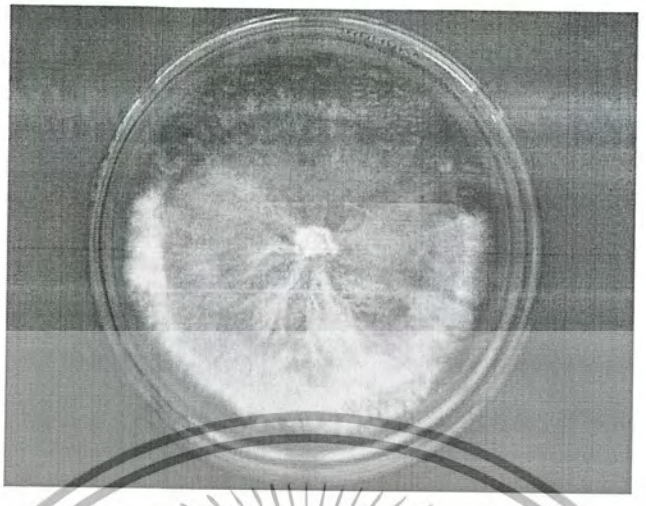
บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารวุ้น

เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเห็ดทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองสามารถเจริญได้เต็มจานเพาะเชื้อ โดยใช้อาหารวุ้น PDA และเห็ดนางนวลมีการสร้างสารสีแดงปล่อยออกมาในอาหารวุ้น

รูปที่ 21 แสดงเส้นใยเห็ดหูหนูบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน

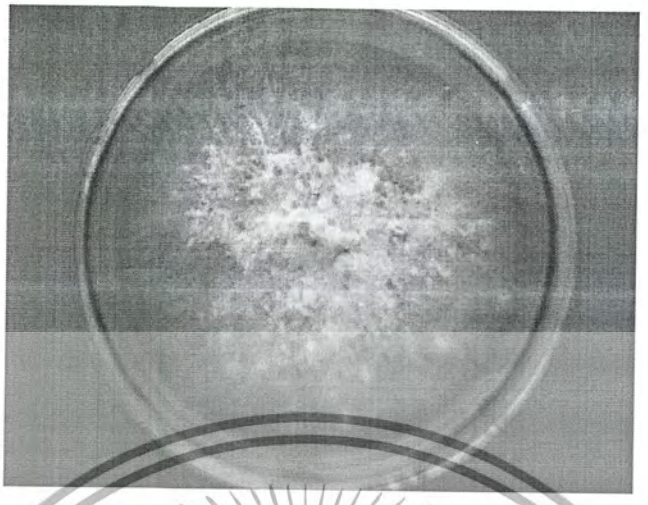
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 แสดงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน

รูปที่ 23 แสดงเส้นใยเห็ดนางรมทองบนอาหารวุ้น อายุ 35 วัน

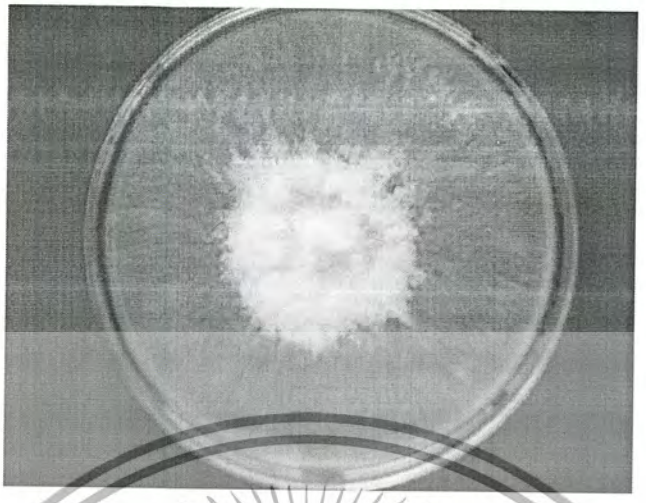
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 24 แสดงเส้นใยเห็ดนางนวลบนอาหารวุ้น อายุ 32 วัน

รูปที่ 25 แสดงเส้นใยเห็ดนางรมฮังการีบนอาหารวุ้นอายุ 25 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

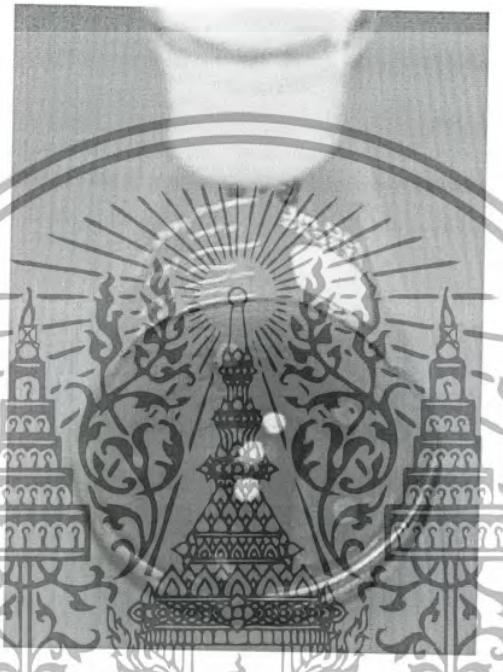


รูปที่ 26 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าบนอาหารวุ้น อายุ 25 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

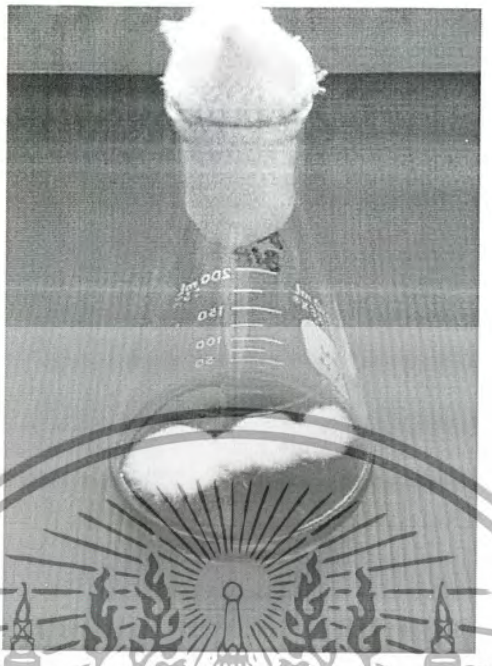
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ด

เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหารเหลวพบว่าเห็ดทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองสามารถเจริญเติบโตได้ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารเหลว PDB ผสม Malt Extract ร้อยละ 2



รูปที่ 27 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว อายุ 0 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 28 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือบนอาหารเหลว อายุ 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการเตรียมสารสกัดเซลล์เห็ดจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยง

เมื่อนำเส้นใยเห็ดที่เพาะเลี้ยงมาเตรียมสารสกัดเซลล์พบว่าสารสกัดเซลล์ของเห็ดแต่ละชนิดมีสีแตกต่างกันตามสีของเส้นใยเห็ดชนิดนั้นตามรูปที่ 30 เรียงจากซ้ายไปขวาคือ เห็ดนางรมฮังการี, เห็ดหลินจือ, เห็ดโคนน้อย, เห็ดหูหนู, เห็ดนางนวล, เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางรมทอง

รูปที่ 29 แสดงการเลี้ยงเส้นใยเห็ดชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

รูปที่ 30 แสดงสารสกัดเซลล์เห็ดสำหรับวิเคราะห์หาเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีการทางเคมี

เมื่อนำสารสกัดเซลล์เห็ดที่ได้มาวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมี พบว่าเห็ดชนิดต่างๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ตามตารางที่ 1 ยกเว้นเห็ดหูหนูที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์

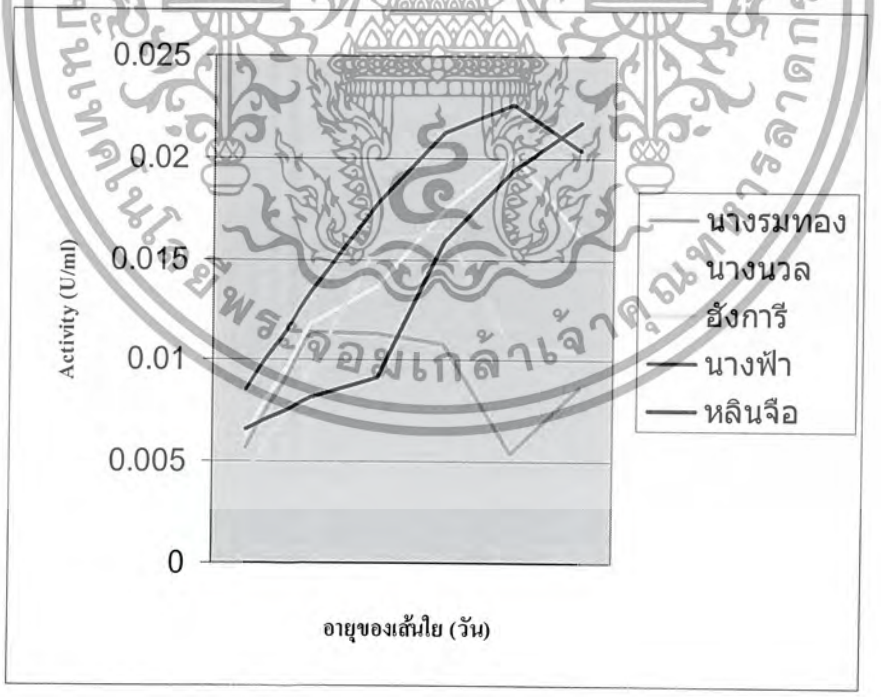
รูปที่ 31 แสดงกราฟของการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรของเห็ดนางฟ้า อายุ 14 วัน

รูปที่ 32 แสดงกราฟของการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตรของเห็ดหูหนู อายุ 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด/อายุ	5 วัน	8 วัน	11 วัน	14 วัน	17 วัน	21 วัน
หูหนู	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
นางรมทอง	0.0057	0.0114	0.0113	0.0108	0.0054	0.0087
นางนวล	0.0063	0.0118	0.0137	0.0174	0.0202	0.0161
ฮังการี	0.0043	0.0095	0.0158	0.0164	0.0107	0.0104
นางฟ้า	0.0086	0.0134	0.0178	0.0213	0.0226	0.0204
หลินจือ	0.0066	0.0082	0.0092	0.0158	0.0194	0.0218

ตารางที่ 1 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเห็ดชนิดต่างๆ ในหน่วยยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/ml)



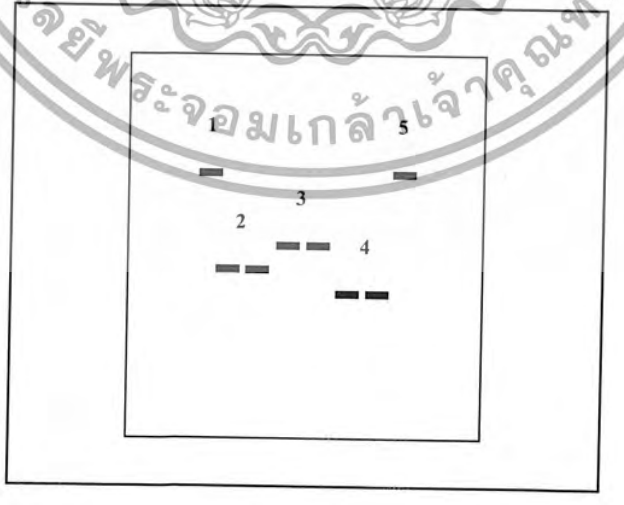
รูปที่ 33 แสดงกราฟค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเห็ดชนิดต่างๆ ที่อายุ 5, 8, 11, 14, 17 และ 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

เมื่อนำสารสกัดเซลล์เห็ดชนิดต่างๆ ที่อายุ 21 วันมาวิเคราะห์หาเอนไซม์โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซีส ที่ 110 โวลต์ 70 มิลลิแอมแปร แล้วนำเจลที่ได้แช่ในสีย้อมเอนไซม์ พบว่าเห็ดทุกชนิดมีแถบสีน้ำเงินของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ยกเว้นเห็ดหูหนูไม่ปรากฏแถบสี

รูปที่ 34 แสดงแถบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีเอนไซม์



รูปที่ 35 แสดงไดอาแกรมจากการทำเจลอีเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีเอนไซม์
1) เห็ดนางฟ้า 2) เห็ดนางรมฮังการี 3) เห็ดหลินจือ 4) เห็ดนางรมทอง 5) เห็ดนางนวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการวิเคราะห์หาเอนไซม์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซีสแบบโซเดียมโดดิซีลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

เมื่อนำสารสกัดเซลล์เห็ดมาหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสโดยใช้สารสกัดเซลล์เห็ดที่อายุ 21 วันมาทำอิเล็คโตรโฟรีซีส ที่ 110 โวลต์ 70 มิลลิแอมแปร โดยใช้ LMW marker kit เป็น marker แล้วนำเจลที่ได้แช่ในสีย้อมโปรตีน พบว่าเห็ดทุกชนิดมีแถบสีน้ำเงินของโปรตีนชนิดต่างๆ นอกเหนือไปจากเอนไซม์ที่ต้องการ จึงไม่สามารถหามวลโมเลกุลได้

รูปที่ 36 แสดงแถบสีที่เกิดขึ้นจากการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสและย้อมสีโปรตีน
1) Marker 2) เห็ดนางฟ้า 3) เห็ดนางนวล 4) เห็ดหลินจือ 5) เห็ดนางรมทอง 6) เห็ดนางนวล

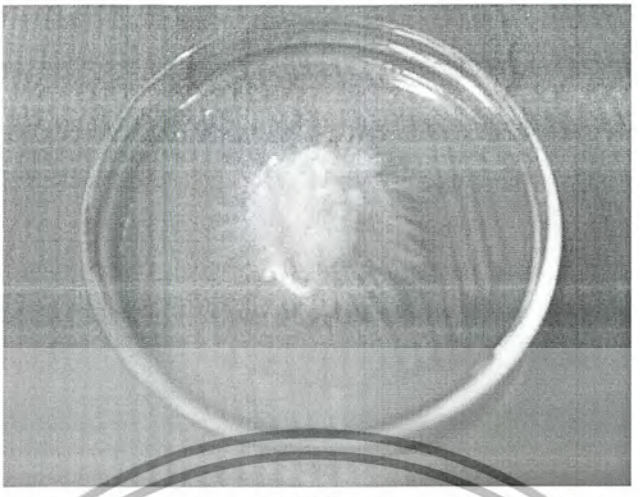
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักไวน์

เมื่อนำเห็ดนางฟ้าที่ผ่านการหาเอนไซม์ด้วยวิธีทางเคมีและอิเล็คโทรโฟรีซีส แล้วพบว่ามีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อทดสอบการหมักพบว่า เห็ดนางฟ้าสามารถโตได้ในอาหารเหลว PDB ที่ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 มีลักษณะเส้นใยสานตัวกันเป็นเม็ด และมีเส้นใยแตกออกในแนวรัศมีโดยรอบเม็ด และอาหารเลี้ยงเชื้อมีกลิ่นหอมของเห็ดนางฟ้า

รูปที่ 37 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เลี้ยงโดยการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสอายุ 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 38 แสดงเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เลี้ยงโดยการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสอายุ 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบการหมักโดยใช้สารสกัดมอลล์

เมื่อนำเส้นใยเห็ดนางฟ้าที่เลี้ยงในอาหารเหลวข้างต้นมาเทอาหารเลี้ยงเชื้อออก เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นหนึ่งชุด และอีกชุดหนึ่งเติมสารละลาย Malt Extract ร้อยละ 10 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 วัน นำสารละลายออกมาวัดปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย Ebulliometer พบว่ามีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 2 ในสารละลายละลาย Malt Extract ร้อยละ 10 ที่บ่มด้วยเห็ดนางฟ้า ส่วนน้ำกลั่นที่บ่มด้วยเห็ดนางฟ้าวัดปริมาณแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 0 และวัดปริมาณแอลกอฮอล์ในสารละลาย Malt Extract ร้อยละ 10 แต่ไม่ใส่เห็ดบ่มที่สภาวะเดียวกันได้ปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 0

รูปที่ 39 แสดงการหมักชุดควบคุมโดยใช้เห็ดนางฟ้า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 40 แสดงการหมักสารสกัดมอลล์โดยใช้เห็ดนางฟ้า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาเห็ดที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส โดยการวิเคราะห์ทางเคมีและการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซีส พบว่าเห็ดที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสอยู่คือ เห็ดนางฟ้า, เห็ดนางรมทอง, เห็ดหลินจือ, เห็ดนางนวล, และ เห็ดนางรมฮังการี ส่วนเห็ดหูหนูไม่ปรากฏว่ามีเอนไซม์ดังกล่าว

จากการศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในเห็ดแต่ละชนิดที่อายุต่างๆ พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสสูงสุดในเห็ดนางรมทอง, เห็ดนางนวล, เห็ดนางรมฮังการี, เห็ดนางฟ้าและเห็ดหลินจือ ในวันที่ 8, 14, 14, 17 และ 21 ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทำให้สามารถคัดเลือกชนิดเห็ดที่จะนำมาใช้ในการหมักไวน์และเลือกใช้อายุของเส้นใยที่จะนำมาใช้ในการหมักไวน์ให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด

จากการศึกษาการทดลองหมักโดยการคัดเลือกเห็ดมา 1 ชนิดเพื่อทดสอบคือเห็ดนางฟ้า ซึ่งทราบแล้วว่ามีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส หมักด้วยสารละลาย Malt Extract เข้มข้นร้อยละ 10 สามารถวัดปริมาณแอลกอฮอล์ได้เข้มข้นประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในขั้นตอนการหาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซีส เอนไซม์อาจสูญเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นขั้นตอนการสกัด หรือการผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่อุปกรณ์การทำเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส เราสามารถจะแก้ไขได้โดยไม่ใช้ความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าที่มีค่าสูงเกินไป, เลือกใช้บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม หรือทำอิเล็คโทรโฟรีซีสในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และทำการเก็บรักษาสารสกัดเซลล์เห็ดเป็นอย่างดีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์อาจสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ ระหว่างที่นำออกมาทำการทดลอง ซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองผิดพลาดไม่ปรากฏแถบสีเกิดขึ้น ทั้งๆ ที่อาจมีเอนไซม์อยู่

ในการวัดมวลโมเลกุลหาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ด้วยวิธีโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโทรโฟรีซีส จะต้องทำการแยกเอนไซม์ออกจากโปรตีนอื่นๆ ในเซลล์ก่อนทำอิเล็คโทรโฟรีซีส โดยผ่านเจล (gel filtration) แล้วจึงสามารถนำเอนไซม์ไปหามวลโมเลกุลได้ เพราะหากไม่แยกโปรตีนชนิดอื่นออกก่อนเมื่อเราทำโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสจะไม่สามารถทราบได้ว่าแถบสีที่เกิดขึ้นอันใดคือเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จึงไม่สามารถหาขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์ได้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543. การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการผสมพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. ปฏิบัติการเอนไซม์. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. 2546. ไวน์ศาสตร์และศิลป์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

พัชรา วีระกะลัส. 2541. เอนไซม์. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิณทิพย์ ชื่นวงษา. 2538. การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2530. เห็ดเมืองไทย. กรุงเทพ: ไทยวัฒนาพานิช.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2538. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส. คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

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

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

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

Mini-Protean II Electrophoresis Cell. Instruction Manual. Bio Rad. Laemmli, U.K. "Nature", 1970.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

Tokumitsu Okamura, Tomoko Okata, Norie Minamimoto, Tomomi Takeno, Hiroko Noda, Shoko Fukuda, and Masahiro Ohsuki, 2001. Characteristics of Wine Produced by Mushroom Fermentation, Biosci, Biotechnol, Biochem., 65(7):1596-1600.

Tokumitsu Okamura, Tomomi Takeno, Mizuho Dohi, Izumi Yasumasa, Tokiko Hayashu, Mashiho Toyoda, Hiroko Noda, Shoko Fukuda, Noboru Horie ,and Masahiro Ohsugi. 2000. Development of Mushroom for Thrombosis Prevention by Protoplast Fusion, Biosci, Bioengineering, Vol.89.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

สูตรอาหาร

สูตรอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar) สำหรับ 1 ลิตร

PDB	24	กรัม
Agar	15	กรัม
หรือ		
PDA	40	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH 5.6 นำไปฆ่าเชื้อ

สูตรอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth) ผสม Malt Extract ร้อยละ 2 สำหรับ 1 ลิตร

PDB	24	กรัม
Malt Extract	20	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH 5.6 นำไปฆ่าเชื้อ

สูตรอาหารแข็ง GYA (Glucose Yeast Agar) สำหรับ 1 ลิตร

Glucose	5	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
Agar	15	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH 4 นำไปฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารเคมีสำหรับวัดกิจกรรมของเอนไซม์

สารละลาย Control Solution

-Control Solution สำหรับ 1 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

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

-Stock Control Solution สำหรับ 50 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

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

การเตรียมสารละลาย Stock Control Solution

เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 47 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์เล็ก ชั่ง Tris-Base 1.51425 กรัม ใส่ลงไปในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ชั่ง NAD 0.013268 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ปรับ pH 8.8 ด้วยกรด HCl เข้มข้น เก็บใส่ขวดสีชาและแช่ตู้เย็น

สารละลาย Sample Solution

-Sample Solution สำหรับ 1 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

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

-Stock Sample Solution สำหรับ 50 คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย Stock Sample Solution

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

การเตรียมสารเคมีสำหรับทำอิเล็คโทรโฟรีซีส

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

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

ละลายและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด (เก็บได้นานที่สุด 30 วัน)

2. Separating Gel Buffer (1.5M Tris-HCl, pH 8.8)

Tris Base	18.15	กรัม
น้ำกลั่น	60	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย 6N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. Stacking Gel Buffer (0.5M Tris-HCl, pH 6.8)

Tris Base	6	กรัม
น้ำกลั่น	60	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย 6 N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย 10 % SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นและเก็บอุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. Sample Buffer

น้ำกลั่น	1.9	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
Glycerol	0.4	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	0.2	มิลลิลิตร
1% (W/V) Bromophenol blue	0.2	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน

6. 5x Electrode Buffer (running buffer), pH 8.3

Tris-Base	9	กรัม
Glycine	43.2	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 600 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส (ถ้าตกตะกอนให้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้) ก่อนใช้ให้เจือจาง 5 เท่า

7. สารละลาย Destraining

25% Ethanol + 10% Acetic acid และ 65% น้ำกลั่น

8. สารละลาย 10% Glycerol

9. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีเอนไซม์

Tris–A Buffer	20	มิลลิลิตร
0.5M $MgCl_2$	0.1	มิลลิลิตร
Ethanol	1.5	มิลลิลิตร
1% NAD^+	1	มิลลิลิตร
1% NBT (Nitroblue Tetrazolium)	0.5	มิลลิลิตร
1% MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium)	0.15	มิลลิลิตร
1% PMS (Phenazine Methosulfate)	0.25	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน

10. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีโปรตีน

0.25% Comassie blue R-250 ในสารละลาย Destaining

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. Extraction Buffer

ละลาย Tris-Base 0.24228 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7.5 ด้วย HCl เข้มข้น

12. Saline Solution

0.85% NaCl ในน้ำกลั่น

การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยเครื่อง Ebulliometer

เตรียมตัวอย่างที่จะทำการวัดหาค่าแอลกอฮอล์ นำน้ำกลั่นมาทำการล้างในช่องใส่ตัวอย่างก่อน 1 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสิ่งอื่นเจือปน เทน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิตร ในช่องใส่ตัวอย่างเพื่อวัดจุดเดือดของน้ำที่ความดันและอุณหภูมิห้อง เมื่อได้ค่าของจุดเดือดนำมากำหนดในแผ่นเทียบค่าจุดเดือดเพื่อใช้เทียบกับจุดเดือดของตัวอย่างต่อไป เทตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาตร 50 ml ลงในช่องใส่ตัวอย่างจุดตะเกียงและทำการวัดค่าจุดเดือดของตัวอย่าง นำค่าจุดเดือดที่ได้มาเทียบกับแผ่นเทียบที่ได้วัดค่าจุดเดือดของน้ำไว้ จะได้ค่าเปอร์เซนต์แอลกอฮอล์จากแผ่นเทียบค่านั้น

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

การหาปริมาณโปรตีนในสารละลายโดยวิธีของ Lowry ทำได้โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของตัวอย่างที่ต้องการ โดยใส่สารละลายต่อไปนี้ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร จากนั้นนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน ลากเส้นจากแกนค่าการดูดกลืนแสง (Y) มาชนกราฟมาตรฐานแล้วลากลงมาตัดแกนความเข้มข้น (X) ก็จะทราบปริมาณโปรตีน

การเตรียมสารเคมี

สารละลาย ก.

ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 2 กรัม ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ข.

ละลายโพแทชเซียมโซเดียมตาเตรต 2.7 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย ค.

ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 2% Sodium potassium tartrate ในปริมาณเท่าๆ กัน

สารละลาย ง.

นำสารละลาย ก. 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย ข. 1.0 มิลลิลิตร และสารละลาย ค. 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เตรียมเมื่อต้องการใช้

สาร Folin-Ciocalteu reagent 1 N

นำ Folin-Ciocalteu reagent 2 N มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เตรียมเมื่อต้องการใช้

สารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin

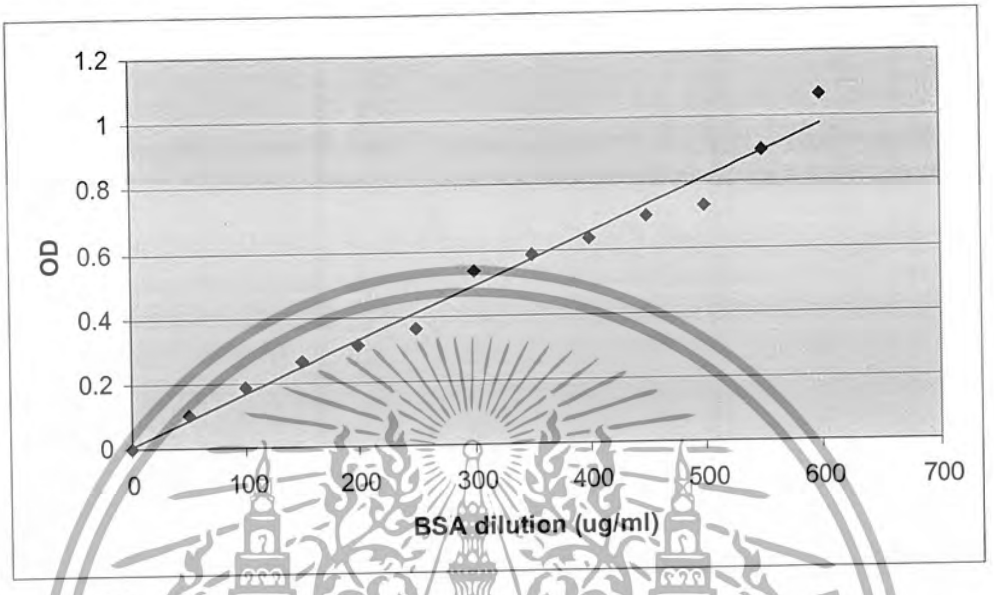
ละลาย Bovine Serum Albumin 0.25 กรัม ในน้ำกลั่นเล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำมาเจือจางโดยให้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 25-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

นำสารสกัดเซลล์เห็ดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย ง. 5.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ใส่สารสกัดเซลล์เห็ด ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที หลังจากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent 1 N 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันทันทีทิ้งไว้ 45 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ นำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 750 นาโนเมตร บันทึกค่า OD ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Bovine Serum Albumin ความเข้มข้นของโปรตีน 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวัด OD ตามวิธีข้างต้น บันทึกค่า OD และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนของ Bovine Serum Albumin กับค่า OD นำค่า OD ที่ได้จากเห็ดมาหาปริมาณโปรตีน โดยค่าปริมาณโปรตีนที่ได้เป็นไมโครกรัมโปรตีนต่อ 0.1 มิลลิลิตรของสารสกัดเซลล์เห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin



การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์

โดยแสดงในรูปกิจกรรมของเอนไซม์ต่อปริมาตรของสารสกัดเซลล์หืด (Volume Activity) ซึ่งสามารถคำนวณโดยใช้สูตร

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

เมื่อ V = ปริมาตรทั้งหมดของสารในคิวเวต (มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรของสารสกัดเซลล์ในคิวเวต (มิลลิลิตร)

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

d = ระยะทางที่แสงผ่านคิวเวต (เซนติเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลอง

V =	1	มิลลิลิตร
v =	0.05	มิลลิลิตร
e =	6.22	ลิตร/มิลลิโมล/เซนติเมตร
d =	1	เซนติเมตร

โดยการวาดกราฟของค่าการดูดกลืนแสงต่อเวลา จะสามารถวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้จากการหาความชันของเส้นตรงเริ่มต้นที่สัมผัสกราฟ เรียกค่าที่ได้นี้ว่า "change in absorbance per minute"

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเซลล์เห็ดหูหนู

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.0134	0.0118	0.0074	0.0153	0.0116	0.008	0.0134	0.0173	0.0107	0.0106	0.0057
8 วัน	0.0109	0.01	0.0076	0.0146	0.0135	0.0023	0.0107	0.0001	0.0024	0.0009	0.0054
11 วัน	0.0188	0.0062	0.004	0.02	0.0122	0.0156	0.0159	0.0152	0.0171	0.0114	0.0087
14 วัน	0.0059	0.0198	0.0128	0.0137	0.0016	0.0126	0.0144	0.0197	0.0037	0.0117	0.0169
17 วัน	0.0097	0.0198	0.0041	0.0018	0.0088	0.0077	0.0165	0.0049	0.0143	0.0113	0.0098
21 วัน	0.0053	0.013	0.0151	0.0182	0.0142	0.0064	0.0098	0.01	0.0094	0.0113	0.0002

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเซลล์เห็ดนางรมทอง

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.6984	0.6993	0.7002	0.7008	0.7012	0.7032	0.7021	0.7023	0.703	0.7028	0.702
8 วัน	0.8012	0.803	0.8047	0.8055	0.8079	0.8089	0.8098	0.809	0.8101	0.8093	0.8098
11 วัน	0.5809	0.5827	0.5844	0.5854	0.5875	0.5881	0.5875	0.5891	0.5888	0.5889	0.5888
14 วัน	0.6663	0.668	0.6697	0.6707	0.6729	0.6745	0.6741	0.6747	0.6752	0.6744	0.6744
17 วัน	0.852	0.8529	0.8537	0.8539	0.8547	0.8559	0.8567	0.8566	0.8552	0.8569	0.8549
21 วัน	0.8973	0.8987	0.9	0.9005	0.9017	0.9031	0.9026	0.9041	0.9039	0.9039	0.9038

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเซลล์เห็ดนางนวล

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.7411	0.7421	0.7431	0.7433	0.7449	0.7458	0.7451	0.7474	0.7468	0.7453	0.7473
8 วัน	0.5156	0.5175	0.5193	0.5205	0.5224	0.523	0.5232	0.5244	0.5238	0.5237	0.5234
11 วัน	0.5797	0.5819	0.584	0.5853	0.5876	0.5882	0.5877	0.5892	0.5896	0.5896	0.5896
14 วัน	0.6891	0.6918	0.6945	0.6969	0.6998	0.7006	0.6998	0.7015	0.7016	0.7001	0.7014
17 วัน	0.832	0.8352	0.8383	0.8407	0.8445	0.8458	0.846	0.8447	0.846	0.8466	0.8463
21 วัน	0.7679	0.7704	0.7729	0.7749	0.7779	0.7785	0.7801	0.7786	0.7788	0.7792	0.7787

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเซลล์เห็ดนางรมฮังการี

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.7318	0.7325	0.7331	0.733	0.7339	0.7343	0.7339	0.7351	0.7358	0.7355	0.7347
8 วัน	0.6784	0.6799	0.6814	0.6825	0.6842	0.6857	0.6845	0.6855	0.6845	0.6856	0.6865
11 วัน	0.6611	0.6636	0.666	0.6677	0.6704	0.6714	0.6715	0.6719	0.6706	0.6728	0.6717
14 วัน	0.5476	0.5502	0.5527	0.555	0.5576	0.5597	0.5592	0.5593	0.5589	0.5601	0.559
17 วัน	0.6933	0.695	0.6966	0.6981	0.6992	0.7016	0.6995	0.7001	0.7015	0.6999	0.7014
21 วัน	0.76	0.7616	0.7632	0.7647	0.7657	0.7662	0.7667	0.7678	0.7669	0.7658	0.7666

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเซลล์เห็ดนางฟ้า

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.732	0.7334	0.7347	0.7355	0.7372	0.738	0.7393	0.7386	0.7394	0.7396	0.7397
8 วัน	0.764	0.7661	0.7682	0.7701	0.7717	0.7728	0.7734	0.7741	0.7732	0.7741	0.7734
11 วัน	0.5373	0.5401	0.5428	0.5451	0.548	0.5487	0.5488	0.5493	0.5497	0.5495	0.5484
14 วัน	0.8363	0.8396	0.8429	0.8453	0.8494	0.8504	0.8511	0.851	0.8518	0.8495	0.8496
17 วัน	0.8551	0.8586	0.8621	0.8646	0.8681	0.8697	0.8685	0.8695	0.8695	0.8683	0.8699
21 วัน	0.5907	0.5939	0.597	0.5993	0.6027	0.6042	0.605	0.6032	0.6043	0.6037	0.6041

ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเซลล์เห็ดหลินจือ

อายุ/เวลา	0 วินาที	30 วินาที	60 วินาที	90 วินาที	120 วินาที	150 วินาที	180 วินาที	210 วินาที	240 วินาที	270 วินาที	300 วินาที
5 วัน	0.8872	0.8883	0.8893	0.8897	0.8909	0.8927	0.8934	0.8933	0.8916	0.8918	0.8919
8 วัน	0.7592	0.7605	0.7618	0.7621	0.7635	0.765	0.7637	0.7637	0.765	0.7655	0.7636
11 วัน	0.5002	0.5017	0.5031	0.5042	0.5054	0.5074	0.5077	0.5075	0.5056	0.5064	0.5071
14 วัน	0.6991	0.7016	0.704	0.7056	0.7081	0.7095	0.7098	0.7091	0.7094	0.7097	0.7105
17 วัน	0.7312	0.7342	0.7372	0.7398	0.7428	0.7446	0.7442	0.7449	0.7428	0.7445	0.7445
21 วัน	0.6885	0.6919	0.6953	0.6978	0.7011	0.7033	0.7032	0.7018	0.7035	0.7015	0.7018