

## บทที่ 2

### วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### น้ำหมักชีวภาพ

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมาก อาจพบเกือบทุกหนทุกแห่งในธรรมชาติ ในอากาศที่เราหายใจเข้าไป ในอาหารที่เรากิน ที่ผิวหนังของร่างกาย ในทางเดินอาหาร ในปาก จมูกหรือช่องเปิดต่างๆ ของร่างกาย แต่ยังเป็นความโชคดีของเราเพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติต่อต้านสารพิษที่มีชีวิตทั้งมวลในโลก ทั้งโดยทางตรงและทางอ้อม จุลินทรีย์เป็นตัวการทำให้เกิดกระบวนการหมัก ผลผลิตที่ได้จากการหมักนั้น ในที่นี้เราขอเรียกว่า “น้ำหมักชีวภาพ”

น้ำหมักชีวภาพ(Biofertilizer) คือ การนำเอาพืช ผัก ผลไม้ สัตว์ชนิดต่าง ๆ มาหมักกับน้ำตาลหรือกากน้ำตาล กากน้ำตาลจะทำให้เกิดกระบวนการพลาสโมไลซิส (plasmolysis) คือทำให้สารละลายภายในเซลล์พืชและสัตว์ที่ประกอบด้วยสารอินทรีย์ต่างๆไหลออกจากเซลล์ การหมักมี 2 แบบ คือแบบต้องการออกซิเจน (แบบเปิดฝา) และแบบไม่ต้องการออกซิเจน (แบบปิดฝา) จุลินทรีย์จะใช้สารเหล่านี้เป็นอาหารในการเพิ่มจำนวนและชนิดทำให้เกิดจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จำนวนมาก จุลินทรีย์ที่พบในน้ำหมักชีวภาพ หรือปุ๋ยอินทรีย์น้ำ มีทั้งที่ต้องการออกซิเจน และไม่ต้องการออกซิเจนมักเป็นกลุ่มแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Penicillium Rhizopus* และยีสต์ ได้แก่ *Candida* sp. ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะไปช่วยสลายธาตุต่างๆที่อยู่ในพืชมีคุณค่าในแง่ของธาตุอาหาร พืชเมื่อถูกย่อยสลายโดยกระบวนการย่อยสลายโดยกระบวนการย่อยสลายของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์สารต่างๆจะถูกปลดปล่อยออกมา เช่น โปรตีน กรดอะมิโน ธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง ฮอโรโมนควบคุมการเจริญเติบโต สารควบคุมแมลง สารป้องกันกำจัดโรคพืช เอนไซม์ วิตามิน คุณภาพของน้ำหมักชีวภาพขึ้นกับองค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ จุลินทรีย์ที่มีในกระบวนการหมัก และสภาวะแวดล้อมขณะหมัก

จากการตรวจวิเคราะห์กระบวนการด้านวิทยาศาสตร์ในการหมักของน้ำหมักชีวภาพ พอสรุปโดยสังเขปได้ดังนี้

1. ถ้าในน้ำหมักชีวภาพ หรือน้ำหมักชีวภาพ หรือปุ๋ยอินทรีย์น้ำมีสภาพเป็นกรด และมีแก๊สออกซิเจนในการหมัก คือ เปิดฝาเวลาหมัก ในสารละลายมีแบคทีเรียชนิด Methanotrophic ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เปลี่ยนแก๊สมีเทนได้กลายเป็นเมทานอล (methanol) และมีธาตุเหล็ก หรือไอออนเหล็ก( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) ในพืชที่ใช้หมัก เช่น พริก ผักขม, ผักคะน้า เป็นต้น เมทานอลจะถูกออกซิเจนในอากาศทำให้กลายเป็นเอสเทอร์ของแอลกอฮอล์ ซึ่งสารพวกเอสเทอร์จะมีกลิ่นหอม และกลิ่นเหม็นเฉพาะตัว ใช้เป็นสารดึงดูดแมลง และสารไล่แมลงได้

2. กลูโคสในพืชที่ใช้หมัก ถ้าในขณะหมักมีแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (grampositive) คือ Eubacterium, *Sarcina ventriculi* และมีออกซิเจน คือเปิดฝาเวลาหมักพร้อมกับในสารละลายมีเอนไซม์ 3 ตัว ซึ่งมีอยู่ในพืชเอง คือ pyruvate dehydrogenase, phosphotransacetylase, acetate kinase ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารกลูโคส ให้กลายเป็นสารไพรูเวท และจะถูกย่อยสลายต่อไป จนสุดท้ายได้สาร acetic acid และ acetate เมื่ออนุมูล acetate มารวมตัวกับ minor elements เช่น Ca, Mg จะได้เป็น Calcium acetate และ Magnesium acetate ถ้ารวมตัวกับพวก major elements จะได้เป็น  $NaOOCCH_3$  C (Sodium acetate) หรือ  $KOOCCH_3$  C (potassium acetate)ซึ่งพืชพร้อมจะดูดเอาไปใช้เป็นอาหารได้เลย

3. ถ้าหมักแบบปิดฝาไม่มีออกซิเจน ethanol ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายเมื่อเจออากาศจะได้เป็นสารพวกเอสเทอร์ ซึ่งมีกลิ่นเหม็นเช่นกันซึ่งใช้เป็นสารดึงดูดแมลงและเป็นสารไล่แมลงได้

4. แบคทีเรียชนิดแกรมลบ (gram negative) ชื่อ Eubacterium, Zyomononas mobilis จะได้สาร ethanol แล้วเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์เช่นกัน

5. กลูโคสเป็นสารที่มีอยู่ในพืชทุกชนิดในรูปน้ำตาลชนิดหนึ่งที่ถูกสะสมเอาไว้ใช้ เมื่อจำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นรูปอื่นๆที่พร้อมจะนำไปใช้ เช่น พลังงาน, อาหารต่างๆ ฯลฯ เมื่อได้ products สุดท้ายเป็น acetic acid, lactic acid เมื่ออยู่ในสารละลายถ้ามี major elements, minor elements จะเปลี่ยนรูปเป็นสารอาหารเช่นกัน ซึ่งพืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที

ดังนั้นการใช้เทคนิคจุลินทรีย์ในการเกษตรจึงเป็นแนวทางที่จะก่อให้เกิดจุดเน้นที่สำคัญในเรื่องที่เกี่ยวกับ

1. ผลิตอาหารที่มีรสชาติธรรมชาติ
2. ผู้ผลิตอาหารและผู้บริโภคปลอดภัยจากสารพิษ
3. เป็นระบบทำการเกษตรแบบยั่งยืน
4. รักษาสมดุลธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของประเทศ

### คุณสมบัติทั่วไปของน้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพ จะมีลักษณะเป็นสารละลายสีน้ำตาลเข้ม มีกลิ่นของแอลกอฮอล์ผสมกลิ่นเปรี้ยวของกรดอินทรีย์เมื่อชิมดูจะมีรสเปรี้ยว

#### สมบัติทางเคมี

โดยทั่วไป มีดังนี้

- มีค่า pH (ความเป็นกรดเป็นด่าง) อยู่ในช่วง 3.5 - 5.6 ปฏิกริยาเป็นกรดถึงกรดจัด ซึ่ง pH ที่เหมาะสมกับพืชควรอยู่ในช่วง 6 - 7
- ความเข้มข้นของสารละลายสูง โดยค่าของการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity , E.C) อยู่ระหว่าง 2 - 12 desimen / meter(ds / m) ซึ่งค่า E.C. ที่เหมาะสมกับพืชควรจะอยู่ต่ำกว่า 4 ds / m
- ความสมบูรณ์ของการหมัก พิจารณาจากค่า C / N ration มีค่าระหว่าง 1 / 2 - 70 / 1 ซึ่งถ้า C / N ratio สูง เมื่อนำไปฉีดพ่นบนต้นพืชอาจแสดงอาการใบเหลืองเนื่องจากขาดธาตุไนโตรเจนได้

### ธาตุอาหาร

#### ธาตุอาหารหลัก (N,P,K)

- ไนโตรเจน (% Total N) เป็นองค์ประกอบของโปรตีน คลอโรฟิลล์ เอนไซม์และวิตามินหลายชนิด ช่วยในการเจริญเติบโตของพืช ถ้าใช้พืชหมัก พบไนโตรเจน 0.03 - 1.66 % แต่ถ้าใช้ปลาและหอยหมักจะพบประมาณ 1.06 - 1.70 %
- ฟอสฟอรัส (% Total P→2O5) เป็นองค์ประกอบกรดนิวคลีอิกฟอสโฟลิปิดหรือ ATP และโคเอนไซม์หลายชนิด ช่วยเร่งการออกดอกและการสร้างเมล็ดในน้ำหมักจากพืชจะมีตั้งแต่ไม่พบเลยจนถึง 0.4 % แต่ในน้ำหมักจากปลาและหอยพบ 0.18 - 1.14 %
- โพแทสเซียมที่ละลายน้ำได้ (% Water Soluble K2O) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดที่

ทำหน้าที่ในการสร้างแป้ง น้ำตาล และโปรตีน ควบคุมการปิดเปิดของปากใบ ส่งเสริมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลจากใบสู่ผล ในน้ำหมักพืชพบ 0.05 - 3.53 % และในน้ำหมักจากปลาและหอยพบ 1.0 - 2.39 %

#### ธาตุอาหารรอง (Ca, Mg, S)

- แคลเซียม เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ จำเป็นสำหรับกระบวนการแบ่งเซลล์และเพิ่มขนาดเซลล์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์บางชนิด ในน้ำหมักจากพืชพบ 0.05 - 0.49 % และน้ำหมักจากปลาและหอยพบ 0.29 - 1.0%

- แมกนีเซียมและซัลเฟอร์ เป็นองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง ในน้ำหมักจากพืชและปลาพบในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.1- 0.37 %

#### ธาตุอาหารเสริม

- เหล็ก ในน้ำหมักจากพืชพบ 30 - 350 ppm. และน้ำหมักจากปลาและหอยพบ 500 – 1,700 ppm.
- คลอไรด์ น้ำหมักจากพืชและปลาปริมาณเกลือคลอไรด์สูง 2,000 - 11,000 ppm.

ธาตุอาหารเสริมอื่นๆ ได้แก่ แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โบรอน และโมลิบดีนัม น้ำหมักทั้งจากพืชและปลาพบในปริมาณน้อย มีค่าตั้งแต่ตรวจไม่พบเลยจนถึง 130 ppm ผลวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในน้ำหมักชีวภาพ 100 กรัม ปรากฏดังนี้

กรดอะมิโน	มิลลิกรัม/100 กรัม
กรดแอสปาร์ติก	346.06
ทรีโอนีน	26.34
ซีรีน	39.30
กรดกลูตามิก	127.45
โพรลีน	1.26
ไกลซีน	13.24
อะลานีน	91.69
ซิสทีน	17.88
วาเลีน	55.26
เมไทโอนีน	9.37
ไอโซลิวซีน	26.26
ลิวซีน	34.30
ไทโรซีน	22.14
ฟีนอลอะลานีน	4.44
ฮีสติดีน	16.28
ไลซีน	30.20
อาร์จินีน	18.76
ทริปโตเฟน	6.22

ตารางที่1 ปริมาณกรดอะมิโนในน้ำหมักชีวภาพ

## ปริมาณฮอร์โมนพืช

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืช 3 กลุ่ม คือ

1. **กลุ่มออกซิน** (Auxin ; Indole acetic acid : IAA) มีสมบัติควบคุมการขยายตัวของเซลล์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ เร่งการเกิดราก การเจริญของราก ลำต้น ควบคุมการเจริญของใบ ส่งเสริมการออกดอก เปลี่ยนเพศดอก เพิ่มการติดผล ควบคุมการพัฒนาของผล ควบคุมการสุก แก่ และการร่วงหล่นของผล IAA ตรวจพบทั้งในน้ำหมักจากพืชและสัตว์ แต่พบในปริมาณน้อย มีค่าในช่วงตั้งแต่ น้อยมากจนไม่สามารถวัดได้ - 2.37 ppm

2. **กลุ่มจิบเบอเรลลิน** (Gibberellins ; Gibberellic acid : GA3) มีสมบัติกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์พืชในทางยาว เร่งการเกิดดอก เปลี่ยนเพศดอก เพิ่มการติดผล ยืดช่อดอก กระตุ้นการงอกของเมล็ดและตา GA3 ตรวจพบในน้ำหมักจากพืชบางชนิดในปริมาณ 18 - 140 ppm. ไม่พบ GA3 ในน้ำหมักจากปลา

3. **กลุ่มไซโทไคนิน** (Cytokinins ; Zeatin และ Kinetin) กระตุ้นการแบ่งเซลล์การเจริญด้านลำต้นของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้างทำให้ตาข้างเจริญออกเป็นกิ่งได้ ช่วยเคลื่อนย้ายสารอาหารจากรากไปสู่ยอด รักษาอัตราการสังเคราะห์โปรตีนให้นานขึ้น ป้องกันคลอโรฟิลล์ให้ถูกทำลายช้าลงทำให้ใบเขียวอยู่นานและร่วงหล่นช้าลง ช่วยทำให้ใบเลี้ยงคลี่ขยาย ช่วยให้เมล็ดงอกได้ในที่มืด Zeatin ตรวจพบในน้ำหมักจากพืชบางตัวอย่างในปริมาณน้อย 1 - 20 ppm. และพบในน้ำหมักจากปลาที่ใส่น้ำมะพร้าว 2 - 4 ppm. Kinetin ตรวจพบในน้ำหมักจากพืชบางชนิดในปริมาณ 1 - 14 ppm. แต่ไม่พบในน้ำหมักจากปลา

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น จะเห็นว่าคุณภาพและประสิทธิภาพของน้ำหมักชีวภาพ ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ จุลินทรีย์ที่ทำให้ย่อยสลาย กระบวนการย่อยสลายที่สมบูรณ์ไม่เน่าเสีย ความเข้มข้นของสารละลาย และความเข้มข้นของกรดเป็นต่าง

## คุณสมบัติของน้ำหมักชีวภาพในด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

การหมักพืช หรือสัตว์ในกระบวนการหมักจะมีแก๊สมีเทน (CH<sub>3</sub>) เกิดขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียจะเปลี่ยนแก๊สมีเทน (CH<sub>3</sub>) ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ และแอลกอฮอล์เมื่อถูกออกซิเจนในอากาศ ทำให้กลายเป็นเอสเทอร์ของแอลกอฮอล์จะมีกลิ่นหอมหรือเหม็นเฉพาะตัว ถ้ามีกลิ่นหอมก็เป็นสารดึงดูดแมลง ถ้ามีกลิ่นเหม็นก็จะเป็นสารไล่แมลง

จากการวิเคราะห์น้ำสกัดชีวภาพของสำนักวิจัยและพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติ กรมวิชาการเกษตร ปรากฏผลดังนี้

1. **น้ำสกัดชีวภาพที่หมักจากผลไม้ ผักสด หรือจากพืชสมุนไพร** จะมีสารพวก polyphenol ได้แก่ 1,2 Benzenediol หรือ 1,3 Benzenediol พวก dimethoxy phenol, benzoic acid derivatives สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นกรด เช่น 1,3 Benzenediol(resorcinol) ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง และเยื่อจมูก ทางสัตวแพทย์เคยใช้เป็น antiseptic ดังนั้น สารพวกนี้อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังของแมลงได้นอกจากนี้ยังพบสารพวก ethylester ของพวกกรดไขมัน เช่น ethyl palmitate, ethyl linoleate ในสารละลายบางตัวพบ alcohol ได้แก่ benzene ethanol

2. **น้ำสกัดจากหอย + ไข่ดาว** พบสารพวก polyphenol และ ethyl ester ของกรดไขมันเช่นเดียวกับ Ethyl ester เกิดจาก alcohol ชนิด ethyl alcohol ที่สกัดจากการหมักย่อยสารของพืชแล้ว alcohol นั้น ก็ทำ

ปฏิกิริยากับกรดไขมันที่มีในพืชที่เป็น ethyl ester คุณสมบัติของ ester พวกนี้มีคุณสมบัติ เป็นสารไล่แมลงและ สารล่อแมลงได้ แต่ถ้าเกษตรกรต้องการใช้พืชสมุนไพรที่มีศักยภาพในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช ควรใช้น้ำ ธรรมดาหรือน้ำอุ่น (ในกรณีของพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยปนอยู่ด้วย) ในอัตราส่วนพืช 1 กิโลกรัม แชน้ำ 20 ลิตร คนเป็นครั้งคราว ทิ้งไว้ 1 คืน ไม่ควรเกิน 2 คืน นำเอาเอกสารละลายที่ได้มาผสมน้ำอีกเท่าตัว แล้วฉีดพ่นบนต้นพืช จะให้ผลดีกว่าการนำมามากผสมกันหลายๆ ชนิด กับกากน้ำตาลและการฉีดพ่นไม่ต้องฉีดพ่นร่วมกับน้ำสกัด ชีวภาพ หรือน้ำหมักชีวภาพ หรือ ปุ๋ยอินทรีย์น้ำ ควรฉีดพ่นเมื่อต้องการนำมาใช้ป้องกันและกำจัดศัตรูพืชเท่านั้น พืชที่สามารถนำมาใช้ป้องกัน และกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ สะเดา (ใช้ส่วนของเมล็ด) ตะไคร้หอม (ใช้ส่วนใบ) หนอน ตายหยาก (ใช้ส่วนราก) ว่านน้ำ (ใช้ส่วนเหง้า) ข่า (ใช้ส่วนแงง) สาบเสือ (ใช้ส่วนใบ) เป็นต้น

### การใช้ประโยชน์จากน้ำหมักชีวภาพ

#### ด้านการเกษตร

1. ช่วยปรับสภาพความเป็นกรด - ด่าง ในดินและน้ำ
2. ช่วยปรับสภาพโครงสร้างของดินให้ร่วนซุย อุ่นน้ำและอากาศได้ดียิ่งขึ้น
3. ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินให้เป็นธาตุอาหารแก่พืช พืชสามารถดูดซึมไปใช้ได้เลย โดยไม่ต้องใช้พลังงานมากเหมือนการใช้ปุ๋ยวิทยาศาสตร์
4. ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืชให้สมบูรณ์ แข็งแรงตามธรรมชาติ ด้านทานโรคและแมลง
5. ช่วยสร้างฮอร์โมนพืช ทำให้ผลผลิตสูง และคุณภาพของผลผลิตดีขึ้น
6. ช่วยให้ผลผลิตคงทน เก็บรักษาไว้ได้นาน

#### ด้านปศุสัตว์

ช่วยกำจัดกลิ่นเหม็นจากฟาร์มสัตว์ กำจัดน้ำเสีย ช่วยป้องกันโรคในสัตว์

#### ด้านการประมง

ช่วยควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ ช่วยแก้ปัญหาโรคพยาธิในน้ำ ช่วยลดปริมาณซีแลนในบ่อ

#### ด้านสิ่งแวดล้อม

ช่วยบำบัดน้ำเสียจากการเกษตร ปศุสัตว์ การประมง โรงงานอุตสาหกรรม ชุมชน และสถานประกอบการทั่วไป ช่วยกำจัดกลิ่นเหม็น กำจัดขยะด้วยการย่อยสลาย ช่วยปรับสภาพอากาศที่เสีย

### ข้อควรระวังในการใช้น้ำหมักชีวภาพ

น้ำหมักชีวภาพเป็นของเหลวที่มีจุลินทรีย์ย่อยสลายสิ่งต่าง ๆ ภายในเซลล์ มีความเข้มข้นของสารละลาย อยู่มาก มีข้อควรระวังในการใช้ คือ

1. การใช้น้ำหมักชีวภาพกับพืชบางชนิด เช่น กล้วยไม้ อาจทำให้วัสดุที่ใช้ปลูก เช่น กาบมะพร้าวผุเร็ว ก่อนเวลาอันสมควร
2. การใช้น้ำหมักชีวภาพกับพืชนั้นในดินควรมีอินทรีย์วัตถุอยู่ เช่น มีการใส่ปุ๋ยหมัก และเศษพืชแห้ง คลุมดินไว้ ซึ่งทำให้การใช้ประโยชน์จากน้ำสกัดชีวภาพหรือน้ำหมักชีวภาพได้ผลดี
3. ห้ามใช้อัตราที่กำหนดไว้ในคำแนะนำ เพราะอาจมีผลทำให้ใบไหม้ได้ เนื่องจากความเป็นกรดหรือความ เเค็มในน้ำสกัดชีวภาพ หรือน้ำหมักชีวภาพ

4. น้ำสกัดชีวภาพหรือน้ำหมักชีวภาพที่มีธาตุไนโตรเจนสูงระวังการใช้ เพราะใช้มากอาจทำให้เหี่ยวใบและไม่ออกดอก ออกผลได้

5. การใช้น้ำหมักชีวภาพ เมื่อนำไปฉีดพ่นต้นพืชต้องใช้เจือจางมาก พืชแต่ละชนิดจะตอบสนองคล้ายกับได้รับฮอร์โมน ซึ่งฮอร์โมนที่ส่งเสริมการเติบโตถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโตหรือตายได้

### กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่สำคัญในกระบวนการหมัก

ในกระบวนการหมักน้ำหมักชีวภาพนั้น มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีซึ่งถือได้ว่าเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อคุณภาพ และคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้ วัตถุประสงค์ที่หลากหลายผสมผสานกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักทำให้ได้น้ำหมักชีวภาพที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันไป

#### 1. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยจุลินทรีย์

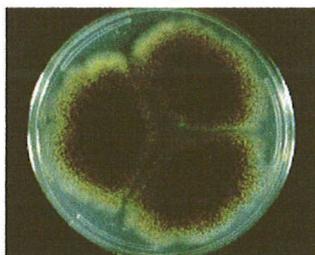
จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีในกระบวนการหมักนั้นมีทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย

##### 1.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยรา

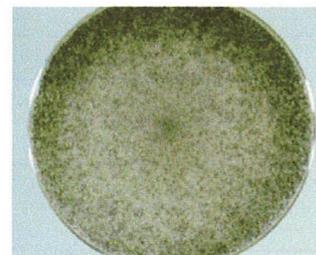
รา (molds) ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของผลไม้ ได้แก่ *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* และ *Botrytis* โดยลักษณะของราต่างๆดังรูป



*Penicillium*



*A. niger*



*R. oryzae*

รูป1 ราที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก

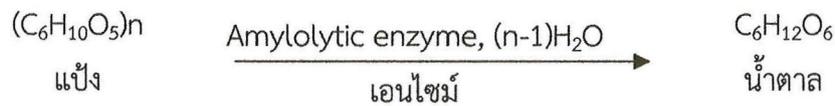
ที่มา : [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Penicillium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Penicillium/)  
[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Aspergillus/niger.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/niger.html)  
[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R\\_oryzae.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/R_oryzae.html)

- *Penicillium* ส่วนใหญ่พบปนเปื้อนในผลไม้ขนาดเล็กที่แตก อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *Penicillium* ประมาณ 15-24 °C

- *Aspergillus niger* เป็นราที่พบทั่วไปในสวนผลไม้ พบในผลไม้ที่เน่าเสีย ช่วงแรกของการเจริญจะสังเกตเห็นเป็นเส้นใยสีขาวคล้าย *Penicillium* แต่เมื่อโคนิดิโอสปอร์ (conidiospores) พัฒนาขึ้นโคโลนีจะกลายเป็นสีดำ *A.niger* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *Penicillium* และสามารถเมตาโบไลซ์ได้เป็นกรดซิตริก

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยราเป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงให้เป็นน้ำตาล โดยจะเปลี่ยนแปลงที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่นำมาใช้หมัก ซึ่งจะพบแบ่งได้ในพืชชนิดต่างๆที่นำมาเป็นวัตถุดิบ ราที่เกี่ยวข้องจะเป็นกลุ่มที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์อะไมโลไลติกเอนไซม์ (Amylolytic enzyme) เอนไซม์จะถูกส่งออกมาออก

เซลล์เพื่อย่อยสลายแป้ง เอนไซม์หลักในกลุ่มอะไมโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase ) และ กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) ซึ่งสามารถย่อยพันธะ  $\alpha$ -1,4 และ  $\beta$ -1,6- glycosidic bond ของสายโพลิเมอร์ของแป้ง ทั้งที่มีโครงสร้างเป็นอะไมโลส (amylose) หรืออะไมโลเพคติน (amylopectin) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ดังรูป

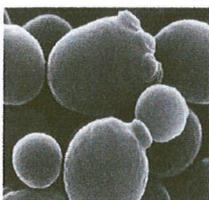


รูปที่2 การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล

## 1.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยยีสต์

### สัณฐานวิทยาของยีสต์

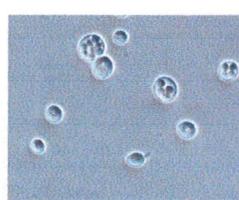
ยีสต์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปไข่หรือวงกลม (รูป 3ก) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (รูป 3ข) บางครั้งอาจมีการเพิ่มจำนวนโดยมีวงจรแบบอาศัยเพศโดยเซลล์แม่จะสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) (รูป 3ค) ซึ่งจะเจริญและได้เป็นเซลล์ปกติ (vegetative cells) สัณฐานวิทยาของยีสต์แตกต่างกันไป ขึ้นกับจีนัส อายุของการเลี้ยง และชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ ยีสต์หลายสายพันธุ์หากสัมผัสกับอากาศโดยตรง อาจมีการเจริญเป็นฟิล์ม หรือเรียกว่าฟิล์มยีสต์ (film yeast) บนผิวหน้าที่สัมผัสกับอากาศ ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากเมื่อยีสต์สัมผัสกับอากาศจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วทำให้การแตกหน่อที่สมบูรณ์ และการแตกหน่อที่ไม่สมบูรณ์ คือ เซลล์แม่และเซลล์ลูกแยกกันอย่างไม่สมบูรณ์ เกาะติดกันไปและแตกหน่อต่อไปเรื่อยๆ ซึ่งเรียกว่า ไมซีเลียมเทียม (pseudomycelium) (รูป 3ง)



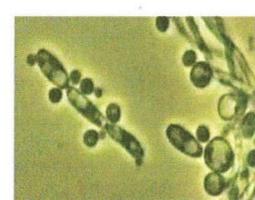
ก



ข



ค

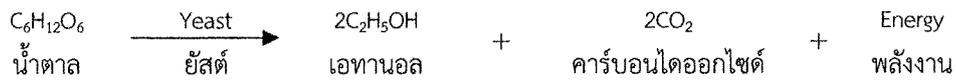


ง

รูปที่ 3 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ ก : สัณฐานวิทยาทั่วไปของยีสต์ ข : ยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ  
ค : ยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์ และ ง : ยีสต์ที่เจริญเป็นไมซีเลียมเทียม

ที่มา : รูป ก, ข, ค และง [http://www.greaterimmunity.com/Files/digestive\\_immunity.html](http://www.greaterimmunity.com/Files/digestive_immunity.html),  
<http://pathmicro.med.sc.edu/mycology/yeast-dk1.jpg>,  
[http://farm4.static.flickr.com/3555/3690025577\\_56b233251e.jpg](http://farm4.static.flickr.com/3555/3690025577_56b233251e.jpg) และ  
[http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/FungalBiology/chap16\\_i.htm](http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/FungalBiology/chap16_i.htm) ตามลำดับ

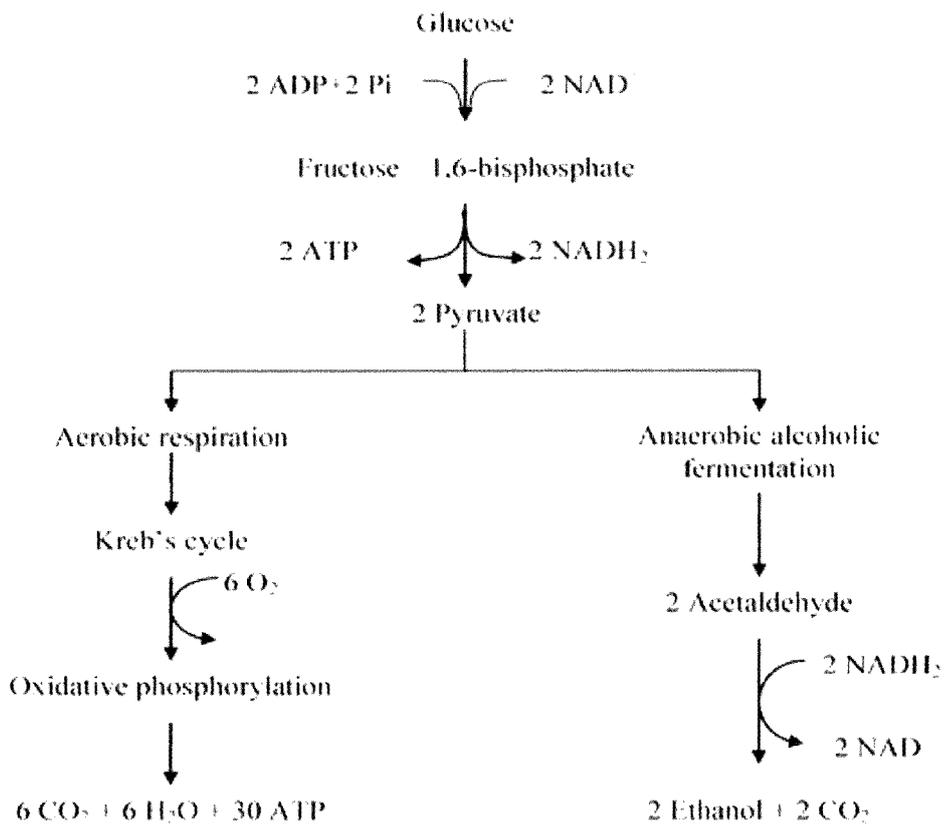
กิจกรรมหลักของยีสต์นั้นจะเปลี่ยนน้ำตาล 1 โมเลกุล ให้ได้เป็นเอทานอล 2 โมเลกุล คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล และพลังงาน ดังรูป



รูปที่4 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล

**ชีวเคมีของการเกิดเอทานอล**

ส่วนใหญ่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงสรุปดังรูป



รูปที่5 เมแทบอลิซึมของยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ (Roehr,2001)

ขั้นตอนแรก คือ เมื่อยีสต์เจริญในอาหารที่มีน้ำตาล ยีสต์จะย่อยสลายน้ำตาลผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) หรือ เอ็ดเดน เมเยอร์ พาร์นัส (Ebden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP) โดยการเปลี่ยนจากกลูโคส 1 โมเลกุล เป็นไพรูเวท 2 โมเลกุล ได้พลังงานในรูปของ ATP 2 โมเลกุล และ NADH<sub>2</sub> 2 โมเลกุล การเปลี่ยนในขั้นตอนนี้เกิดขึ้นไม่ว่ายีสต์จะเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน

ขั้นต่อมาไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนต่อไปให้ผลผลิตสุดท้ายต่างกันตามชนิดของยีสต์ และสภาวะแวดล้อมในระหว่างกระบวนการหมัก โดยจะแบ่งการเปลี่ยนแปลงเป็น 2 ประเภท คือ

1) **Oxidative metabolism (aerobic respiration)** ในสภาวะที่มีออกซิเจน ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นไพรูเวท จากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ โดยผ่านวัฏจักรเครป (Kreb's cycle) และผ่านวิถีการหายใจ (Oxidative respiration) ได้พลังงาน 30 ATP รวมกับขั้นตอนแรก 6-8 ATP (2 ATP รวมกับ 4-6 ATP ที่ได้จากการเปลี่ยน  $\text{NADH}_2$  2 โมเลกุล) เป็น 36-38 ATP ในสภาวะนี้ยีสต์จะนำ ATP ที่ได้ไปใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของยีสต์ให้มากขึ้น

2) **Fermentative metabolism (anaerobic fermentation)** ในกรณีที่น้ำตาลกลูโคสมีความเข้มข้นสูง

และ/หรือสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะเรียกว่าเกิดสภาวะ "การหมัก" (fermentation) ขึ้น โดยสภาวะนี้จะมีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มเล็กน้อย และจะมีการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นอะซีทัลดีไฮด์ แล้วถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล ส่วน  $2\text{NADH}_2$  ที่ได้จากขั้นตอนแรกถูกเปลี่ยนเป็น  $2\text{NAD}^+$  ในขั้นตอนการเปลี่ยนเป็นเอทานอลเพื่อนำกลับไปใช้ในการสังเคราะห์ 2ATP อีกรอบหนึ่งทำให้วิถีการเจริญของยีสต์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนดำเนินต่อไปได้ โดยมี  $2\text{NAD}^+$  เพียงพอในการใช้งาน

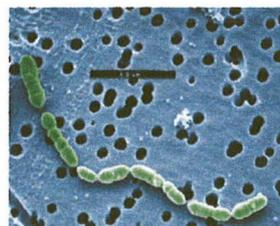
### 1.3 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีโดยแบคทีเรีย

#### 1.3.1 แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกหรืออะซิติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่

*Acetobacter* และ *Gluconobacteria* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยเซลล์ส่วนใหญ่เกาะกันเป็นคู่หรือเป็นสาย มีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีขนาดในช่วง (0.6-0.9) ไมโครเมตร x (1-3) ไมโครเมตร (รูปที่ 6 ก) แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกสามารถออกซิไดซ์เอทานอลและกลูโคสในสภาวะที่มีอากาศไปเป็นกรดอะซิติก ดังรูป แบคทีเรียชนิดนี้ส่วนใหญ่จะทนต่อ pH ต่ำ (3-3.5) หรือสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงได้ดี แต่หากความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงขึ้นความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดจะลดลง



ก

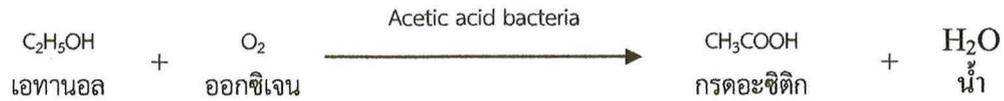


ข

รูปที่ 6 ลักษณะของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก: *Acetobacter* ข: *Leuconostoc oenos*

ที่มา : รูป 6ก และ ข <http://vietsciences.free.fr/khaocuu/nguyenlandung/images/Acetobacter.jpg>

และ <http://genome.jgi-psf.org/oenoe/oenoe.jpg> ตามลำดับ



รูปที่ 7 การเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกในสภาวะที่มีอากาศ

**1.3.2 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก** แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก หรือแลคติกแอซิดแบคทีเรีย อาจพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในผลไม้ต่างๆ อย่างไรก็ตามผลไม้มักกล่าวจะมีจำนวนของแลคติกแอซิดแบคทีเรียค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่า  $10^2$  โคโลนีฟอร์มมิงยูนิตต่อมิลลิลิตร, CFU/ml) ตัวอย่างแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Oenococcus oeni* และ *Leuconostoc oenos* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และสามารถทนกรด และแอลกอฮอล์ได้สูง แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะเปลี่ยนกรดมาลิกที่มีรสแหลมจัดและไม่คงตัวให้เป็นกรดแลคติกที่มีความเปรี้ยว น้อยลงและมีความเสถียรกว่าโดยการทำงานของเอนไซม์มาโลแลคติก (malolactic enzyme) ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า การหมักแบบมาโลแลคติก ดังรูปที่ 6 การหมักนี้เป็นการหมักที่ไม่ต้องการอากาศ



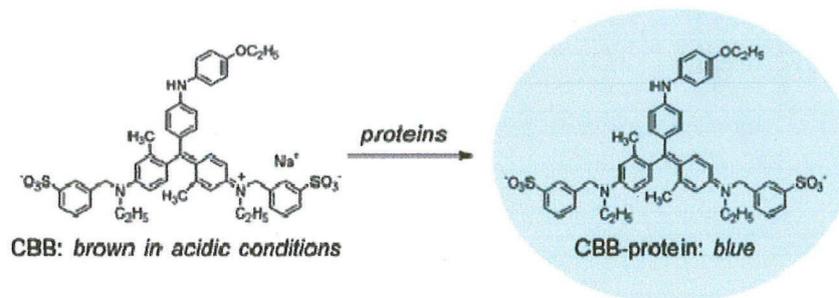
รูปที่ 8 การเปลี่ยนกรดมาลิกให้เป็นกรดแลคติกโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

## หลักการและทฤษฎีทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการทดลอง

### 1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย Bradford method

#### หลักการของ Bradford method

ใช้หลักการในการสังเกตการดูดกลืนแสงสูงสุด สำหรับ acidic solution ของ Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งจะเปลี่ยนค่าของการดูดกลืนแสงจาก 465-595 nm เมื่อสารมีการจับกับโปรตีน ทั้ง hydrophobic และ ionic interactions จะไปทำให้ anionic form ของ dye เกิดการเปลี่ยนสีของ dye จากสีน้ำตาลเป็นสีฟ้า ดังรูป



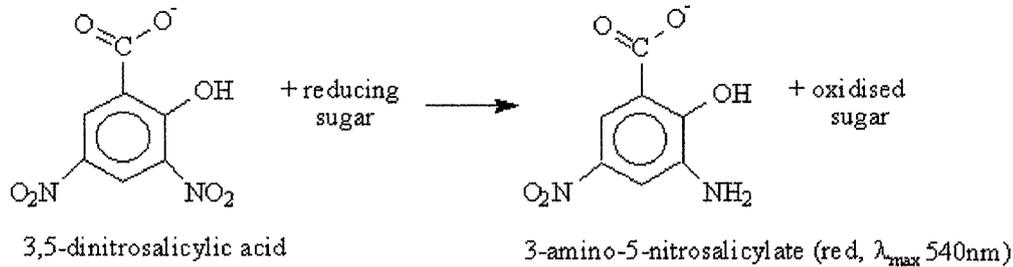
รูปที่ 9 การเปลี่ยนสีของ Bradford dye

ที่มา : [http://www.biomaxkorea.com/product/dojindo/dpo-appli/detergent/clip\\_image025.gif](http://www.biomaxkorea.com/product/dojindo/dpo-appli/detergent/clip_image025.gif)

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วย 3,5-Dinitrosalicylic acid ( DNS method )

### หลักการของ DNS method

ใช้หลักการของสาร 3,5-Dinitrosalicylic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่ม aromatic compound เกิดปฏิกิริยากับ น้ำตาลรีดิวซ์ได้เป็นผลิตภัณฑ์ 3-amino-5-nitrosalicylic acid ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่ 540 nm โดยสารจะ เกิดปฏิกิริยาได้เป็นสีน้ำตาลแดงเมื่อเร่งโดยอุณหภูมิที่น้ำเดือด



รูปที่10 ปฏิกิริยาระหว่าง 3,5-Dinitrosalicylic acid กับ reducing sugar

ที่มา : <http://www.iftsa.org/outreach/so/labs/ae/>

## 3. การวิเคราะห์สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กในน้ำหมักผักผลไม้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (Paperchromatography)

### หลักการของ Paperchromatography

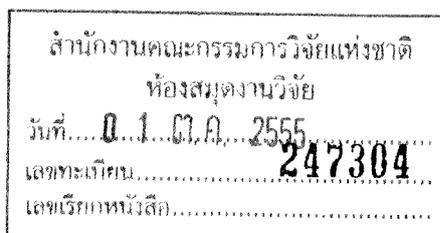
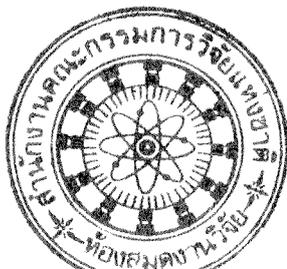
โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์สารเคมีโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายไปบนแผ่นกระดาษที่ทำมาจากเซลลูโลส ดังนั้น Stationary phase คือ น้ำซึ่งติดอยู่กับเยื่อกระดาษ และ Mobile phase คือ ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) ซึ่งมีความเป็นขั้วน้อยกว่าน้ำ สารที่ถูกแยกโดยวิธีนี้จะอาศัยหลักการละลายโดยสารที่ละลายได้ดีใน Mobile phase จะถูกพาไปได้เร็วกว่าสารที่ละลายได้ดีใน Stationary phase นั่นคือสารที่ไม่มีขั้ว (Non-polar) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารมีขั้ว (Polar) เทคนิคนี้ใช้สำหรับแยกสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กๆ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น

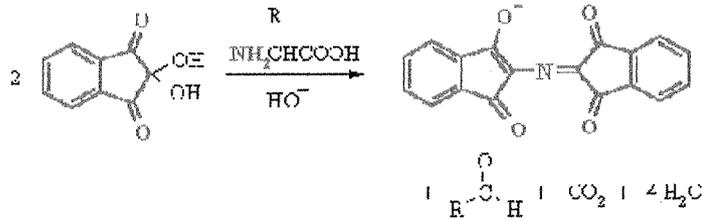
ในการทำคุณภาพวิเคราะห์ของสารโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ ทำได้โดยหยดสารผสมลงบนกระดาษคู่ไปกับสารมาตรฐาน หลังจากทำโครมาโตกราฟีเสร็จนำสิ่งที่ปรากฏบนกระดาษ ซึ่งเรียกว่าโครมาโตแกรม (Chromatogram) มาวิเคราะห์ว่าสารชนิดใดตรงกับสารมาตรฐานใด โดยคำนวณค่า  $R_f$  เปรียบเทียบกัน

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ไปจากจุดตั้งต้น}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไป}}$$

สารที่ปรากฏบนโครมาโตแกรม ถ้าเป็นสารที่มีสีก็สามารถวัดระยะได้เลย แต่ถ้าไม่มีสีก็สามารถวิเคราะห์หาตำแหน่งของสารได้โดยวิธีต่างๆ เช่น ถ้าสารนั้นเรืองแสงได้เมื่อฉายด้วยแสง UV ก็จะนำมาส่องด้วยแสง UV หรือทำให้สารนั้นเกิดสีโดยการฉีดสารเคมีบางชนิดเข้าไป

โดยในการทดลองนี้จะแยกและจำแนกชนิดของกรดอะมิโนด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ และวิเคราะห์ตำแหน่งโครมาโตแกรมของกรดอะมิโน โดยการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Ninhydrin เพื่อทำปฏิกิริยาให้เกิดสี





รูปที่ 11 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโน และสารละลาย ninhydrin

ที่มา : <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch27/ch27-3-3.html>

#### 4. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

**อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)** เป็นเทคนิคทางชีวเคมีที่นิยมใช้แพร่หลายในงานวิเคราะห์และวิจัยในห้องปฏิบัติการต่างๆ ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ทั้งด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ วิทยาศาสตร์การแพทย์และเทคโนโลยีชีวภาพหลายแขนง Reuss ได้รายงานปรากฏการณ์การเคลื่อนที่ของสารภายใต้สนามไฟฟ้าเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1809 หลักการดังกล่าวได้ถูกนำมาประยุกต์เพื่อใช้แยกโปรตีนในซีรัมเป็นครั้งแรกโดย Tiselis ในปี ค.ศ. 1937 จากนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสเรื่อยมาจนถึงปัจจุบันเป็นเทคนิคที่มีอำนาจในการแยกแรงแรงสูง สามารถแยกสารชนิดต่างๆ ภายใต้สนามไฟฟ้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสมีมากมายหลายชนิด เช่น SDS-PAGE IEF เป็นต้น

##### หลักการ

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นการแยกสารหรืออนุภาคภายใต้สนามไฟฟ้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคนอกจากจะขึ้นกับแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่กระทำต่ออนุภาคแล้ว ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นอีกหลายอย่าง

เมื่อพิจารณาแรงที่กระทำต่ออนุภาคใดๆ ที่มีประจุสุทธิ Q ในสนามไฟฟ้าที่มีความแรงของสนามไฟฟ้า E จะเห็นว่าแรงผลัก (Driving force, DF) ที่ทำให้อนุภาคเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า คือ

$$DF = EQ$$

แรงเสียดทาน (Retrading force, RF) ที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของอนุภาค คือ

$$RF = 6\epsilon r \eta v$$

เมื่อ r คือ รัศมีของอนุภาค

$\eta$  คือ ความหนืดของสารตัวกลาง

v คือ ความเร็วของการเคลื่อนที่

เมื่ออนุภาคเคลื่อนที่ในสนามด้วยความเร็วด้วยความเร็วคงที่

$$DF = RF$$

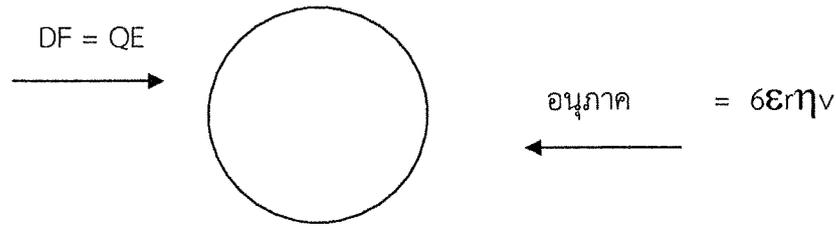
ดังนั้น

$$EQ = 6\epsilon r \eta v$$

นั่นคือ

$$v = EQ / 6\epsilon r \eta \dots\dots\dots(1)$$

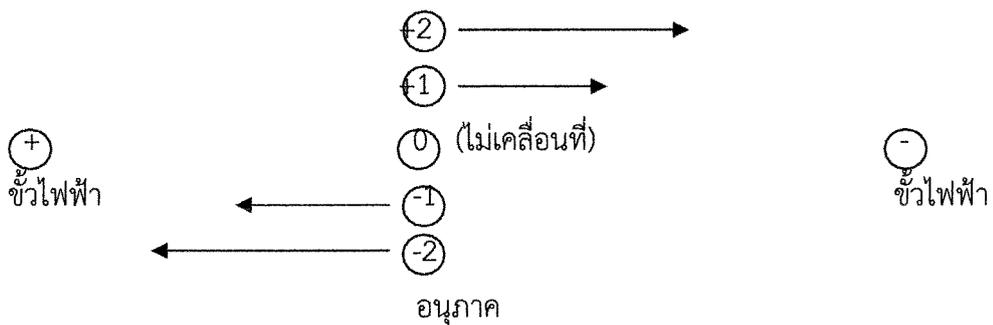
จะเห็นว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอนุภาคใดๆ ภายใต้สนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้า(Electrical field strength) และประจุสุทธิของอนุภาค แต่ผกผันกับขนาดและความหนืดของตัวกลางนั้น



ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคในอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดและปริมาณประจุ อนุภาคที่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต้องมีประจุ ชนิดของประจุเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ ในขณะที่ปริมาณของประจุเป็นตัวกำหนดความเร็วในการเคลื่อนที่



รูปที่ 12 แสดงการเคลื่อนที่ของอนุภาคภายใต้สนามไฟฟ้า ลูกศรแสดงทิศทางการเคลื่อนที่

ดังแสดงในรูปที่ 12 อนุภาคที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า แลอนุภาคที่มีประจุ -2 จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอนุภาคที่มีประจุ -1 (ในกรณีที่มวลเท่ากัน) เป็นต้น

1.2 pH ของสารตัวอย่างและบัฟเฟอร์ในระบบ ชนิดและปริมาณของประจุในสารชีวโมเลกุลส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงตามภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากชีวโมเลกุลทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก มักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและลบบนโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว(dissociation constant, pK) ต่างๆ กัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นกับค่า pH ของสารละลายนั้นๆ โดยหลักการทั่วไปหมู่ที่แสดงประจุได้เหล่านี้จะแตกตัวเมื่อค่า pH ของสารละลายสูงกว่าค่า pK ของมัน เช่น กรดอะมิโนไกลซีน มีหมู่อะมิโน ( $\text{NH}_3^+$ ) และคาร์บอกซิล( $\text{COOH}$ ) ริงมีค่าการแตกตัวที่ 9.6 และ 2.34 ตามลำดับ (รูปที่ 2) เมื่อไกลซีนอยู่ในตัวกลางที่มีค่า pH 8.0 ซึ่งต่ำกว่าค่า pK ของหมู่อะมิโนแต่สูงกว่า pK ของหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นหมู่อะมิโนจะไม่แตกตัวและคงแสดงประจุบวก ( $\text{NH}_3^+$ ) ในขณะที่หมู่คาร์บอกซิลจะแตกตัวและแสดงประจุลบ ( $\text{COO}^-$ ) ดังนั้นไกลซีนในที่นี้จะมีประจุสุทธิ = 0 แต่เมื่อไกลซีนอยู่ในตัวกลางที่มีค่า pH = 10 ซึ่งสูงกว่าค่า pK ของหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นหมู่ทั้งสองจะแตกตัว โดยที่หมู่อะมิโนจะอยู่ในรูป  $\text{NH}_2$  และหมู่คาร์บอกซิลอยู่ในรูป  $\text{COO}^-$  ดังนั้นไกลซีนในที่นี้จะมีประจุสุทธิเป็นลบ ในทำนองเดียวกันหากไกลซีนอยู่ในสารละลายกรดที่มี pH= 2 ซึ่งต่ำกว่าค่า pK ของหมู่ทั้งสอง ทั้งหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลจะไม่แตกตัว หมู่อะมิโนจะอยู่ในรูป  $\text{NH}_3^+$  และคาร์บอกซิลจะอยู่ในรูป  $\text{COOH}$  ดังนั้นไกลซีนในภาวะนี้จะมีประจุสุทธิเป็นบวก เป็นต้น

	$H_3^+N-CH_2-COOH$	$H_3^+N-CH_2-COOH^-$	$H_2N-CH_2-COO^-$
pH ของสารละลาย	acidic (<2.43)	isotonic	Alkaline (>9.6)
Ionic form	cation	zwitterions	anion
ประจุสุทธิ	+	(+ = -) 0	-
ทิศทางการเคลื่อนที่	ไปขั้วลบ	ไม่เคลื่อนที่	ไปขั้วบวก

ตารางที่ 2 แสดงประจุสุทธิของกรดอะมิโนไกลซีนเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่า pH ต่างๆ กัน

จากตัวอย่างข้างต้นจะเห็นว่า pH ของสารละลายตัวอย่างและ pH ของบัฟเฟอร์ในระบบอิเล็กโทรโฟรีซิส จึงมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของสาร ทั้งนี้เนื่องจาก pH เป็นตัวกำหนดชนิดและปริมาณของประจุสารนั่นเอง

**1.3 ขนาด** จากสมการที่ 1 จะเห็นว่าการเคลื่อนที่ของอนุภาคแปรผกผันกับขนาดของอนุภาคนั้น กล่าวคือ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทานสูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กเมื่อมีประจุเท่ากัน

**1.4 รูปร่าง** โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลม (globular) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี (fibrous) ทั้งนี้เนื่องจากแรงเสียดทานที่เกิดขึ้นแตกต่างกันตามรูปร่างนั่นเอง

## 2. สนามไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของอนุภาคแปรผันโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้าซึ่งอยู่กับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า (volt) แต่ผกผันกับระยะทางระหว่างขั้วไฟฟ้า ดังนั้นแม้ว่าจะให้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเดียวกัน อิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีระยะทางระหว่างขั้วไฟฟ้านั้นจะมีความแรงของสนามไฟฟ้ามากกว่าอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีระยะระหว่างขั้วไฟฟ้ายาว ความแรงของสนามไฟฟ้ายังทำให้เกิดความร้อนขึ้นในระบบอิเล็กโทรโฟรีซิส ความร้อนที่เกิดขึ้นแปรผันโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้า เมื่อเกิดความร้อนขึ้น ค่าความหนืดของสารตัวกลางจะลดลง ความต้านทานในระบบจะลดลง ทำให้กระแสในระบบเพิ่มขึ้น (เมื่อ volt คงที่) เป็นผลให้การเคลื่อนที่ของอนุภาคมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันก็ทำให้ pH ของระบบลดลงซึ่งมีผลต่อชนิดและปริมาณของประจุของสารตัวอย่าง ในบางระบบความร้อนที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการระเหยของน้ำ เป็นผลให้ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ในระบบเปลี่ยนไป และมีผลต่ออัตราการวิ่งของสารตัวอย่าง ดังนั้นอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ต้องใช้ความแรงของสนามไฟฟ้าสูงจึงมักมีเครื่องทำความเย็นในระบบด้วยเสมอ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสให้ได้ผลดีจึงควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม

## 3. บัฟเฟอร์ในระบบ

บัฟเฟอร์นอกจากทำหน้าที่รักษาภาวะความเป็นกรดต่างของระบบในขณะที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสให้คงที่และมีผลต่อชนิดและปริมาณของประจุของสารตัวอย่างดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าด้วย ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์หรือปริมาณของอิเล็กโทรไลต์ในบัฟเฟอร์ ซึ่งวัดในค่า ionic strength

นั้น นอกจากทำหน้าที่เป็นสื่อไฟฟ้าในสนามแล้วยังมีผลต่อความร้อนที่เกิดขึ้นในระบบ กล่าวคือ บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ การนำไฟฟ้าจะลดลงทำให้กระแสไฟฟ้าในระบบต่ำลงและความร้อนเกิดขึ้นน้อย ทำให้สามารถใช้ความต่างศักย์สูงได้ และในทางกลับกันบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง การนำไฟฟ้าดีแต่เกิดความร้อนในระบบสูง ด้วยหลักการพื้นฐานนี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถพัฒนาระบบอิเล็กโตรโฟเรซิสชนิด iso electrofocusing ได้

การใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงจะลดอัตราการเกิด diffusion ทำให้ได้แถบของการแยกที่คมชัด แต่อัตราการเคลื่อนที่ของสารจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก electrolyte ในระบบบัฟเฟอร์จะจับกับประจุของสาร บดบังชนิดและปริมาณประจุที่แท้จริงของสารนั้น (รูปที่ 3) ดังนั้นการเลือกชนิดและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เพื่อใช้ในระบบอิเล็กโตรโฟเรซิสจึงเป็นสิ่งสำคัญและต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์

#### 4. ตัวกลางค้ำจุน

ตัวกลางค้ำจุนที่ดีไม่ควรดูดซับหรือแลกเปลี่ยนประจุกับสารตัวอย่างในขณะที่ทำอิเล็กโตรโฟเรซิส เพราะจะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของสารช้าลง โดยเฉพาะการเกิด electro-endosmosis ปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดจากตัวกลางค้ำจุนที่มีประจุบนพื้นผิว เช่น หมู่คาร์บอกซิลของกระดาษและหมู่ซัลโฟนิคของ agarose ซึ่งแสดงประจุลบใน pH ที่เป็นด่าง เนื่องจากประจุบนผิวตัวกลางค้ำจุนเหล่านี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในสนามไฟฟ้า จึงเปรียบเสมือนมีขั้วไฟฟ้าขนาดเล็กๆ อยู่ในระบบจำนวนมาก ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ electrolyte ประจุตรงข้าม (ในที่นี้คือประจุบวก) ไหลจากขั้วบวกไปยังขั้วลบ ซึ่งสวนทางกับการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างที่เคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ในภาวะดังกล่าวนอกจากเป็นการต้านหรือลดอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง แล้วยังทำให้สารที่ไม่มีประจุหรือมีประจุอ่อนๆ เคลื่อนตามกระแส electrolyte ไปยังขั้วลบอีกด้วย

จะเห็นได้ว่าการเลือกตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้การแยกสารด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิสสัมฤทธิ์ผลหรือไม่และมากน้อยเพียงใด ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีคุณสมบัติพื้นฐาน คือ

- ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา
- ไม่ดูดซับสารตัวอย่าง
- สามารถแยกสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน
- สามารถแบ่งหรือแยกเป็นส่วนๆ ได้ง่าย

ตัวกลางค้ำจุนมีหลายชนิด จะเลือกใช้ชนิดใดขึ้นอยู่กับลักษณะงาน วัตถุประสงค์ และชนิดของสารตัวอย่างที่ต้องการแยก

#### ปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

##### 1. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน ปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาปล่อยความร้อนหรือปล่อยพลังงานออกมา (exothermic reaction) เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นจะปล่อยความร้อนออกมาซึ่งมีผลทำให้ปฏิกิริยาเกิดเร็วขึ้น อุณหภูมิมีผลต่อคุณสมบัติของเจลด้วย ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 0-4 °C มีผลทำให้เจลขุ่น เป็นรูพรุน ไม่ยืดหยุ่น เจลมีความไม่สม่ำเสมอทำให้การแยกสารได้ผลไม่ดี ปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันที่อุณหภูมิ 25 °C เจลมีความโปร่งใสมากกว่า มีรูพรุนน้อยกว่าและมีความยืดหยุ่นมากกว่า ถ้าอุณหภูมิสำหรับปฏิกิริยาสูงเกินไปจะเกิดสายโซ่พอลิเมอร์สั้นๆ และเจลไม่ยืดหยุ่น

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเจลคือที่ 25-30°C สารละลายมอโนเมอร์ แผ่นกระจกหรือหลอดแก้วควรมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเมื่อเทเจล เนื่องจากสารละลายมอโนเมอร์และสารละลายบัฟเฟอร์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จึงควรปล่อยให้สารละลายที่เก็บไว้นี้มีอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้องเสียก่อนจึงเตรียมเจล

## 2. ออกซิเจน (O<sub>2</sub>)

การเตรียมเจลโดยปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันซึ่งใช้อนุมูลอิสระถูกยับยั้งได้โดยธาตุหรือสารประกอบที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ O<sub>2</sub> ก็เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) ตัวหนึ่ง O<sub>2</sub> ในอากาศและ O<sub>2</sub> ที่ละลายอยู่ในสารละลายเจล สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องไล่อากาศออกจากสารละลายเจลก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

สารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายมอโนเมอร์ที่เก็บไว้ที่ 4 °C มีความสามารถละลายเก็บ O<sub>2</sub> ได้ดีกว่าการไล่อากาศหรือ O<sub>2</sub> ออกจากสารละลายใช้เวลารวดเร็วกว่าและสมบูรณ์มากกว่าถ้าสารละลายมีอุณหภูมิ 23-25°C ก่อนนำไปไล่อากาศ นอกจากนี้ถ้านำสารละลายเจลที่เย็นมาไล่อากาศออกภายใต้สุญญากาศจะทำให้สารละลายยังคงเย็นอยู่ และการไล่อากาศเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ซึ่งเมื่อนำสารละลายเย็นมาเตรียมเจล จะทำให้มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาและคุณภาพของเจลที่เตรียมขึ้นด้วย ด้วยเหตุดังกล่าวนี้ การเตรียมเจลที่มีคุณภาพดีทำให้มีการแยกสารได้ดี จึงจำเป็นต้องทำให้สารละลายเจลมีอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงนำมาไล่อากาศออก การไล่อากาศใช้เวลาอย่างน้อย 15 นาที ที่ 23-25°C ภายใต้สุญญากาศ 125 torr ถ้าเขย่าหรือกวนสารด้วยจะใช้เวลาน้อยลงประมาณ 8-10 นาที

## 3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสมีระบบบัฟเฟอร์ที่ pH เป็นกลางหรือ pH เป็นด่าง ซึ่งเหมาะสมสำหรับตัวเริ่มต้นที่ใช้คือ TEMED แอมโมเนียมซัลเฟต และไรโบฟลาวิน ที่ pH เป็นกลางหรือ pH เป็นด่าง การทำงานของตัวเริ่มต้นเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพ แต่ที่ pH เป็นกรด TEMED จะกลายเป็นรูปกรด (protonated form) ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันช้าลง เนื่องจาก TEMED รูปเบสอิสระ (free base form) เป็นรูปที่ทำให้เกิดการเริ่มต้นของปฏิกิริยา

## 5. Activity gel electrophoresis

### หลักการของ Activity gel electrophoresis สำหรับ Protease

หลักการเหมือนกับของ SDS-PAGE คือโปรตีนจะถูกแยกตามขนาด โดยวิธีนี้ภายในเนื้อเจลจะมี substrate (Gelatin) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ Protease ได้ ซึ่งถ้ามีการล้างเอา SDS ออกด้วย 25% iso-propanol จะทำให้ SDS หลุดออกจากแถบโปรตีนทำให้โปรตีนสามารถ refold กลับมามีโครงสร้างและมีแอกติวิตีตามสภาวะธรรมชาติ ซึ่งเมื่อ Protease ที่แยกได้จับกับ substrate (Gelatin) ที่อยู่ในเจลจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายทำให้เกิดเป็น clear zone ขึ้นเมื่อย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R 250 เนื่องจากบริเวณดังกล่าวในเนื้อเจลไม่มี Gelatin ผสมอยู่แล้ว

### หลักการของ Activity gel electrophoresis สำหรับ RNase

หลักการเหมือนกับของ SDS-PAGE คือโปรตีนจะถูกแยกตามขนาด โดยวิธีนี้ภายในเนื้อเจลจะมี substrate (RNA) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ RNase ได้ ซึ่งถ้ามีการล้างเอา SDS ออกด้วย 25% iso-

propanol/0.01M Tris-HCl, pH 7.0 จะทำให้ SDS หลุดออกจากแถบโปรตีนทำให้โปรตีนสามารถ refold กลับมามีโครงสร้างและมีแอกติวิตีตามสภาวะธรรมชาติ ซึ่งเมื่อ RNase ที่แยกได้จับกับ substrate (RNA) ที่อยู่ในเจลจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายทำให้เกิดเป็น clear zone ขึ้นเมื่อย้อมด้วย Toluidine blue O เนื่องจากบริเวณดังกล่าวในเนื้อเจลไม่มี RNA ผสมอยู่แล้ว

#### หลักการของ Activity gel electrophoresis สำหรับ Amylase

หลักการเช่นเดียวกับของ SDS-PAGE คือโปรตีนจะถูกแยกตามขนาด โดยวิธีนี้ภายในเนื้อเจลจะมี substrate (starch) ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ Amylase ได้ ซึ่งถ้ามีการล้างเอา SDS ออกด้วย Triton X-100 จะทำให้ SDS หลุดออกจากแถบโปรตีนทำให้โปรตีนสามารถ refold กลับมามีโครงสร้างและมีแอกติวิตีตามสภาวะธรรมชาติ ซึ่งเมื่อ Amylase ที่แยกได้จับกับ substrate (starch) ที่อยู่ในเจลจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายทำให้เกิดเป็น clear zone ขึ้นเมื่อย้อมด้วย 1% acetic acid containing 10 mM I<sub>2</sub> and 14 mM KI เนื่องจากบริเวณดังกล่าวในเนื้อเจลไม่มี starch ผสมอยู่แล้ว