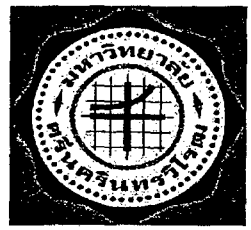
547.78046
พ249ก
2556



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเห็ดฟางตกเกรดในการเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลส

Study on the Utilization of Straw Mushroom Fall Grades in Preparation of Trehalose Sugar

4 พ.ย. 2556

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. พรพิมล ม่วงไทย

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2556

3440692

บทคัดย่อ

เห็ดฟางเป็นเห็ดที่บริโภคได้ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมนำมาประกอบอาหาร อย่างไรก็ตามเมื่อเห็ดฟางมีลักษณะหมองคล้ำ รูปทรงเริ่ม เสียหาย จำหน่ายได้ยากจึงจัดเป็นเห็ดฟางตกเกรด งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาทางคุณภาพวิ เคราะห์เพื่อตรวจหาชนิดน้ำตาลในเห็ด โดยทำการศึกษาระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ 6 ระบบ ได้แก่ ระบบที่ 1 : อะซีโตไนไตร์: น้ำ อัตราส่วน 70 : 30 ระบบที่ 2 : นอร์มาล-บิวทานอล : เอทานอล : น้ำ อัตราส่วน 50 : 30 : 20 ระบบที่ 3 : เอทิลอะซีเตท: กรดอะซิติก: เมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 60 : 15 : 15 : 10 ระบบที่ 4 : นอร์มาล- โพรพานอล : แอมโมเนีย : น้ำ อัตราส่วน 50 : 30 : 20 ระบบที่ 5 : นอร์มาล- บิวทานอล : พิริดีน : น้ำ อัตราส่วน 60 : 40 : 20 และ ระบบที่ 6 : เมทานอล : คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 50:50 โดยศึกษาระบบที่ใช้ตรวจสอบจุดบนโครมาโทแกรม 4 วิธี แล้วนำมาหาปริมาณโดยเน้นน้ำตาลทรีฮาโลส ทั้งนี้ได้ ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส ได้แก่ สภาวะการเก็บรักษา โดยศึกษาการเก็บรักษาในตู้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิห้อง ผลการแปรรูปเห็ดฟางด้วยการดองด้วยน้ำ เกลือเข้มข้นร้อยละ 20 การดองด้วยน้ำส้มสายชู การดองด้วยเอทานอล สุดท้ายได้ศึกษาหาแนวทางในการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางตกเกรด ผลการทดลองศึกษาทางคุณภาพวิเคราะห์พบว่า ระบบที่ 6 ซึ่งใช้ สารละลายผสมของเมทานอล: คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 50 ต่อ 50 และตรวจสอบจุดด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 จัดเป็นวิธีที่เหมาะสม ผลการทดลองตรวจสอบชนิดน้ำตาลในเห็ดฟาง พบว่า มีน้ำตาลทรีฮาโลส ที่สามารถตรวจสอบได้ชัดเจน สำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจะใช้เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรีโดยใช้รีเอเจนต์แอนโทรนในการทำปฏิกิริยากับน้ำตาลเกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เมื่อนำวิธีนี้ไปตรวจสอบผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟางสด และเห็ดฟางที่เก็บสภาวะต่าง ๆ พบว่า การเก็บเห็ดในตู้เย็นจะทำให้เห็ดฟางแสดงน้ำตาลทรีฮาโลสสูงสุดในวันแรกของการเก็บตรวจพบประมาณ 89.92 ± 0.14มิลลิกรัม /100 กรัมเห็ดตัวอย่างสด ต่อจากนั้นปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสมีปริมาณลดลง ผลการตรวจปัจจัยการแปรรูปเห็ดฟางโดยการดอง พบว่า การดองด้วยน้ำเกลือ และดองด้วยน้ำส้มสายชู สามารถตรวจสอบพบน้ำตาลทรีฮาโลสได้ชัดเจน และเมื่อนำไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลพบว่า เห็ดฟางที่ดองด้วยน้ำส้มสายชูจะมีปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสสูงสุดที่ระยะเวลาการหมักนาน 2 วัน จะมีน้ำตาลทรีฮาโลส 22.40±0.36 มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ดฟางสด สุดท้ายผลการศึกษาหาวิธีการแยกน้ำตาลจากเห็ดฟางตกเกรด ได้ทดลองแยกน้ำตาลด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography ก่อนที่จะนำไปตรวจหาปริมาณน้ำตาลตัวอย่างผลการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟาง แปรรูปด้วยการดองด้วยน้ำส้มสายชู จะได้สารสกัดหยาบของน้ำตาลทรีฮาโลสประมาณ สกัดหยาบประมาณ 0.01 % โดยน้ำหนัก ดังนั้นการวิจัยชุดนี้ได้พิสูจน์ว่าเห็ดฟางตกเกรดควรจะนำไปเตรียมเป็นน้ำตาลที่มีมูลค่าสูงดังเช่นน้ำตาลทรีฮาโลสได้

Abstract

Straw mushroom is one type of popular edible mushroom.However, the dark colour and damage shape of straw mushroom which was known as straw mushroom falled grade cause the harder ability to sold out.The aim of this work was to qualitative study for determination the sugar type in mushroom.The separations were studied in 6 mobile phase systems such as : system 1: acetonitrile : water = 70 :30 , system 2 : n-butanol : ethanol : water = 50 :30:20, system 3: ethyl acetate: acetic acid: methanol : water= 60:15:15:10,system 4 n-propanol :ammonia: water = 50:30:20, system 5 : n-butanol : pyridine : water= 60:40:20 and system 6 : methanol : chloroform =50:50.The four detection methods were also studied.The content of sugar especially trehalose sugar was analysed.The factors that effect on trehalose sugar content changing by storage condition at room temperature and in refrigerator, the fermentation of straw mushroom in 20% sodium chloride solution, acetic acid and ethanol were also studied too.Finally, the separation method in trehalose sugar preparation from straw mushroom falled grade was trial studied.The qualitative study showed the system 6 which was the mixture solvent of methanol : chloroform = 50:50 and using 20 % sulfuric acid as detection solvent to detect the spot on the chromatogram were the optimum condition in this analysis.The trehalose sugar was detected in fresh straw mushroom.The ultraviolet visible spectrometry by the reaction between sugar and anthrone reagent to form colour complex substance which absorbed the visible light at 620 nm was applied to quantitative analysis trehalose sugar content in fresh straw mushroom and all processed mushroom.The result showed that the storage mushroom in refrigerator contained the highest trehalose sugar content at the first day of storage approximately 89.92 ± 0.14 mg/100 g of fresh straw mushroom then trended to decrease.The fermented straw mushroom in acetic acid also showed the maximum trehalose sugar content at 2 days of fermentation approximately 22.40 ± 0.36 mg/100 g of fresh straw mushroom. Finally , the separation method to separate trehalose sugar from straw mushroom falled grade should be treated by preparative thin layer chromatography before content analysis.From this experiment, extracted trehalose sugar from straw mushroom in acetic acid medium gave the crude extracted 0.01 % by weight. This research proved that straw mushroom falled grade could be prepared value added product as trehalose sugar.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตรที่ได้อนุมัติเงินทุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555 เป็นเงินทุนอุดหนุนการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้จนทำให้ผู้วิจัยมีปัจจัยหลักทางทุนทรัพย์ที่ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ ทางเคมี ขอขอบคุณผู้ที่เกี่ยวข้องในการวิจัยนี้ทุกท่านที่มีส่วนช่วยผลักดันให้สามารถดำเนินการวิจัยได้สำเร็จอย่างดี

รศ.ดร.พรพิมล ม่วงไทย

ผู้วิจัย

มิถุนายน 2556

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ก

ABSTRACT.....ข

ประกาศคุณูปการ.....ค

สารบัญ.....ง

บัญชีรูป .....จ

บัญชีรูปภาคผนวก .....ฉ

บัญชีตาราง .... ช

บทที่ 1...บทนำ.....1

บทที่ 2...เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

บทที่ 3...วิธีดำเนินการวิจัย.....15

สารเคมีตัวอย่าง..... 15

อุปกรณ์ เครื่องมือ..... 16

สารตัวอย่าง..... 16

วิธีทดลอง.....16

บทที่ 4...ผลการทดลอง 24

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 39

บรรณานุกรม.....47

ภาคผนวก.....53

ประวัติย่อหัวหน้าโครงการ.....57

บัญชีรูป

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างน้ำตาลทรีฮาโลส 9

ภาพประกอบ 2 โครงสร้าง9(10*H*)-Anthracenone 13

ภาพประกอบ 3 กลไกการสูญเสียน้ำจากโมเลกุลน้ำตาล 14

ภาพประกอบ 4 การทดลองทินแลร์แบบ preparative 22

ภาพประกอบ 5 ทินแลร์โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน 25

ภาพประกอบ 6 ทินแลร์โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานและ สารสกัดจากเห็ดฟาง 27

ภาพประกอบ 7 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส 28

ภาพประกอบ 8 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บที่ อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน 30

ภาพประกอบ 9 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บใน ตู้เย็นนาน 3 วัน 32

ภาพประกอบ 10 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟางที่เก็บที่สภาวะต่างกัน 34

ภาพประกอบ 11 น้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟางแปรรูป 35

ภาพประกอบ 12 ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวอย่างเห็ดฟางแปรรูป 36

บัญชีตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่า R_f ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน 4 ชนิด	26
2	ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บที่อุณหภูมิห้องตามระยะเวลาต่าง ๆ	31
3	ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บที่เย็นตามระยะเวลาต่าง ๆ	33

บทที่1

บทนำ

เห็ดฟางเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการปรุงอาหารหลายชนิด และมีจำหน่ายทั่วๆไป จึงสามารถหาได้ง่าย ราคาไม่สูงเท่าเห็ดที่ได้รับความนิยมมากๆ เช่น เห็ดหอม เห็ดโคน เห็ดออรินจิ เห็ดโคนญี่ปุ่น เห็ดหลินจือ ทั้งนี้เพราะมีผู้ประกอบการหลาย รายที่ตั้งเรือนเพาะเห็ดฟางจำหน่าย ซึ่งปรากฏว่า มีฟาร์มเพาะเห็ดฟางมากมาย แต่อย่างไรก็ตามเห็ดฟางเป็นเห็ดที่บอบบาง ตัวดอกค่อนข้างอ่อนนุ่มผิวบางไม่หนาเท่าเห็ดอื่นๆที่กล่าวมา จึงทำให้อายุการเก็บรักษาไม่นานก็มีลักษณะดำคล้ำลง ทำให้ราคาตกหรืออาจต้องนำไปทิ้ง เนื่องจากไม่น่าบริโภค เห็ดฟางยังไม่สามารถเก็บได้แบบแห้งหรือทำการถนอมเห็ดไว้ในรูปเห็ดแห้ง เช่นเดียวกับเห็ดหอม เห็ดหูหนู เห็ดหลินจือ นอกจากนี้เห็ดฟางยังไม่พบว่ามีการแปรรูปเห็ดฟางไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ดังนั้นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรบางรายสำหรับกรณีที่จัดส่งเห็ดฟางล่าช้า หรือเก็บเห็ดฟางจากโรงเรือนช้าไป ตลอดจนการขนส่งที่ล่าช้า จะทำให้ เห็ดฟางมีสีดำคล้ำ ไม่สามารถเก็บได้นาน และมี ราคาตก อาจจะไม่สามารถจำหน่ายได้ ส่งผลต่อ ภาวะเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้เพาะเห็ดฟาง

ตามปกติในเห็ดทั่วๆไปจะอุดมด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และปราศจากไขมัน สำหรับผลการค้นคว้าศึกษาพบว่าในเห็ดทั่วๆไปมีน้ำตาลที่น่าสนใจชนิดหนึ่งอยู่ในเห็ด คือ น้ำตาลทรีฮาโลส น้ำตาลทรีฮาโลสมีคุณสมบัติทั่วไปที่เป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโครส เป็นน้ำตาลที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จึงเป็นสารที่มีความคงตัว ดังนั้นน้ำตาลทรีฮาโลสจึงถูกนำไปใช้เป็นสารคงตัว (stabilizer) สำหรับเอนไซม์ โปรตีน มวลชีวภาพ ใช้การเตรียมเวชภัณฑ์ และการเก็บรักษาอวัยวะที่ใช้ในการปลูกถ่าย ใช้เป็นสารรักษาความชื้น (moisturizer) ในเครื่องสำอางเป็นต้น ปัจจุบันน้ำตาลทรีฮาโลสได้รับการยอมรับแล้วจากข้อกำหนดของทางยุโรปและสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาว่า น้ำตาลทรีฮาโลสสามารถใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร (food ingredient) ได้อย่าง

ปลอดภัย (Insel *et al*., 2010) น้ำตาลทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลที่มีประโยชน์มาก มีการค้นพบมานานระยะช่วง 10 กว่าปีแล้ว ซึ่งมีรายงานพบในพืชผัก ผลไม้ โดยเฉพาะมีรายงานพบน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ด ซึ่งผู้วิจัยเคยได้ทำการศึกษาหาปริมาณในเห็ดหลายชนิด ก็พบว่าสามารถตรวจพบน้ำตาลชนิดนี้ สอดคล้องกับรายงานวิจัยของนักวิจัยท่านอื่นๆ ดังนั้นจากข้อมูลที่เห็ดฟางเป็นเห็ดที่ได้รับความนิยมในก ารนำไปประกอบอาหารหลายชนิด แต่เห็ดฟางมีอายุการเก็บค่อนข้างสั้น มีจำหน่ายแต่ในรูปเห็ดสด จึงทำให้เกษตรกรผู้จำหน่ายเดือดร้อนเวลาที่มีผลผลิตมากจัดจำหน่ายราคาตก และถ้าเหลือจำหน่ายไม่หมดก็ต้องทิ้งไป เนื่องจากสภาพเห็ดดำคล้ำไม่น่าบริโภค จากผลการเคยตรวจสอบหาน้ำตาลหา ยากชนิดทรีฮาโลสในเห็ด และจากคุณสมบัติที่น่าสนใจของน้ำตาลทรีฮาโลสด้วยจึงเป็นเหตุผลให้ นักวิจัยมีแนวคิดที่จะศึกษาหาแนวทางการเตรียมน้ำตาลสุขภาพจากเห็ดฟางที่ตกเกรดแล้วเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่เห็ดฟางที่ไม่สามารถจัดจำหน่ายได้อีกจึงคาดว่าน่าจะนำเห็ดฟางตกเกรดมาศึกษาหาแนวทางที่จะสกัดเป็นน้ำตาลทรีฮาโลสซึ่งมีราคาสูงกว่าการจำหน่ายเป็นเห็ดสดธรรมดา

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

โครงการงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1. ศึกษาทางคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี ในการวิเคราะห์หาประเภทของน้ำตาลในเห็ดฟางสดใหม่ และเห็ดฟางตกเกรด
2. ศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการหาปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟาง
3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลส ได้แก่
    3.1 ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษา
    3.2 วิธีการแปรรูปเห็ดตกเกรด
4. ประเมินความเป็นไปได้ในการเตรียมน้ำตาลให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นประโยชน์ต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ทำการทดลองในเห็ดฟางสด เห็ดฟางตกเกรดทั้งตัวโครงสร้างเห็ดฟาง
2. การศึกษาทางคุณภาพวิเคราะห์ทำโดยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี
3. ศึกษาหาปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลสทำโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือวิธีอื่นที่เหมาะสม
4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของน้ำตาล ได้แก่
   - 4.1 ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเห็ดฟางสด
     - 4.1.1ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0,1,2,3 วัน
     - 4.12..เก็บในตู้เย็นช่องแช่เย็นธรรมดาเป็นระยะเวลา 0,1,2,3 วัน
   - 4.2 วิธีการแปรรูปเห็ดตกเกรด ได้แก่ การแช่ น้ำเกลือ การดอง การต้ม การแช่แอลกอฮอลล์
5. ศึกษาหาวิธีการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากผลการทดลองในข้อ 4 โดยใช้ตัวอย่างเห็ดฟางที่แปรรูปที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสมากที่สุดโดยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟีแบบpreparative

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เห็ดเป็นฟังไจชั้นสูงที่มีขนาดใหญ่ โดยเห็ดมี หน้าที่หลักคือช่วยย่อยสลายซากพืชและสัตว์ให้ผุพัง ในโครงสร้างของเห็ดจะมีดอกเห็ด ลักษณะของดอกเห็ดทั่วไปจะ มีรูปร่างคล้าย ร่ม มีหลายขนาด ตั้งแต่เท่าเล็กมากประมาณหัวเข็มหมุด ถึง ขนาดใหญ่เทียบเคียงเท่ากับจาน นอกจากนี้ยังมีลำต้นของเห็ดอีกด้วย เห็ดมีหลายชนิด ถ้าจัดแบ่งตามการใช้บริโภค ก็จัดแบ่งเป็ น โดยมีทั้งเห็ดที่ สามารถรับประทานได้ (edible mushroom) และเห็ดที่ไม่สามารถนำมาบริโภคได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเห็ดมีพิษ (toxic mushroom) โดยเห็ดที่รู้จักกันทั่วไป ที่สามารถนำมารับประทานได้ เช่น เห็ดนางฟ้า เห็ดโคน เห็ดเผาะ เห็ดฟาง เห็ดลม เห็ดหูหนู นอกจากนี้ยังมีเห็ดบางชนิดที่จัดว่ามีสรรพคุณด้านยา จะเรียกว่า medicinal mushroom ที่รู้จักกันดี คือ เห็ดหอม เห็ดหลินจือ

การบริโภคเห็ดเป็นที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน ซึ่งแต่เดิมการบริโภคในเขตต่างๆของโลกจะแตกต่างกันไป เช่น ในประเทศจีนและญี่ปุ่น นิยมนำมาเตรียมเป็นน้ำแกง น้ำชา ยาบำรุงร่ างกาย แต่ประเทศในโซนยุโรปมักนิยมนำไปปรุงเป็นซุป ส่วนในประเทศไทยมีการนำมาผสมในแกงต่าง ๆ รวมถึงต้มยำ และบางชนิดก็นำมาต้มจิ้มน้ำพริกอีกด้วย มีการจำหน่ายเห็ดเพื่อการบริโภค จึงมีธุรกิจทำฟาร์มเห็ด หรือการเพาะเห็ดเพื่อจำหน่ายเห็ดสด รวมทั้งแปรรูปเห็ด เช่น เห็ดก ระป๋อง จากความนิยมในการรับประทานเห็ดมีมากขึ้นเรื่อยๆ ด้วยรูปแบบและรสชาติเฉพาะตัวที่แตกต่างจากอาหารประเภทพืชผักและเนื้อสัตว์ รวมทั้งการที่คนนิยมรับประทานมังสวิรัติกันมากขึ้น ทำให้เห็ดถูกนำมาใช้ปรุงอาหารแทนเนื้อสัตว์มากขึ้นตามไปด้วย เพราะมีคุณสมบัติที่ให้สา รอาหารที่สำคัญ (Barros.,et al.,2007)(Manzi, P., et al.,2001).

นอกจากเราจะรับประทานเห็ดเป็นอาหารแล้ว เห็ดยังมีสรรพคุณทางยา (Lindequist, U., et al.,2005). โดยมีรายงานผลการวิจัยที่ยืนยันว่าเห็ดมีคุณสมบัติป้องกันโรคได้ โดยในเห็ดมีสาร สำคัญที่

ช่วยกระตุ้นการทำง านของระบบภูมิคุ้มกัน (Garcia -Lafuente, A.,et al.,2010) ช่วยป้องกันการติดเชื้อ (Barros.,et al.,2007) ต้านการเกิดเนื้องอก (Chen, J. N., et al.,2009). ต้านแบคทีเรีย และไวรัส (Faccin .,et al.,2007) และลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดหัวใจ (Guillamon, E, et al. (2010). และช่วยในการต้านมะเร็งหลายๆ ชนิดด้วย (Chang &Miles, 2004;Regula &Siwulski, 2007.)

สรรพคุณที่น่าสนใจดังกล่าว พบในเห็ดต่างๆหลายชนิด เช่น

เห็ดเผาะ เป็นเห็ดที่มีรสเย็น หวาน โดยมากให้เป็นอาหารบำรุงร่างกาย ช่วยความสึกหรอในร่างกายที่ชำรุดไปให้เป็นปกติ และกระจายโลหิต เป็นธาตุโปรตีนที่ดี อาจเป็นเพราะคุณสมบัติเหล่านี้เห็ดเผาะจึงเป็นเห็ดที่ได้รับความนิยมมากและมีราคาแพง

เห็ดตับเต่า หรือเห็ดผึ้ง เห็ดตับเต่าขนมปังกะโหลก เป็นเห็ดที่มีกรดอะมิโนที่สำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ isoleucien, leucine, lysine เป็นต้น ช่วยบำ รุงสุขภาพ บำบัดอาการปวดหลัง ปวดข้อ ปวดเส้นเอ็นและกระดูก ป้องกันการชักกระตุก คนจีนใช้เป็นสมุนไพร แก้เคล็ดคัดยอก ปวดกระดูก เห็ดข่า เป็นเห็ดที่มีรสเผ็ดขม สรรพคุณใช้แก้อาการปวดหลัง ปวดหลัง ปวดขา บำรุงเส้นเอ็น กระดูก และป้องกันการชักกระตุก

เห็ดหลินจือ เห็ดช นิดนี้มีกรดอะมิโน หลายชนิด steroid, triterpene, alkaloids, glucoside, ไขมัน อิออนของเหล็กและโพแทสเซียม น้ำมันหอมระเหย วิตามินบี 2 และวิตามินซี เป็นยาสมุนไพรรักษาโรค มีการเพาะเลี้ยงพัฒนาสกัดเป็นยาสมุนไพรหลายรูปแบบ ช่วยลดระดับไขมันในเส้นเลือด ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจบางชนิด เม็ดเลือดขาวต่ำ หวัดเรื้อรัง หลอดลมอักเสบ หืดหอบ เป็นต้น

สำหรับเห็ดฟาง เป็นเห็ดที่ใช้บริโภคจัดเป็นประเภทเห็ดสามัญที่สามารถบริโภคได้ ชนิดหนึ่ง เห็ดฟางเป็นเห็ดยอดนิยมของคนไทย ชนิดหนึ่งซึ่งนิยมเพาะกันบนกองฟางข้าวชื้นๆ โคนมีสีขาว ส่วนหมวกสีน้ำตาลอมเทา หาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาดตลอดทั้งปี สมัยก่อนคนไทยมักจะเรียกเห็ดฟางว่า เห็ดบัว เห็ดฟางมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Volvariella volvacea* มีชื่อสามัญ Straw mushroom หรือ

Chinese Mushroom เนื่องจากสามารถเพาะได้โดยใช้ฟางข้าว ปลูกมากในเขตจีน ฟิลิปปินส์ และแถบโซนเอเชีย ใช้เวลาเพาะจากสปอร์เป็นเวลานาน 4 - 5 วัน(Hsiung, Deh-Ta (2006). ในปัจจุบันมีผู้ทำการวิจัยเพาะเห็ดฟางนี้บนใบกล้วยได้สำเร็จ(Belewu, M. A.* and Belewu, K.Y.,2005) เห็ดฟางยังมีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพเช่นเดียวกับเห็ดอื่นๆ โดยเฉพาะมีรายงานว่าสารสกัดจ ากเห็ดฟางช่วยป้องกันโรคหัวใจ (Chiu.K.W .,etal,1995)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดฟางเป็นเห็ดที่มีลักษณะดอกโตปานกลาง สีของเปลือกหุ้มรวมทั้งหมวกดอก มีสีขาวเทาอ่อนไปจนถึงดำขึ้นอยู่ กับสายพันธุ์ และสภาพแวดล้อม เส้นผ่าศูนย์ กลางของหมวกเมื่อโตเต็มที่ ประมาณ 4-12 ซม. หลังจากดอกเห็ดพัฒนาจากเส้นใยชั้น 2 มารวมกัน มีสภาพการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานเป็นระยะ ได้แก่

ระยะที่ 1 ระยะเริ่มแรกจากการเกิดดอก หรือระยะเข็มหมุด (pinhead stage) หลังการโรยเชื้อเห็ดแล้ว 5-7 วัน เส้นใยจะมารวมตัวกันเป็นจุดสีขาว มีขนาดเล็ก (ที่อุณหภูมิประมาณ(28°-32°ซ)

ระยะที่ 2 ระยะดอกเห็ดเป็นกระดุมเล็ก (tiny button stage) หลังจากระยะแรก 15-30 ซม. หรือ1 วัน ดอกเห็ดเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เป็นรูปดอกเห็ดลักษณะกลมยกตัวขึ้นจากวัสดุเพาะ

ระยะที่ 3 ระยะกระดุม (button stage) หลังจากระยะ 2 ประมาณ 12-20 ซม. หรือ1 วันทางด้านฐานโตกว่าส่วนปลายแต่ยังมีลักษณะกลมรีอยู่ภายในมีการแบ่งตัวเป็น ก้านดอกและครีบดอก

ระยะที่ 4 ระยะรูปไข่ หรือระยะดอกตูม (egg stage) เป็นระยะต่อเนื่องจากระยะที่ 3 หากมีอุณหภูมิสูงกว่า 32 °ซ จะใช้เวลาเพียง 8-12 ซม. ดอกเห็ดเริ่มมีการเจริญเติบโตทางความยาวของก้านดอกและความกว้างของหมวกดอก เปลือกหุ้มดอกบางลง และเรียวยาวขึ้นคล้ายรูปไข่ ส่วนมากจะมีการเก็บเกี่ยวในระยะนี้ เพราะเป็นระยะที่ให้น้ำหนักสูงสุด และเป็นลักษณะที่ผู้บริโภคนิยมรับประทานมากที่สุด รวมทั้งเป็นขนาดที่โรงงานแปรรูป (บรรจุกระป๋อง) ต้องการ

ระยะที่ 5 ระยะยืดตัว (elongation stage) หลังระยะที่ 4 เพียง 3-4 ซม. การเจริญเติบโตของก้านและหมวกดอกเป็นไปอย่างรวดเร็ว ส่วนบนสุดของเปลือกหุ้มดอกแตกออกอย่างไม่ เป็นระเบียบ (irregular) สีของผิวหมวกดอกมีสีเข้มขึ้น แต่ก้านและครีบจะเป็นสีขาวหลังระยะนี้เป็น

ระยะที่ 6 หรือ ระยะแก่ (mature stage) ดอกจะบานเต็มที่ มีสปอร์ ที่ครีบเป็นจำนวนมาก

รูปร่างของเห็ดฟาง (Structure of straw mushroom)

เห็ดฟางประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. หมวกดอก (cap หรือ pileus) มีลักษณะคล้ายร่มสีเทาค่อนข้างดำ โดยเฉพาะตรงกลางหมวกดอกจะมีสีเข้มกว่าบริเวณขอบหมวก ผิวเรียบมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 4-12 ซม. ขึ้นอยู่กับอาหารและสภาพแวดล้อม

2. ครีบ (gill) คือส่วนที่อยู่ใต้หมวกดอกเป็นแผ่นเล็กๆวางเรียงเป็นรัศมีรอบก้านดอก ดอกเห็ดที่โตเต็มที่จะมีครีบประมาณ300-400 ครีบ ห่างกัน 1 มม. หลังการปริแตกของดอกแล้ว 3-6 ซม. สีของครีบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนและเข้มในที่สุด

3. สปอร์ (basidiospore) คือส่วนที่ทำหน้าที่คล้ายเมล็ดพันธุ์ สปอร์ ของเห็ดฟางมีลักษณะเป็นรูปไข่ (egg shape) มีขนาดเล็กมาก คือมีความยาวประมาณ 7-8 ไมครอน และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 ไมครอน

4. ก้านดอก (stalk หรือ stipe) คือส่วนชูหมวกดอก เป็นตัวเชื่อมหมวกดอกกับส่วนโคนดอก และอยู่ตรงกลางหมวกดอกเห็ด มีการเรียงตัวของเส้นใยขนานไปกับลักษณะของก้านดอกที่เรียวตรงโดยส่วนฐานจะโตกว่าเล็กน้อย มีสีขาวรียบ ไม่มีวงแหวนหุ้ม ก้านดอกยาวประมาณ 4-14 ซม. และเสนผ่าศูนย์ กลางประมาณ 0.5-2 ซม.

5. เปลือกหุ้มโคน (volva) คือ ส่วนของเนื้อเยื่อนอกสุดของดอกเห็ดมีหน้าที่หุ้มดอกเห็ดไว้ทั้งหมด ในขณะที่การเจริญของหมวกและก้านดอกเห็ดเป็นไปอย่างรวดเร็ว แต่ส่วนเปลือกหุ้มเจริญช้าลง ทำให้ส่วนบนสุดปริแตกออก เมื่อดอกเห็ดดันเยื่อหุ้มออกมา เนื้อเยื่อจะเหลือติดที่โคนดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายถ้วยรองรับโคน

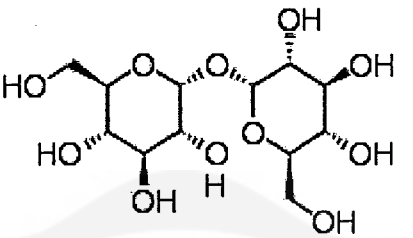
เห็ดฟางให้วิตามินซีสูง และมีกรดอะมิโนสำคัญอยู่หลายชนิด ช่วยป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟัน โรคเหงือก และลดอาการผื่นคันต่างๆ เห็ดฟางยังมีคุณค่าทางอาหารของเห็ดฟาง ตามผลการวิเคราะห์โดยกรมวิชาการเกษตร (ดำเกิง ป้องพาล)ดังนี้

<u>คุณค่าทางอาหาร</u>	<u>เปอร์เซ็นต์ (%)</u>
ความชื้น	88.4
โปรตีน	33.1 (ของน้ำหนักแห้ง)
ไขมัน	6.4 (ของน้ำหนักแห้ง)
คาร์โบไฮเดรต	60.0 (ของน้ำหนักแห้ง)
เยื่อใย	11.9 (ของน้ำหนักแห้ง)
เถ้า	12.6 (ของน้ำหนักแห้ง)
พลังงาน	338 กิโลแคลลอรี่

โดยรวมพบว่าคาร์โบไฮเดรตในเห็ดมีประมาณ 60.0% จึงจัดว่าเห็ดฟางเป็นเห็ดที่มีความหวานมากระดับหนึ่ง จากข้อมูลนี้ทำให้ผู้วิจัยให้ความสนใจจะเตรียมน้ำตาลจากเห็ดฟาง จึงขอกล่าวถึงน้ำตาลที่สนใจในที่นี้ คือน้ำตาลทรีฮาโลส

น้ำตาลทรีฮาโลส

น้ำตาลทรีฮาโลส เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ของน้ำตาลกลูโคส 2 หน่วย ที่ต่อกันด้วยพันธะ alpha-linked คือ α, α-1, 1-glucoside bond มีสูตรโครงสร้างของน้ำตาลดังภาพประกอบที่ 1.



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างน้ำตาลทรีฮาโลส

ที่มา : Kidd และ Devorak, 1994

น้ำตาลทรีฮาโลสมีชื่อที่เรียกทางวิทยาศาสตร์คือ α-D-glucopyranosyl α-D-glucopyranoside (α,α-Trehalose)

คุณสมบัติที่สำคัญ คือ

สูตรโมเลกุล : $C_{12}H_{22}O_{11}$ (anhydride)

มวลโมเลกุล : 342.296 g/mol (anhydrous), 378.33 g/mol (dihydrate)

จุดหลอมเหลว : 203°C (anhydrous), 97°C (dehydrate)

ความสามารถในการละลาย ในน้ำ : 68.9 กรัมในน้ำ 100 กรัม ที่ 20°C ละลายได้ในเอทานอล แต่ไม่ละลายในไดเอทิลอีเทอร์ และ เบนซีน

น้ำตาลนี้ถูกค้นพบครั้งแรกในข้าวไรท์ที่มีเชื้อราในปี 1832 โดย Wiggers ต่อมาในปี 1859 Berthelot ได้แยกจาก trehalose manna โดยมี substance จากด้วง แล้วตั้งชื่อน้ำตาลนี้ว่า น้ำตาลทรีฮาโลส โดยน้ำตาลชนิดนี้จะสังเคราะห์ได้จากเชื้อรา พืช และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งจะเกี่ยวข้อง

กับ anhydrobiosis จะทำให้พืช และสัตว์สามารถทนได้ในสภาวะที่แห้งได้ในช่วงระยะเวลานานได้ โดยคุณสมบัติเหล่านี้จะนำน้ำตาลชนิดนี้ไปใช้กับอาหาร และเครื่องสำอาง ทำให้สามารถเก็บน้ำได้ โดยจะ form ตัวเป็นเจลป้องกันไม่ให้เซลล์ภายในของพืช และสัตว์ถูกทำลาย และน้ำตาลชนิดนี้ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Westh และ Ramlov, 1991) ในปัจจุบันน้ำตาลนี้ได้รับการยอมรับให้เป็นสารเติมแต่งในอาหารโดยสมาคมยุโรป อเมริกา (Kidd และ Devorak, 1994) ทรีฮาโลสเป็นน้ำตาลที่ทนต่อการ hydrolysis ด้วยกร ด และ เสถียรที่อุณหภูมิสูง (ภายใต้สภาวะกรด) แต่จะสามารถแตกออกโดยเอนไซม์ทรีฮาเลส(trehalase)

น้ำตาลนี้มีความหวานเพียง 45% ของน้ำตาลซูโครส ละลายได้น้อยกว่าซูโครส (ยกเว้นที่อุณหภูมิ 80°C) (Roser,1991) มีลักษณะเป็นผลึกขาว-ใส สี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน เมื่อได้รับความร้อนจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล น้ำตาลนี้จึงมีประโยชน์ในหลายๆอุตสาหกรรม เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง โดยใช้ชุบอาหารทะเล แช่แข็งเพื่อรักษาผิวเซลล์ของอาหารเพื่อการส่งออก (Paiva และ Panek, 1996) เพราะน้ำตาลทรีฮาโลสช่วยถนอมผิวเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหาย (Kidd และ Devorak, 1994)(Roserและ Caloco,1993) เพราะมีรายงานว่าน้ำตาลนี้ช่วยจับกับโปรตีนให้คงตัวได้ (Arakawa และ Timasheff, 1982) นอกจากนี้น้ำตาลทรีฮาโลสยังช่วยเพิ่มความคงตัวของไลโปโซมในเครื่องสำอาง(Patist และ Zoerb,2005)

เนื่องจากน้ำตาลทรีฮาโลสมีประโยชน์มากในระยะแรกที่มีการค้นพบต้องทำการแยกผลผลิตน้ำตาลทรีฮาโลสจากยีสต์ แต่ก็ได้ผลน้อย(Cabib และ Leloir, 1957) ปัจจุบันได้มีการศึกษากรรมวิธีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในปี 1994 (Higashiyama,2002) ซึ่งผลิตโดยใช้แป้งเป็นสารตั้งต้น โดยการใช้เอนไซม์ไอโซเมอร์เรส (isomerase). อย่างไรก็ตามก็ยังไม่พบรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมน้ำตาลนี้จากเห็ดฟาง โดยเฉพาะเห็ดฟางที่ตกเกรดไม่สามารถจำหน่ายได้อีก

ในการวิจัยนี้จะได้ทดลองโดยใช้เทคนิคสำคัญๆ ได้แก่ การแยกสารด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี และการ วิเคราะห์ปริมาณสารด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี จึงขอกล่าวถึงหลักการทดลองที่นำมาใช้วิจัยนี้พอสังเขป

เทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography)

การแยกสารโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีประเภทนี้เป็นโครมาโทกราฟีแบบระนาบ เนื่องจากก ารแยกสารที่สนใจจะเกิดขึ้นบนแผ่นระนาบที่มีสารวัฏภาคอยู่นิ่งกับที่ถูกเคลือบอยู่บนผิวแผ่นระนาบซึ่งอาจเป็นแผ่นแก้ว แผ่นพลาสติก ปัจจุบันที่มีจำหน่ายเป็นแผ่นสำเร็จรูปจะเป็นแผ่นอะลูมิเนียม ดังนั้นเมื่อสารตัวอย่างถูกหยดไว้บนสารวัฏภาคอยู่นิ่งกับที่ จะเกิดการแยกเมื่ อมีสารวัฏภาคเคลื่อนที่ได้เคลื่อนที่ผ่านมาที่ตำแหน่งสารที่จะแยก กลไกการแยกสารจะอาศัยการดูดซับบนวัฏภาคอยู่นิ่งกับที่ หรือ การละลายระหว่างสารที่เป็นวัฏภาคอยู่นิ่ง กับวัฏภาคเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน หรือ การกระจายตัวของสารที่จะแยกในสารตัวอย่างระหว่างวัฏภาคอยู่นิ่งกับวัฏภาคเคลื่อนที่แตกต่างกัน จึงจะสามารถแยกสารต่างๆ ออกจากกันได้ ผลจากการแยกที่เกิดขึ้นจะแสดงด้วยค่า R_f ซึ่งคำนวณได้จากสูตรตามสมการที่ 1)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ได้}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ได้}} \quad \text{.....1)}$$

ในการแยกน้ำตาลนั้นสามารถกระทำได้ด้วยการใช้เทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี โดยนิยมใช้สารดูดซับเป็นซิลิกาเจล(Harry W. Lewis และ Christopher J. Moody , 1989)(Baron, D.N. และ Economidis,J.(1963) ซิลิกาจัดเป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นเมื่อสารที่จะวิเคราะห์มีขั้วมากก็ยิ่งจะจับได้ดีกับซิลิกาทำให้เกิดการเคลื่อนที่ได้น้อย ด้วยเหตุนี้เองสารที่มีขั้วมากจึงแสดงจุดบนโครมาโทแกรมอยู่ใกล้กับแนวเริ่มต้น น้ำตาลเป็นสารประกอบที่มีหมู่ไฮดรอกซิลหลายหมู่ จึงจัดว่าเป็นสารมีขั้ว ละลายได้ดีในน้ำซึ่งเป็นสารมีขั้ว จึงเหมาะสมที่จะนำมาทดลองแยกด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี (Sherma,J. และ Fried, B.,2003) เนื่องจากน้ำตาลที่จะนำมาทดลองในการวิจัยนี้เป็นน้ำตาลชนิดโมเลกุลเดี่ยว และ

โมเลกุลคู่ ซึ่งมีความเป็นขั้วแตกต่างกัน ดังนั้น สมควรที่จะแยกออกจากกันได้ ทั้งนี้มีเอกสารการวิจัยการแยกน้ำตาลในตัวอย่างชีววัตถุ (Baron, D.N. และ Economidis,J., 1963)

อย่างไรก็ตามในการแยกสารตัวอย่างด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟีจะ ประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใดขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย การถูกดูดซับความมีขั้วของสาร รวมทั้งโครงสร้างทางเคมี ค่าต่าง ๆดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกันก็จะทำให้ ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เพราะจะเคลื่อนที่ไปพร้อมกันด้วยระยะเท่ากัน(Sherma,J. และ Fried, B.,2003)

เทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมทรี (UV-Visible Spectrophotometry)

ตามหลักการทั่วไป เมื่อรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเคลื่อนที่ผ่านสารตัวอย่าง จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ภายในโมเลกุลของสาร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นแก่สารจะมี ระดับแตกต่างกัน ถ้าพิจารณาใน โมเลกุลของสาร ทั่วไป พบว่า จะมีพลังงาน หลายระดับพลังงาน ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือมีพลังงานเฉพาะ เรียกว่า พลังงานควอนไทส์(quantize) ดังนั้นการดูดกลืนแสงของสารจะเกิดการเปลี่ยนสถานะของระดับพลังงานในโมเลกุลสารมากน้อยเพียงใดขึ้นกับพลังงานที่ส ารตัวอย่างดูดกลืนเข้าไป มีความเฉพาะพอเหมาะกับการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานก็จะเกิดการเปลี่ยนระดับพลังงานหรือที่เรียกว่าเกิดการทรานซิชัน เมื่อพิจารณาที่ระดับพลังงานของรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งมีหลายช่วงคลื่น และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามระดับพลังงาน หรือ ระ ดับความยาวคลื่น ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้เป็นแสงในช่วงวิสิเบิลซึ่งเป็นช่วงแสงที่มองเห็นได้ มีความยาวคลื่นช่วง 300 – 800 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาสารตัวอย่างที่จะมีคุณสมบัติดูดกลืนแสงช่วงวิสิเบิลนี้ ต้องมีโครงสร้างที่มีหมู่โครโมฟอร์ เช่น วงเบนซีน สารที่มีพันธะคู่ต่อเนื่องแบบคอนจูเกต (conjugated double)

เมื่อแสงเคลื่อนที่ผ่านสารละลายตัวอย่างแสงบางส่วนจะถูกดูดกลืนไป พลังงานแสงส่วนที่ถูกดูดกลืนนี้ทำให้โมเลกุลเปลี่ยนระดับพลังงานจากสถานะพื้น (ground state) ไปยังสถานะกระตุ้น (excited state) ความเข้มแสงที่เหลือจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตัวอย่างเป็นไปตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) ตามสมการที่ (2)

$$A = \varepsilon bc \qquad \text{.....2)}$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance)

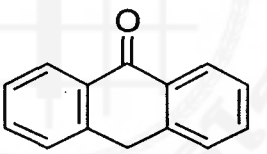
ε = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (absorption coefficient, L mol^{-1} cm^{-1})

b = ความกว้างของเซลล์ (pathlength, cm)

c = ความเข้มข้นของสารละลาย (M)

จากสมการ2)ตามกฎของเบียร์ จัดว่าเป็นประโยชน์มากในการหาความเข้มข้นของสารที่สามารถดูดกลืนแสงในตัวอย่างได้

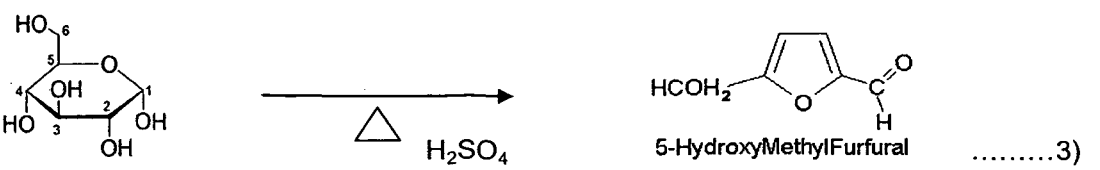
การทดลองนี้จะทำการตรวจหาปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิควิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมทรี ด้วยการทำให้น้ำตาลทำปฏิกิริยากับสารแอนโทรน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี แอนโทรนมีชื่อทางเคมีคือ 9(10*H*)-Anthracenone มีโครงสร้างตามภาพประกอบที่ 2



ภาพประกอบ 2 โครงสร้าง9(10*H*)-Anthracenone

ที่มา: www.sigmaaldrich.com

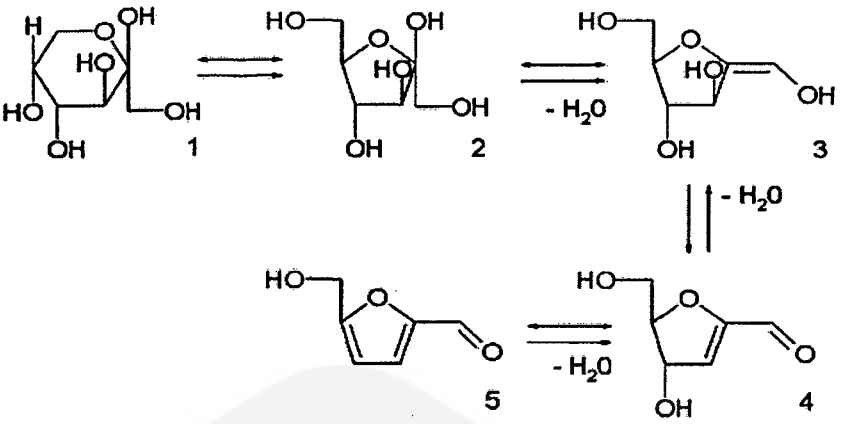
เนื่องจากน้ำตาลเป็นสารที่ไม่มีสีในตัวเองแต่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ แต่จะไม่ดูดกลืนแสงในช่วงวิสิเบิล ดังนั้นตามหลักการที่นำมาทดลองนี้น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบเฟอร์ฟิวราล ตามสมการที่ 3)



.....3)

กลูโคส 5-ไฮดรอกซีเฟอร์ฟิวราลดีไฮด์

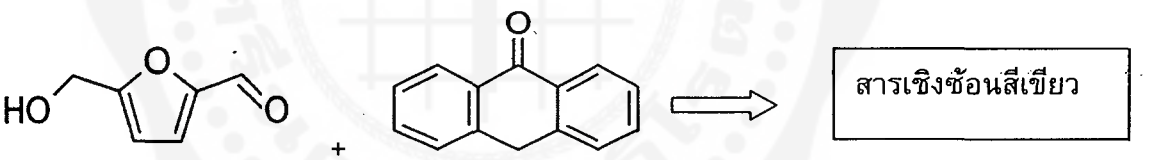
กลไกการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวข้องกับการสูญเสียโมเลกุลของน้ำในโมเลกุลของน้ำตาลตามภาพประกอบที่ 3)



ภาพประกอบ 3 กลไกการสูญเสียน้ำจากโมเลกุลน้ำตาล

ที่มา: Haibo Zhao,et al., (2007).

ซึ่งสารประกอบเฟอร์ฟิวรานี้เองจะทำปฏิกิริยากับแอนโทรน ตามสมการจะเกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีเขียว ตามสมการที่ 4)



.....4)

ผลจากการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนสีเขียวที่ความยาวคลื่นที่สารดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 620 นาโนเมตร นำค่าความสามารถในการดูดกลืนแส งสูงสุดไปเทียบกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลต่อไป

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (MEMMERT)

2. กระดาษกรอง (Filter papers (110 mm Ø), Whatman No.1,Cat No ; 1001 110)

3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius)

4. แผ่น TLC (Pre-coated TLC-sheets ALUGRAM (20x20 cm), MACHEREY-NAGLE, Lot ; 109251)

5 MICRO HAEMATOCRIT TUBES ,VITREX, REF ; 160231

6 . MICROCAPS (5.0µL), VERTICAL, Lot ; 135

7 . ภาชนะบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (Solvent tank, ALLTECH)

8 Hot plate

9 Solid Phase Extraction (Solid Phase Extraction (SPE) NH2 Tubes (200mg/3mL), VERTICAL, Lot ; 1794)

10. กระบอกฉีดยา (Syringe (5mL), NIPRO, Lot ; 12B21)

11. เครื่อง Vortex (Vortex, Scientific Industries)

12. เครื่อง centrifuge (centrifuge, Hettich EBA 8S, Ser.No. 169064)

13. ไมโครปิเปต MICRO PIPETTE (10-100µL), SOCOREX

14. ไมโครปิเปต MICRO PIPETTE (100-1000µL), SCILOGEX

15. UV-2450 PC, UV-VIS RECORDING SPECTROPHOTOMETER, SHIMADZU

16. QUARTZ CELL 10 mm STANDARD TYPE 1

17 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง Agilent HP1100 พร้อม หัววัดชนิดรีแฟรคทีฟอินเด็กซ์

18 คอลัมน์Lichrosorb amino NH_2

17 Dryer ยี่ห้อ Philip

สารเคมี

1. กลูโคสมาตรฐาน (D(+)-Glucose, Glu : SIGMA-ALDRICH)

2. ฟรุคโตสมาตรฐาน (D-(-)-Fructose, Fru : FLUKA Analytical)

3. ทรีฮาโลสมาตรฐาน (D-(+)-Trehalose, Tre : FLUKA,)

4. ซูโครสมาตรฐาน FLUKA Analytical,

5. แอนโทรน (Anthrone GR, LABORATORY REAGENTS&FINE CHEMICALS)

6. เอทานอล (Ethanol absolute, C_2H_5OH : CARLO ERBA)

7. เมทานอล (Methanol AR, CH_3OH : RCL Labscan)

8. คลอโรฟอร์ม (Chloroform AR,grade : LAB-SCAN)

9. กรดซัลฟิวริก (Grade AR, QReC,)

10.กรดอะซิติก (AR grade, Labscan)

11 แอมโมเนีย (AR grade ,CARLO ERBA)

12 นอร์มาล-บิวทานอล(AR grade, Labscan)

13 นอร์มาล-โพรพานอล (AR grade, CARLO ERBA)

14 เอทิลอะซิเตท(AR grade, Labscan)

15 พิริดีน (AR grade, Merck)

16 อะซีโตไนไตรด์(AR grade, Merck)

17 ซิลเวอร์ไนเตรท(AR grade, Merck)

18 3,5- ไดไนโตรซาลิไซเลต (3,5-dinitrosalicylate) (AR grade, Merck)

ตัวอย่างเห็ดฟาง

- เห็ดฟางตัวอย่างจัดซื้อจากตลาดคลองเตย จากตลาดลาดปลาเค้า กรุงเทพ
- เห็ดฟางตัวอย่างจัดซื้อจากตลาด 99 อ.วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา
- เห็ดฟางตัวอย่างจัดซื้อจากตลาดบน อ. เมือง จังหวัดนครปฐม
- เห็ดฟางตัวอย่างจากตลาดพนมสารคาม อ.พนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1การตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี

นำสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ทรีฮาโลส และซูโค รสมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำหลอดแคปิลารี MICROCAPS (5.0µL), VERTICAL มาดูดสารละลาย เพื่อนำไปหยดลงบนแผ่นเพลทซิลิกาสำเร็จรูป(pre-coated TLC-sheets ALUGRAM (20x20

cm), MACHEREY-NAGLE, Lot ; 109251) ที่ตัดไว้ขนาด 5 x 10 เซนติเมตร ใช้อุปกรณ์เป่าแห้งช่วยเป่าให้หยดที่เตรียมไว้แห้ง ก่อนที่จะนำแผ่นเพลทไปวางในแทงค์โครมาโทกราฟีที่บรรจุสารละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เตรียมไว้ รอให้เกิดการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายวัฏภาคเคลื่อนที่ถึงแนวที่ทำเครื่องหมายไว้จึงนำเพลทออกจากระบบ เป่าให้แห้งก่อน แล้วนำไปพ่นสารละลายที่ใช้ตรวจสอบตำแหน่งของสารที่แยกได้ เพื่อคำนวณหาค่า Rf

ในการทดลองตอนนี้ได้ทำการศึกษาระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้งหมด 6 ระบบ ได้แก่

ระบบที่ 1 : อะซีโตไนไตร์ (ACN) : น้ำ อัตราส่วน 70 : 30

ระบบที่ 2 : นอร์มาล- บิวทานอล : เอทานอล : น้ำ อัตราส่วน 50 : 30 : 20

ระบบที่ 3 : เอทิลอะซีเตท: กรดอะซิติก: เมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 60 : 15 : 15 : 10

ระบบที่ 4 : นอร์มาล- โพรพานอล : แอมโมเนีย : น้ำ อัตราส่วน 50 : 30 : 20

ระบบที่ 5 : นอร์มาล- บิวทานอล : พิรีดีน : น้ำ อัตราส่วน 60 : 40 : 20

ระบบที่ 6 : เมทานอล : คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 50:50

นอกจากนี้ในการทดสอบการมองเห็นจุดบนโครมาโทแกรมจะได้ใช้สารสเปรย์ 4 ชนิด ได้แก่

ชนิดที่ 1 สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20

ชนิดที่ 2 สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 ผสมเมทานอล อัตราส่วน 1 : 1

ชนิดที่ 3 สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 5

ชนิดที่ 4 สารละลาย 3,5- ไดไนโตรซาลิไซเลต

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองกับสารมาตรฐานน้ำตาล จึงนำสภาวะที่ดีที่สุด ดไปทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดฟางสด เห็ดฟางที่เก็บไว้ที่ระยะเวลา 1 – 3 วัน ที่ผ่านการสกัดด้วย 50%เอทานอล ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C

ตอนที่2. การทำปริมาณวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างเห็ด

ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในเห็ดจะได้ทำการศึกษาหาชนิดของน้ำตาลในเห็ดด้วยระบบการแยกด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟีที่เหมาะสม ภายหลังการสกัดแยกน้ำตาลจากเห็ดแล้วทดลองตามตอนที่ 1 เมื่อทราบชนิดน้ำตาลจึงนำไปหาปริมาณ

2.1 การหาปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี ใช้วิธีคัลเลอริเมตริก ตามวิธีของ Chaplin และ Kennedy(1986) ทดลองดังนี้

2.1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลทรีฮาโลส เข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 µg/L ความเข้มข้นละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติม สารละลายแอนโทรน (anthrone reagent) ที่แช่เย็นไว้ลงไป 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน (ขณะเติมและเขย่าต้องให้หลอดอยู่ในอ่างน้ำแข็งตลอดเวลา) แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็งจนทุกหลอดเย็นลงจนถึงประมาณ 0 องศาเซลเซียส นำหลอดไปแช่ในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นลงในอ่างน้ำแข็งอีกครั้ง นำไปบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปพลอต กราฟกับค่าความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานจะได้กราฟมาตรฐานของน้ำตาลทรีฮาโลส

2.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

นำตัวอย่างเห็ดที่จะวิเคราะห์ 10 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 50 % จำนวน 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วกรองเอากากเห็ด ตัวอย่า งทิ้งไป นำสาร สกัดตัวอย่าง ที่ได้ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปผสมกับสารละลายแอนโทรน ที่แช่เย็นไว้ลงไป 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน แล้วทดลองตามข้อ 2.2 นำค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างต่อไป

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ทำการทดลองดังนี้

2.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาล

1. กรองสารละลายมาตรฐานน้ำตาลทรีฮาโลส ที่ความเข้มข้น 2 , 4 , 6 , 8 และ 10 mg/ml ด้วยที่กรองขนาด 0.45 µm 2 ครั้ง

2. ตั้งสภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงดังนี้

สภาวะ คือ Phase : normal phase

Column : silica-amino column

Guard column : silica-amino column guard column

Temperature column 55 ^{0}C

Mobile phase : ACN : H_2O = 70:30

Detector : Refractive index detector

Flow rate : 1 ml/min

Injection : 100 µl

3. ฉีดสารละลายมาตรฐานน้ำตาลทรีฮาโลสแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 µl เข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและบันทึกค่าเวลารีเทนชันของน้ำตาลมาตรฐาน

4. นำพื้นที่ใต้พีคของแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน

2.2 .2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟาง

1. นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดจากเห็ดฟาง ที่สกัดด้วย 50%เอทานอล ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C มากรองด้วยเซลลูโลสฟิลเตอร์ ขนาด 0.45 µm 2 ครั้ง

2. ตั้งสภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เหมือนกับในข้อ 2.1

3. ฉีดสารละลายที่ได้จากข้อ 1. ปริมาตร 100 µl เข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ประเมินผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลแต่ละวิธีเปรียบเทียบกัน

ตอนที่ 3. การทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟาง

ได้แก่

3.1 <u>ผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเห็ดฟางสด</u>

3.1.1 นำเห็ดฟางเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 0 1 2 และ 3 วัน นำเห็ดดังกล่าวไปสกัดด้วย50%เอทานอล ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสตามตอนที่2

3.1.2..นำเห็ดฟางเก็บในตู้เย็นเป็นระยะเวลา 0 1 2 และ 3 วัน นำเห็ดดังกล่าวไปสกัดด้วย 50%เอทานอล ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสตามตอนที่ 2

3.2 <u>วิธีการแปรรูปเห็ดตกเกรด</u>

วิธีการแปรรูป ได้แก่ การแช่น้ำเกลือ การดองด้วยน้ำส้มสายชู การแช่แอลกอฮอลล์ นำเห็ดฟางตกเกรดหนัก 50 กรัม ล้างทำความสะอาด แล้วไปลวกในน้ำเดือด ก่อนที่จะนำไป แช่ในสารละลายน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 20 บรรจุในภาชนะขวดโหลแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว ในทำนองเดียวกันนำเห็ดฟางตกเกรดไปดองด้วยน้ำส้มสายชู และ แช่ด้วยเอทานอลเข้มข้น 50%

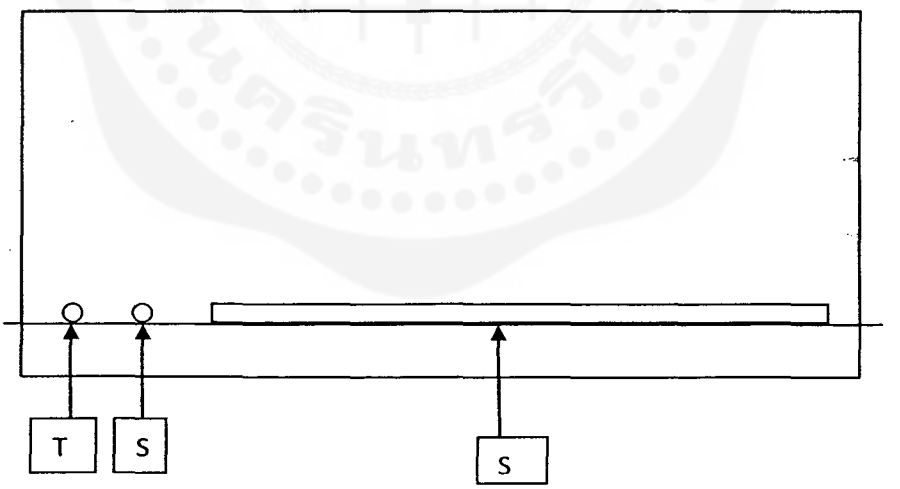
ร 440692

ต่อจากนั้นนำเห็ดดังกล่าวไปสกัดด้วย50%เอทานอล ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C แล้วนำไปวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลตามการทดลองตอนที่ 1 และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสตามตอนที่ 2

ตอนที่ 4 ศึกษาหาวิธีการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางตกเกรด

จากการศึกษาในตอนที่ 3 เมื่อ ทราบว่าการแปรรูปตกเกรด วิธีใด จะทำให้มีน้ำตาลทรีฮาโลสมากที่สุด จึงนำมาประเมินการเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลส โดยใช้เทคนิค preparative thin layer chromatography ทดลองดังนี้

1. เตรียมเพลทสำเร็จรูปโดยตัดเพลทให้มีขนาด 10 x 10 เซนติเมตร
2. หยดสารละลายน้ำตาลทรีฮาโลสมาตรฐานลงบนเพลทโดยควบคุมความเข้มข้นให้เหมาะสม ทั้งนี้การหยดสารต้องทำด้วย แคปิลารีไมโครแคป มีความจุ 20 ไมโครลิตร
3. ทำการสกัดน้ำตาลจากเห็ดตัวอย่างตามตอนที่ 1 นำสารสกัดที่ได้ไปทดลองตามตอนที่ 1 แต่ ให้หยดสารสกัดจากเห็ดเป็นแนวทางยาว ก่อนจะนำไปดีเวลลอปโครมาโทแกรมในตัวทำละลายที่ดีที่สุดตามการทดลองตอนที่ 1 ตามตัวอย่างในภาพประกอบที่ 4



ภาพประกอบ 4 การทดลองทินแลร์แบบ preparative

T แทน น้ำตาลทรีฮาโลสมาตรฐาน S แทน สารตัวอย่าง

4. เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระดับแนวที่ต้องการให้นำเพลทไปเป่าแห้งและนำไปพ่นสารช่วยตรวจสอบตำแหน่งโดยพ่นเฉพาะตำแหน่งของน้ำตาลมาตรฐานเท่านั้น ส่วนตำแหน่งของน้ำตาลในตัวอย่างที่แยกได้ให้นำไปทำขีดบริเวณ เพื่อทำการขูดแถบสารออกมา

5. นำสารดูดซับที่ตำแหน่งของน้ำตาลทรีฮาโลสที่ขูดออกจากเพลทในข้อ 4 ไปละลายเอาน้ำตาลออกด้วยการใช้ตัวทำละลาย สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ปรับปริมาตรให้เหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลตามตอนที่ 2 ต่อไป

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากผลการทดลองในบทที่ 3 ซึ่งมีการทดลอง 4 ตอนใหญ่ ผู้วิจัยจะได้นำเสนอผลการทดลองเป็นตอนๆดังนี้

ตอนที่ 1 ผลการตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์ ด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี

ในการทดลองศึกษาหาชนิดตัวทำละลาย ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ตลอดการทดลองนี้ โดยทดลองกับวัฏภาคเคลื่อนที่ 6 ระบบ ได้แก่

ระบบที่ 1 : อะซีโตไนไตร์ (ACN) : น้ำ อัตราส่วน 70 : 30

ระบบที่ 2 : นอร์มาล- บิวทานอล : เอทานอล : น้ำ อัตราส่วน 50 : 30 : 20

ระบบที่ 3 : เอทิลอะซีเตท: กรดอะซิติก: เมทานอล: น้ำ อัตราส่วน 60 : 15 : 15 : 10

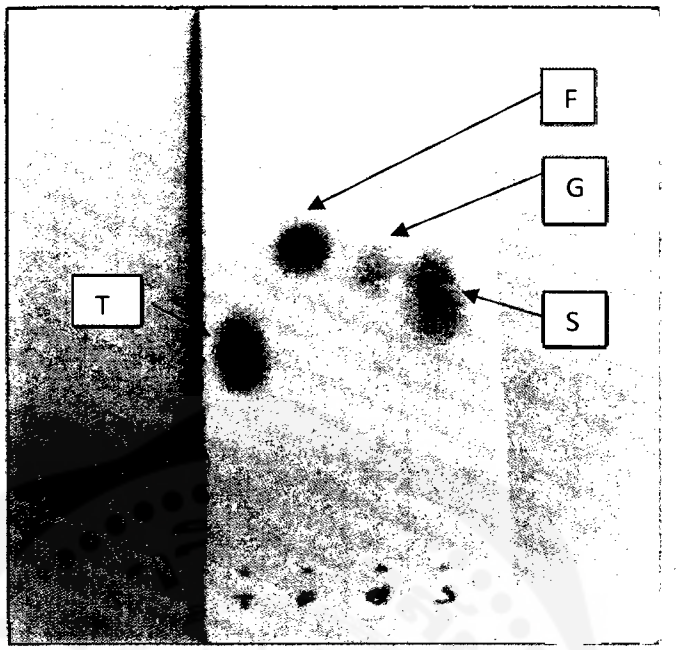
ระบบที่ 4 : นอร์มาล- โพรพานอล : แอมโมเนีย : น้ำ อัตราส่วน 50 : 30 : 20

ระบบที่ 5 : นอร์มาล- บิวทานอล : พิรีดีน : น้ำ อัตราส่วน 60 : 40 : 20

ระบบที่ 6 : เมทานอล : คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 50:50

ทั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบแต่ละระบบด้วยการพ่นสารช่วยทำให้มองจุดบนโครมาโทแกรมที่เกิดจากการแยกสารนระบบ ระบบละ 4 วิธี คือ วิธีที่1 การใช้ สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 วิธีที่2 ใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 ผสมเมทานอล อัตราส่วน 1 : 1 วิธีที่ 3 ใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้นร้อยละ 5 และวิธีที่ 4 ใช้สารละลาย 3,5- ไดไนโตรซาลิไซเลต

จากการทดลองพบว่า การใช้ ระบบที่ 6 ที่ใช้ตัวทำละลาย เมทานอล ผสมคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 50:50 หรือ 1:1 จะให้ผลที่สามารถจะแยกน้ำตาลทรีฮาโลสออกจากน้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุด เนื่องจากค่า Rf ค่อนข้างห่างกันมาก ส่วนวิธีที่ใช้ระบุตำแหน่งที่เลือกคือวิธีการพ่นด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 เนื่องจากสะดวกและเห็นผลได้ชัดเจน ตามแสดงตัวอย่างทินแลร์โครมาโทแกรมในภาพประกอบที่ 5



ภาพประกอบ 5 ทินแลร์โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

หมายเหตุ : T แทน น้ำตาลทรีฮาโลส

F แทน น้ำตาลฟรุกโตส

G แทน น้ำตาลกลูโคส

S แทน น้ำตาลซูโครส

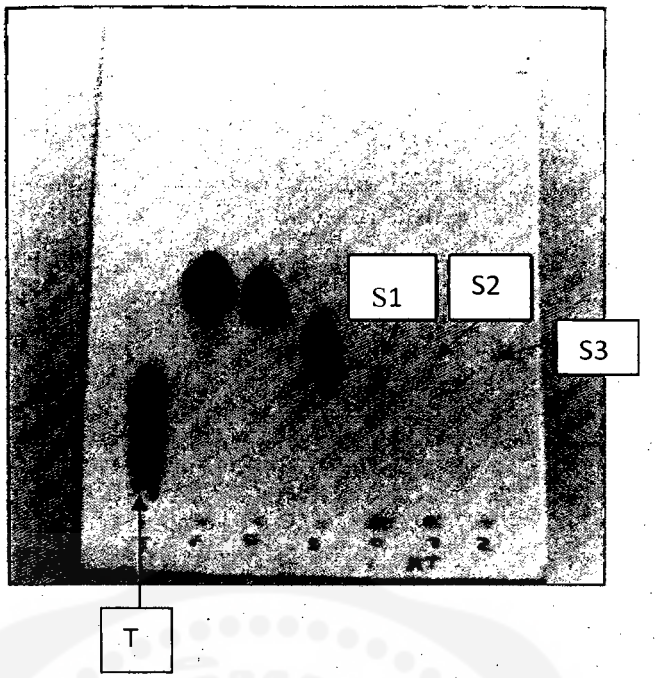
อย่างไรก็ตามค่า Rf ที่ทดลองได้ แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตาราง 1 ค่า R_f ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน 4 ชนิด

สารละลายน้ำตาลมาตรฐาน	R_f
น้ำตาลทรีฮาโลส	0.35
น้ำตาลฟรุกโทส	0.62
น้ำตาลกลูโคส	0.53
น้ำตาลซูโครส	0.49

สำหรับผลการทดลองกับตัวทำละลายระบบที่เหลือ พบว่า ค่า R_f ของน้ำตาลสำคัญที่ตั้งใจวิเคราะห์ คือน้ำตาลทรีฮาโลส แยกออกจากน้ำตาลกลูโคสได้ไม่ดี ที่สนใจน้ำตาลทั้งสองเนื่องจากน้ำตาลทรีฮาโลส เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกัน ดังนั้นถ้าตำแหน่งของน้ำตาลกลูโคสกับทรีฮาโลสแยกจากกันยากจะทำให้ระบุชนิดน้ำตาลในตัวอย่างได้ไม่ถูกต้อง

จากระบบวัฏภาคที่ เหมาะสมจากการทดลองกับสารมาตรฐานน้ำตาล คือ ทำการ แยกและวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลด้วยสารละลาย เมทานอล ผสมคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 50:50 หรือ 1:1 ตรวจสอบการเห็นจุดสารที่แยกได้ จะใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 จึงนำสภาวะที่ดีที่สุด นี้ไปลองทดสอบกับตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดฟางสด ที่ผ่านการสกัดด้วย 50%เอทานอล ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C เพื่อคำนวณหาค่า Rf ของจุดบนโครมาโทแกรมที่แยกได้ เทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับตำแน่งน้ำตาลทรีฮาโลส ดังตัวอย่างในภาพประกอบ 5 จากผลการทดลองตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลในเห็ดฟางที่ทดลองจัดซื้อมาพบว่า ในเห็ดฟางสด จะสามารถตรวจพบ แต่น้ำตาลทรีฮาโลสได้เพียงชนิดเดียว ตามข้อมูลการค้นคว้าหาชนิดน้ำตาลในเห็ดโดยทั่วไปรายงานโดยนักวิจัย (Wannet WJ, et al..,1998) พบว่า มีรายงานการตรวจพบน้ำตาลทรีฮาโลสมากที่สุด



ภาพประกอบ 6 ทินแลร์โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานและสารสกัดจากเห็ดฟาง

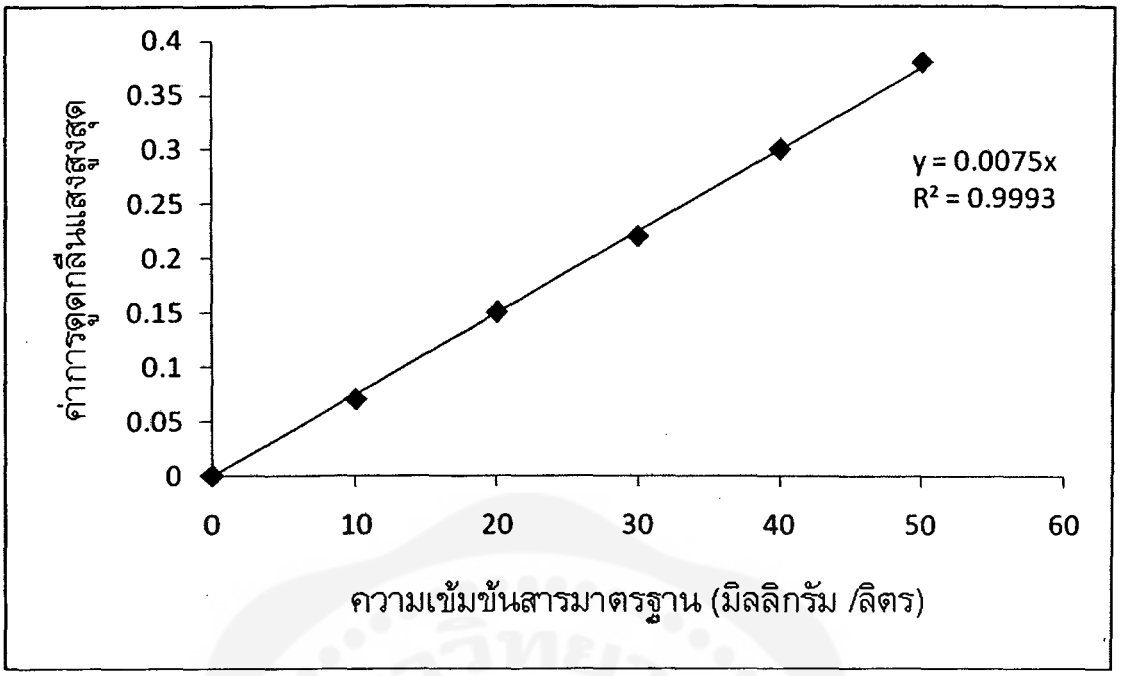
หมายเหตุ T แทน ตำแหน่งน้ำตาลทรีฮาโลส

S1 S2 และ S3 แทน ตำแหน่งของน้ำตาลทรีฮาโลสที่พบในสารสกัดจากเห็ดฟางสดตัวอย่าง

ตอนที่2. ผลการทำปริมาณวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างเห็ด

จากการทดลองตอนที่ 1 ทำให้ทราบว่าในตัวอย่างเห็ดฟางสดมีน้ำตาลจริง และน้ำตาลที่โดดเด่นที่ตรวจพบ คือน้ำตาลทรีฮาโลส ขั้นต่อไปคือ ทดลองหาวิธีที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โดยในการทดลองน้ เลือก ตรวจสอบ 2 เทคนิค ได้แก่ เทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี และเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี โดยการทำกราฟมาตรฐานตามวิธีการศึกษาหาปริมาณน้ำตาลคือ วิธีแอนโทรน ได้กราฟมาตรฐานของน้ำตาลมาตรฐาน ซึ่งทดลองตรวจน้ำตาลทรีฮาโลส ตามภาพประกอบที่ 7 ผลการคำนวณหาค่า r^2 พบว่า มีค่า 0.9993 แสดงว่าเป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลได้ดี



ภาพประกอบ 7 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส

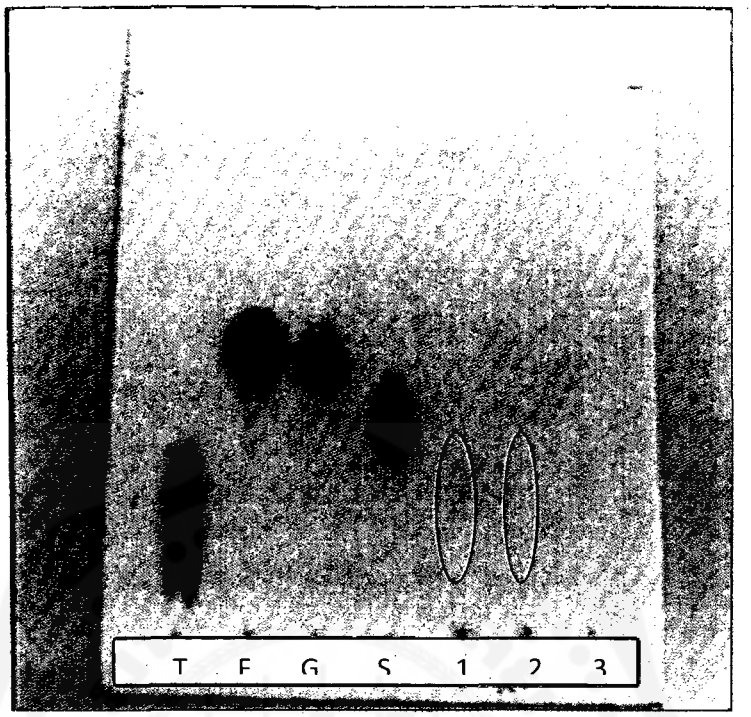
สำหรับการทดลองหาปริมาณน้ำตาล 2 ชนิด ที่สำคัญในการทดลองนี้ คือ น้ำตาลทรีฮาโลส และน้ำตาลกลูโคสด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง นั้นได้ทดลองตรวจด้วยเทคนิคนี้ พบว่ามีข้อขัดข้อง เนื่องจากการตรวจวัดน้ำตาลที่แยกด้วย คอลัมน์แยกสารเมื่อจะตรวจสอบสัญญาณ ของน้ำตาลด้วยหัววัดสารชนิดรีแฟรคทีฟอินเด็กซ์ ไม่สามารถบ่งบอกระบุชนิดน้ำตาลได้ ว่าเป็นน้ำตาลทรีฮาโลส หรือกลูโคส เนื่องจากพีคซ้อนทับกัน อย่างไรก็ตาม ผลจากการศึกษาข้อมูลที่มีผู้ศึกษาน้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่า น่าจะแยกได้ ผู้วิจัย ได้ทำการทดลองซ้ำหลายครั้ง แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จในการแยกและวิเคราะห์ คาดว่า เครื่องตรวจวัดสาร ชนิดรีแฟรคทีฟมีประสิทธิภาพต่ำลง เลยตรวจสอบการทำงานของเครื่องมือ พบว่า เครื่องไม่สามารถตอบสนองสัญญาณใดๆ สรุปว่า ส่วนของเครื่องโครมาโทกราฟีตรงหัววัดสารเกิดการเสียหาย เมื่อตรวจเช็คแล้ว ต้องใช้เงินซ่อมแซมเครื่องมาก จึงทดลองซ่อมบางส่วนแต่ผลที่ได้คือไม่สามารถทำงานได้ แสดงว่า หลอดกำเนิดแสงที่ใช้ในระบบเสื่อมต้องซื้อหลอดมาเปลี่ยน จึงทำให้ผู้วิจัย เปลี่ยนวิธีการตรวจสอบด้วยหัววัดสารชนิดอัลตราไวโอเลต จากการปรับเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นอนุพันธ์ของสารที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ โดยทดลองตามวิธีการของ Michiko Miyagi , et al.,(2007) แต่อย่างไรก็ตาม

พบว่า ไม่สามารถตรวจแยกน้ำตาลทรีฮาโลส หรือกลูโคส ได้เช่นเดิม ผู้วิจัยได้สอบถามไปที่ห้องปฏิบัติการในลักษณะเดียวกัน พบว่า ส่วนใหญ่ไม่ได้เปิดบริการให้บุคคลภายนอกมาใช้เครื่องมือ ผลการพยายามปรับวิธีการต่างๆ ตลอดจน การจะไปขอใช้เครื่องมือที่สถาบันอื่นก็นับว่าเป็นการไม่สะดวก แต่ก็ทำให้เสียเวลาไปหลายเดือนในการดำเนินการ ดังนั้น จึงต้องเลือกดำเนินการในทางที่สะดวกที่สุด ด้วยวิธีการทดลองที่เป็นไปได้ สรุปว่า การหาปริมาณน้ำตาลในการทดลองนี้ จะเลือกการตรวจหาปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิคสเปกโทรเมตรี เนื่องจากสะดวกและรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามต้องทำการแยกสารที่จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography ก่อน สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีทำให้น้ำตาลทำปฏิกิริยากับสารแอนโทรนเกิดสารประกอบมีสีที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเหมาะสม ก็ยังมีข้อด้อยตรงที่ น้ำตาลชนิดอื่นๆก็สามารถทำปฏิกิริยากับแอนโทรนเกิดเป็นสารเชิงซ้อนให้สารดูดกลืนแสงเช่นกันได้ ดังนั้นเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีประสิทธิภาพ โดยต้องทำการแยกชนิดน้ำตาลด้วยการแยกทางคุณภาพวิเคราะห์ก่อน แล้วทำการแยกสารไปตรวจสอบต่อไป

ตอนที่ 3. ผลการทดลองศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟาง

ในการศึกษาปัจจัยที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟาง โดยการทำการซื้อตัวอย่างเห็ดฟางสด มาจากแหล่งต่างๆ แล้วนำมาตรวจหาทางคุณภาพวิเคราะห์ในวันแรก เพื่อหาชนิดน้ำตาลและทำการตรวจปริมาณน้ำตาลที่พบโดยเน้นตรวจหาปริมาณน้ำตาลทีฮาโลส และได้วางแผนการทดลองโดยเก็บตัวอย่างเห็ดฟางไว้ 3 วัน โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง และนำไปแช่ในตู้เย็น ทั้งนี้จะได้นำเห็ดฟางตัวอย่างไปสกัดสารที่สนใจตามการทดลองในบทที่ 3 ตอนที่ 3.1 และ 3.2 ซึ่งจะตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์เพื่อหาชนิดและวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลโดยเน้นตรวจน้ำตาลทรีฮาโลส

ผลการตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์ตามแสดงในภาพประกอบที่ 8 และ 9



ภาพประกอบ 8 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน

หมายเหตุ: T = ทรีฮาโลส F = ฟรุกโตส G = กลูโคส S = ซูโครส

1 = สารสกัดจากเห็ดฟางเก็บนาน 1 วัน

2 = สารสกัดจากเห็ดฟางเก็บนาน 2 วัน

3 = สารสกัดจากเห็ดฟางเก็บนาน 3 วัน

จากภาพประกอบที่ 8 พบว่า เมื่อเก็บเห็ดฟางที่อุณหภูมิห้องเพียง 1 วัน เมื่อนำมาสกัดและตรวจหาชนิดน้ำตาล สามารถมองเห็นว่ามีน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟางที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง จุดน้ำตาลที่พบพบในตำแหน่งของน้ำตาลทรีฮาโลสเท่านั้น และสามารถมองเห็นได้ชัดเจนที่สุดในตำแหน่งที่วงรอบไว้ สำหรับการเก็บเห็ดฟางนาน 2 วัน ก็สามารถมองเห็นตำแหน่งน้ำตาลบนโครมาโทแกรมได้แต่ไม่ชัดเจนเท่าการเก็บเห็ดนาน 1 วัน ส่วนวันที่ 3 ของการเก็บเห็ดฟางไว้ที่อุณหภูมิห้องภายหลัง

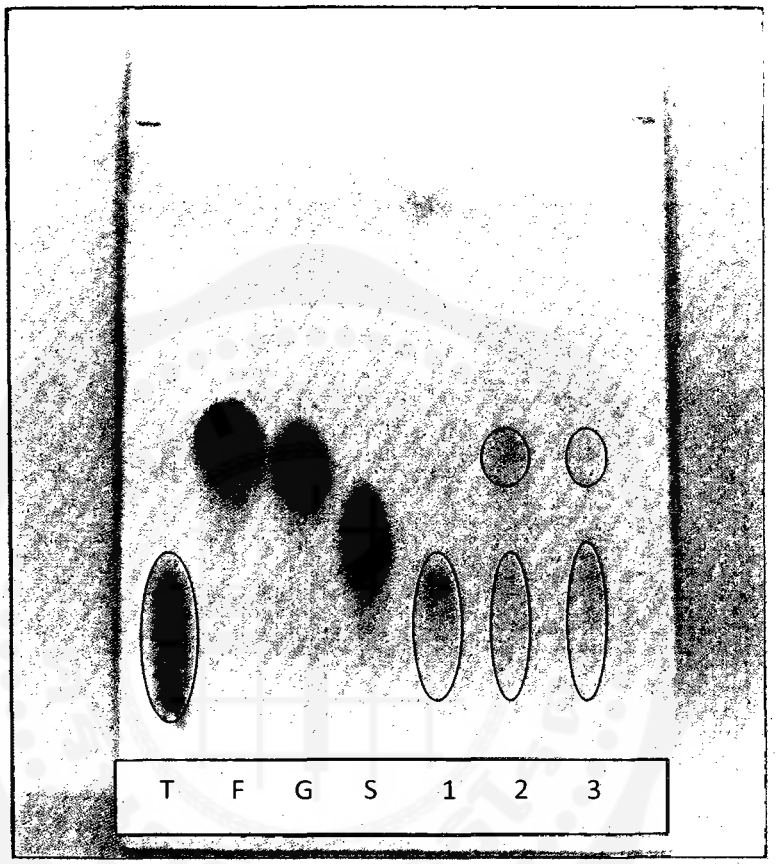
เมื่อนำเห็ดมาสกัดเพื่อตรวจสอบไม่สามารถมองเห็นตำแหน่งของจุดน้ำตาล แค่คาดว่าน่าจะยังคงมีน้ำตาลทรีฮาโลสอยู่ ดังนั้นในการตรวจหาปริมาณน้ำตาลโดยใช้วิธี preparative thin layer chromatography โดยการกรีดแนวแถบที่ตรงน้ำตาลทรีฮาโลส แล้วไปสกัดน้ำตาลเพื่อตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีแอนโทรน แล้วคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสที่ตรวจพบ ตามแสดงในตารางที่ 2

ตาราง 2 ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บที่อุณหภูมิห้องตามระยะเวลาต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส (มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ด)
เห็ดฟางสด	5.12 ± 0.03
เห็ดฟางเก็บนาน 1 วัน	24.80 ± 0.12
เห็ดฟางเก็บนาน 2 วัน	12.35 ± 0.15
เห็ดฟางเก็บนาน 3 วัน	5.67 ± 0.08

ผลการตรวจสอบปริมาณด้วยเทคนิค preparative พบว่า ในเห็ดสดที่จัดซื้อมามีปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสอยู่ แต่มีปริมาณที่น้อยกว่าผลที่ตรวจได้จากการเก็บเห็ดเป็นเ วลานานที่อุณหภูมิห้อง โดยเห็ดที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน จะมีปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสสูงที่สุดต่อจากนั้นมีแนวโน้มลดปริมาณลง สาเหตุเพราะในการวางเห็ดไว้อาจเกิดกลไกในเห็ดอาจเป็นเพราะมีจุลินทรีย์บางชนิดมาช่วยให้มีการแปรเปลี่ยนเป็นน้ำตาลทรีฮาโลสได้มากขึ้น หรือ อาจเป็นเพราะเห็ดเริ่มมีการสูญเสียน้ำออกโมเลกุลของเห็ดทำให้ เมื่อตรวจวิเคราะห์แล้วจึงพบว่าปริมาณน้ำตาลมากขึ้น สำหรับข้อน่าสังเกตคือ เมื่อทิ้งเห็ดไว้นานมากขึ้นเห็ดเริ่มมีการเน่าเสียจึงเป็นเหตุให้น้ำตาลทรีฮาโลสที่เคยมีในเห็ดอาจเกิดการสลายตัวเป็นน้ำตาลกลูโคส และกลายเป็นน้ำที่หลอมเห็ดให้มีลักษณะเป็นเห็ดเสีย

เมื่อเทียบผลการทดลองเก็บเห็ดที่อุณหภูมิเย็นกว่า เช่นในตู้เย็น และนำไปตรวจหาน้ำตาลทรีฮาโลส ตามภาพประกอบที่ 9



ภาพประกอบ 9 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บในตู้เย็นนาน 3 วัน

หมายเหตุ: T = ทรีฮาโลส F = ฟรุกโตส G = กลูโคส S = ซูโครส

1 = สารสกัดจากเห็ดฟางเก็บนาน 1 วัน

2 = สารสกัดจากเห็ดฟางเก็บนาน 2 วัน

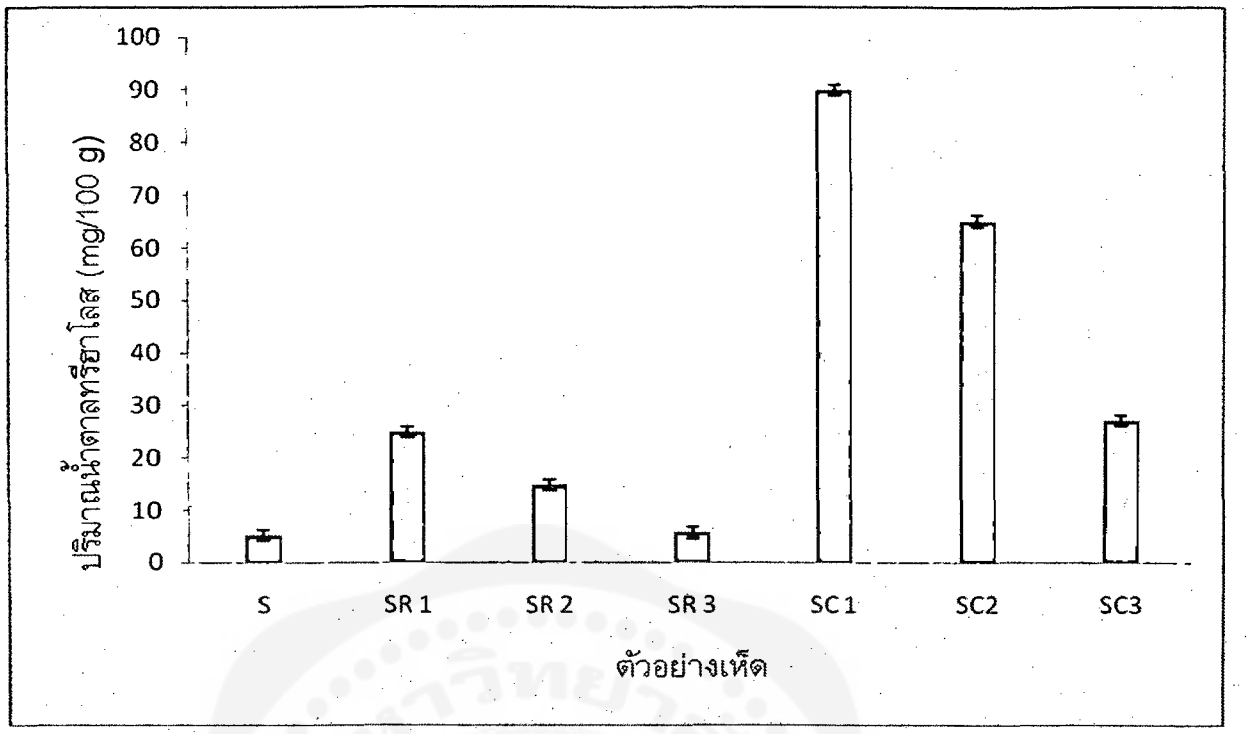
3 = สารสกัดจากเห็ดฟางเก็บนาน 3 วัน

ผลการเก็บเห็ดฟางตัวอย่างในที่เย็นเช่นตู้เย็นช่องแช่เย็นธรรมดาเมื่อนำมาตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์ พบว่า ในการเก็บระยะเวลา 1 วัน พบน้ำตาลทรีฮาโลสได้ชัดเจนเพียงชนิดเดียว แต่เมื่อเก็บไว้นาน 2 และ 3 วัน จะพบน้ำตาลอีกชนิดซึ่งตำแหน่งใกล้เคียงกับกลูโคส จึงอาจกล่าวได้ว่า การเก็บในที่เย็นจะพบน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นในเห็ดฟาง อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้มุ่งให้ความสนใจกับน้ำตาลทรีฮาโลส จึงทำการทดลองหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส ด้วยเทคนิคpreparative thin layer chromatography เช่นเดียวกับการทดลองกับเห็ดฟางที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองและคำนวณกลับไปหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส ได้ผลแสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวอย่างเห็ดฟางที่เก็บที่เย็นตามระยะเวลาต่าง ๆ

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส (มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ด)
เห็ดฟางสด	5.12 ± 0.03
เห็ดฟางเก็บนาน 1 วัน	89.92 ± 0.14
เห็ดฟางเก็บนาน 2 วัน	65.28 ± 0.30
เห็ดฟางเก็บนาน 3 วัน	27.20 ± 0.06

จากการทดลองเก็บเห็ดฟางตัวอย่างในที่เย็นและตรวจปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส พบว่า การเก็บเห็ดฟางในที่เย็นจะตรวจพบน้ำตาลทรีฮาโลสปริมาณสูงที่สุดเกือบ 90 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมของเห็ดฟางสด แต่ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสก็มีแนวโน้มลดลง เช่นเดียวกับการเก็บเห็ดฟาง ถ้านำผลของปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสที่ตรวจพบในเห็ดฟางที่เก็บ 2 สภาวะ มีเปรียบเทียบกันตามแสดงในภาพประกอบที่ 10 จะเห็นได้ชัดเจนว่า การเก็บเห็ดฟางในสภาวะแตกต่างกันมีผลให้น้ำตาลทรีฮาโลสที่ตรวจพบแตกต่างกันชัดเจน



ภาพประกอบ 10 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟางที่เก็บที่สภาวะต่างกัน

หมายเหตุ S = ตัวอย่างเห็ดฟางสด

SR1 = ตัวอย่างเห็ดฟางเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน

SR2 = ตัวอย่างเห็ดฟางเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน

SR3 = ตัวอย่างเห็ดฟางเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน

SC1 = ตัวอย่างเห็ดฟางเก็บในตู้เย็นนาน 1 วัน

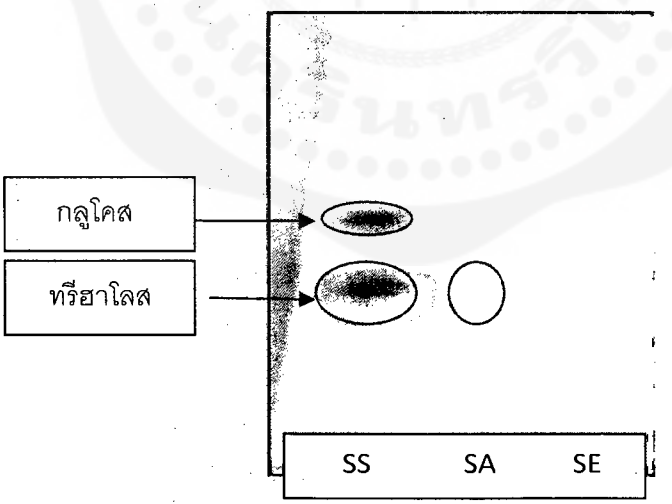
SC2 = ตัวอย่างเห็ดฟางเก็บในตู้เย็นนาน 2 วัน

SC3 = ตัวอย่างเห็ดฟางเก็บในตู้เย็นนาน 3 วัน

ตามภาพประกอบ 10 จะเห็นชัดเจนว่า วิธีการเก็บรักษาเห็ดฟางมีผลต่อปริมาณของน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ด ซึ่งแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณขึ้นกับระยะเวลาการเก็บซึ่งปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสมี

ปริมาณมากที่สุดเมื่อเก็บไว้นานเพียง 1 วัน ซึ่งเก็บใน ทั้ง สองสภาวะ โดยการเก็บในที่เย็นทำให้ช่วยทำให้มีปริมาณทรีฮาโลสมากกว่า การเก็บที่อุณหภูมิปกติ การที่น้ำตาลทรีฮาโลสมีมากขึ้นตามระยะเวลาเก็บ โดยเฉพาะช่วง 1 แรก คาดว่าเป็นผลจากกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่มีในพืช จะมีส่วนช่วยย่อยสลายเส้นใยของพืชทำให้โมเลกุลของน้ำตาลหลุดออกมาได้จากสารประกอบอื่นๆที่มีในพืช ส่วนการเก็บที่เย็นเป็นเพราะอุณหภูมิต่ำกว่าจะทำให้สามารถถนอมพืชไม่ให้เสียหายได้ง่ายกว่า การเก็บที่อุณหภูมิเย็น

สำหรับผลการศึกษาผลการแปรรูปเห็ดฟางที่จัดซื้อมาด้วยการนำไปดอง เนื่องจากมีผลิตภัณฑ์เห็ดแปรรูปแบบเห็ดดองจำหน่าย ทั้งนี้เพราะเห็ดฟางเป็นเห็ดที่ไม่สามารถเก็บแบบตากแห้งได้ เช่นเดียวกับเห็ดหอม เห็ดหูหนู การนำเห็ดฟางไปดองนี้เพื่อศึกษาว่า การแปรรูปจะทำให้มีน้ำตาลทรีฮาโลสเพิ่มขึ้น หรือ ลดลงอย่างไร ผลการตรวจสอบหาชนิดน้ำตาลในตัวอย่างเห็ดฟางที่ ผ่านการดองทั้ง 3 ด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟีพบว่า การดองด้วยเกลือ และน้ำส้มสายชู มีน้ำตาลทรีฮาโลสอย่างชัดเจน แต่การดองด้วยเอทานอลไม่สามารถมองเห็นจุดที่ตำแหน่งน้ำตาลทรีฮาโลส ตามตัวอย่างในภาพประกอบที่ 11

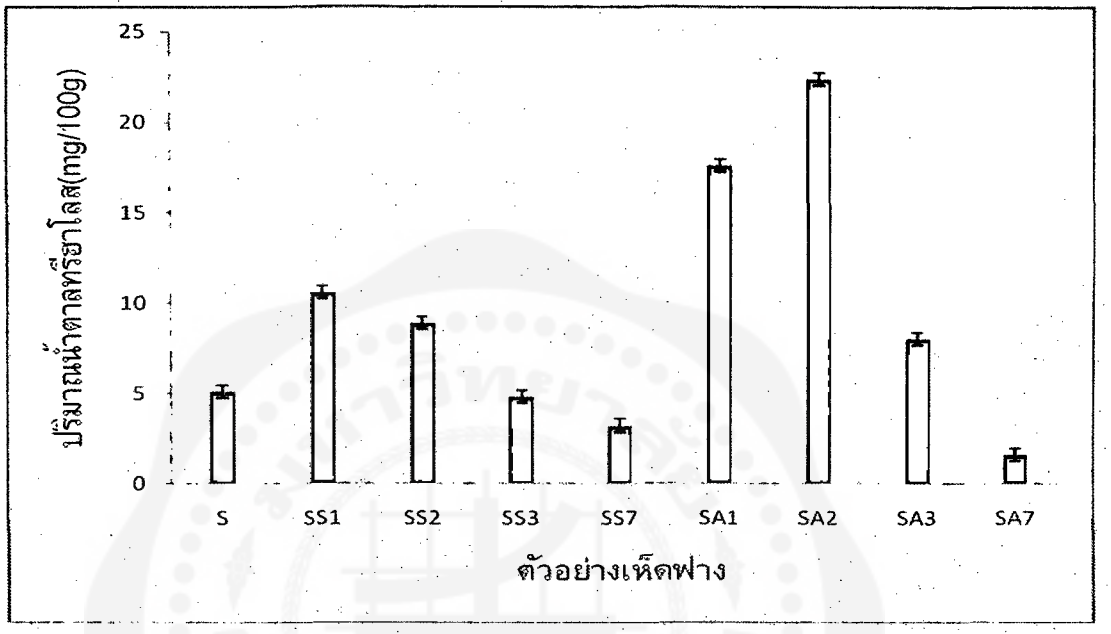


ภาพประกอบ 11 น้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟางแปรรูป

หมายเหตุ SS = เห็ดฟางดองเกลือ SA = เห็ดฟางดองน้ำส้มสายชู

SE= เห็ดฟางดองเอทานอล

ดังนั้นจึงทำการตรวจหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวอย่างเห็ดฟางแปรรูปที่ผ่านการดองด้วยน้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู ได้ผลตามแสดงปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวอย่างเห็ดฟางแปรรูป

หมายเหตุ : S = ตัวอย่างเห็ดฟางสด

SS1 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองเกลือที่ระยะเวลานาน 1 วัน

SS2 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองเกลือที่ระยะเวลานาน 2 วัน

SS3 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองเกลือที่ระยะเวลานาน 3 วัน

SS7 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองเกลือที่ระยะเวลานาน 7 วัน

SS1 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองน้ำส้มที่ระยะเวลานาน 1 วัน

SS2 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองน้ำส้มที่ระยะเวลานาน 2 วัน

SS3 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองน้ำส้มที่ระยะเวลานาน 3 วัน

SS7 = ตัวอย่างเห็ดฟางดองน้ำส้มที่ระยะเวลานาน 7 วัน

ในการแปรรูปเห็ดฟางด้วยการดองด้วยน้ำเกลือนั้นพบว่า ในการดองวันแรก เมื่อนำมาสกัดเพื่อตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาล เห็ดฟางจะมีปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสสูงที่สุด โดยมีปริมาณมากถึง 10.56 ±0.23 มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ดตัวอย่าง ต่อจากนั้นมีแนวโน้ มลดลงจนการดองครบ 7 วัน หรือ 1 สัปดาห์ จะมีน้ำตาลทรีฮาโลสลดลงมากเหลือประมาณ 3.20 ±0.15 มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ดตัวอย่าง สำหรับการแปรรูปด้วยการดองในน้ำส้มสายชู ก็สามารถตรวจพบน้ำตาลทรีฮาโลสได้มากที่สุด เมื่อทำการดองได้นาน 2 วัน โดยพบว่าเห็ดฟางมีน้ำตาลทรีฮาโลส 22.40±0.36 มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ดตัวอย่าง ต่อจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลง

ตอนที่ 4 ผลการศึกษาหาวิธีการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางตกเกรด

จากผลการทดลองตอนที่ 3 ซึ่งเป็นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส ทั้งเรื่องการเก็บรักษาและ การถนอมอาหารเ ห็ดในลักษณะการดอง พบว่า จากผลการทดลองนั้นการเก็บเห็ดฟางไม่ว่าจะสภาวะใดก็ตาม หรือ การดองทั้ง 2 วิธี นั้น ในวันที่ 2 เห็ดจะมีน้ำตาลทรีฮาโลสสูงที่สุด ดังนัน อาจกล่าวได้ว่า แนวทางการจะแยกน้ำตาลทรีฮาโลสออกจากเห็ดตกเกรด สามารถทำได้โดยนำเห็ดฟางนั้นไปแปรรูปเป็นเห็ ดฟางดองด้วยน้ำเกลือ จะทำให้ได้เห็ดฟางที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสสูงสุด ถ้าสกัดน้ำตาล ทรีฮาโลส ภายในระยะเวลาการดองได้ 2 วัน ในการหาแนวทางจึงทดลองทำการ preparative thin layer chromatography เพื่อสกัดน้ำตาลทรีฮาโลส และพยายามทำให้บริสุทธิ์ แต่พบว่าการทำให้บริสุทธิ์ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีอีกหลายขั้น ดังนั้น จึงแยกเป็นสารสกัด ซึ่งการกรีดแถบน้ำตาลแล้วนำไปคำนวณหาปริมาณทางเทคนิคสเปกโทรเมตรี พบว่า ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสมีมากที่สุดที่ระยะเวลาการดอง 2 วัน แยกเป็นสารสกัดได้หนัก 0.0050 กรัม ที่แยกจากเห็ดตัวอย่างหนัก 50 กรัม ถ้าคำนวณเป็นร้อยละ ได้ประมาณ 10.56 มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ด แต่อย่างไรก็ตามน้ำตาล

นี้อาจจะต้องนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์อีก ซึ่งต้องใช้เวลาอีกระดับหนึ่ง และต้องเพิ่มสเกลการทดลองให้มีขนาดใหญ่ขึ้นโดยเพิ่มตัวอย่างเห็ดฟาง

ในการทดลองยังได้พยายามหาวิธีการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากตัวอย่างเห็ดฟาง ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่า น้ำตาลที่มีโอกาสเจือปนกับน้ำตาลทรีฮาโลส คือ น้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลทรีฮาโลส เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ของน้ำตาลกลูโคสนั่นเอง จึงพยายามหาสภาวะที่จะแยกน้ำตาลทั้งสองออกจากกัน ผู้วิจัยจึงได้ทำเทคนิค solid phase extraction ซึ่งเป็นการแยกสารระหว่างวัฏภาคคงที่ที่บรรจุในภาชนะที่เป็นท่อ วัฏภาคคงที่ต้องเหมาะสมกับการแยกสารตัวอย่าง จากนั้นทำการชะสารด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ ในการทดลองนี้ได้ใช้วัฏภาคคงที่เป็น SEP-NH2 และชะสารด้วยวัฏภาคเอทานอลเข้มข้น 3 % โดยทำ การทดลองกับสารละลายน้ำตาลทรีฮาโลส และกลูโคสมาตรฐาน ครั้งแรกศึกษาแยกระบบกัน พบว่า น้ำตาลทรีฮาโลสสามารถเคลื่อนที่แยกออกมาได้ก่อนน้ำตาลกลูโคส แต่เมื่อนำน้ำตาลทั้งสองผสมกันเหมือนสภาวะจริง กลับไม่สามารถแยกน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดออกจากกันได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงแยกน้ำตาลด้วย preparative thin layer chromatography ซึ่งแยกสารได้น้อย ดังนั้นถ้าทำการแยกปริมาณมากต้องศึกษาหาเทคนิคใหม่ในการแยกต่อไป

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ

สรุป

ในการทดลองศึกษาการใช้ประโยชน์จากเห็ดฟางตกเกรดในการเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลส สามารถสรุปผลการทดลองแต่ละตอนดังนี้

1 การตรวจคุณภาพวิเคราะห์หาชนิดน้ำตาลจะใช้ ระบบที่ 6 คือ ตัวทำละลาย เมทานอล ผสมคลอโรฟอร์มอัตราส่วน 50:50 หรือ 1:1 จะให้ผลที่สามารถจะแยกน้ำตาลทรีฮาโลสออกจากน้ำตาลกลูโคสได้ดีที่สุด เนื่องจากค่า Rf ค่อนข้างห่างกันมาก และทำการระบุตำแหน่งจุดบนโครมาโทแกรมจะพ่นด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 จัดว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสะดวก และราคาไม่แพง

2. การหาปริมาณน้ำตาลในการทดลองนี้ จะเลือกการตรวจหาปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิควิสิเบิลสเปกโทรเมตรี ตามวิธีของการใช้รีเอเจนต์แอนโทรน วิธีนี้น้ำตาลทำปฏิกิริยากับสารแอนโทรนเกิดสารประกอบมีสีที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเหมาะสม เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามต้องทำการแยกสารที่จะวิเคราะห์ด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography ก่อน วิธีวิสิเบิลสเปกโทรเมตรีแบบการใช้สารแอนโทรนมีขีดจำกัดการตรวจสอบที่ระดับ 0.88 มิลลิกรัมต่อ ลูกบาศก์เดซิเมตร ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้เลือกตรวจหาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีแอนโทรน ก่อนที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโทรเมตรี

3. ในการศึกษาปัจจัยที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง ปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟาง โดยการทำการสุ่มตัวอย่างเห็ดฟางสด แล้วนำมาตรวจหาทางคุณภาพวิเคราะห์ในวันแรก เพื่อหาชนิดน้ำตาลและทำการตรวจปริมาณน้ำตาลที่พบโดยเน้นตรวจหาปริมาณน้ำตาลทีฮาโลส และศึกษาผลเก็บตัวอย่างเห็ดฟางไว้ 3 วัน โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง และนำไปแช่ในตู้เย็น ผลการทดลองพบว่า เห็ดฟางสดมีน้ำตาลท

รีฮาโลสปริมาณ 5.12 ± 0.03 มิลลิกรัม /100 กรัมเห็ดตัวอย่างสด ผลการเก็บแช่เย็นจะพบน้ำตาลทรีฮาโลสสูงกว่าการเก็บเห็ดฟางที่อุณหภูมิห้อง โดยพบปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส 89.92 ± 0.14มิลลิกรัม /100 กรัมเห็ดตัวอย่างสด เ มื่อเก็บเห็ดฟางในที่เย็นวันแรก ผลการศึกษาผลการแปรรูปด้วยวิธีการดองด้วยน้ำเกลือ ดองด้วยน้ำส้มสายชู และ ดองด้วยเอทานอล พบว่า การดองด้วยน้ำเกลือ และ การดองด้วยน้ำส้มสายชู สามารถตรวจพบน้ำตาลทรีฮาโลสได้ในการตรวจสอบทางคุณภาพวิเคราะห์ ส่วนการดองด้วยเอทานอลไม่พบน้ำตาลทรีฮาโลสในการตรวจสอบทางคุณภาพวิเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจหาปริมาณในเห็ดฟางที่ดองด้วย น้ำเกลือ และน้ำส้มสายชู พบว่า การดองด้วยน้ำส้มสายชู จะสามารถทำให้มีน้ำตาลทรีฮาโลสได้สูงสุดที่ระยะเวลาการดองเพียง 2 วัน โดยพบป ริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสประมาณ 22.40±0.36 มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ดฟางสด

4 . การศึกษาหาวิธีการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟาง พบว่า วิธีที่ใช้เป็นการทดลองด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography ซึ่งได้ทำการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางแปรรูปด้วยน้ำส้มสายชู พบว่า ได้น้ำตาลทรีฮาโลสที่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์หนักเฉลี่ย 0.0050 ±0.0002 กรัม โดยขบวนการทั้งหมดใช้เห็ดฟางสดก่อนดองหนัก 50 กรัม ถ้าคำนวณเป็นร้อยละ จะได้น้ำตาลสกัดหยาบประมาณ 0.01 % โดยน้ำหนัก

สรุปโดยในภาพรวมการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเห็ดฟางตกเกรดในการเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลสนั้นพบว่า มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถเตรียมน้ำตาลที่มีประโยชน์มาก ทั้งสามารถนำไปใช้ในด้านต่างๆมากมายได้จากการสกัดจากเห็ดฟาง

อภิปรายผล

จากการทดลองในงานวิจัยนี้ พบว่า ได้ข้อมูลที่จัดว่าเป็นประโยชน์มากต่อการเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลสนี้ ปกติการเตรียมทรีฮาโลสในอุ ตสาหกรรมจะนิยมทำกระบวนการหมัก โดยพบรายงานล่าสุดปีคศ.2000 บริษัทHayashibara แห่ง Okayama ประเทศญี่ปุ่น (Higashiyama และ Takanobu , 2002). ได้ทำการผลิตน้ำตาลทรีฮาโลสจากแป้ง ได้ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามน้ำตาลทรีฮาโลสก็จัดเป็น

น้ำตาลที่มีมากในเห็ด บางครั้งจะเ รียกว่า น้ำตาลเห็ด ซึ่งน้ำตาลนี้จะช่วยรักษาความชุ่มชื้นของเห็ดไว้ โดยมีรายงานวิจัยมากมายที่ตรวจหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ด ทั้งชนิดเป็นอาหาร (edible mushroom) เห็ดที่มีสรรพคุณทางยา (medicinal plant) ตลอดจนตรวจหาในเห็ดป่า อย่างไรก็ตาม การรายงานการหาปริมาณน้ำตาลในเห็ดต่างๆ ที่บริโภคได้ และมีสรรพคุณทางยา เช่น เห็ดหอม สามารถตรวจพบและรายงานโดย Joan-Hwa Yans , et a., 2001 พบในปริมาณ 29.2 ± 3.91 มิลลิกรัม / กรัม น้ำหนักเห็ดแห้ง แต่ก็พบในรายงานของ Min –Young Kim , et al., 2009. รายงานผลการตรวจหาปริมาณน้ำตาลท รีฮาโลสในเห็ดบริโภคได้ชนิดต่างๆ ในประเทศเกาหลี ซึ่งข้อมูลการรายงานปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดหอม ก้แตกต่างไป โดยพบปริมาณ 2.55± 0.32 มิลลิกรัม / กรัมน้ำหนักเห็ดแห้ง จากผลการวิจัยของผู้วิจัย 2 ท่านจะเห็นว่ามีความแตกต่างกันมาก แสดงว่า ปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้อง กับปริมาณน้ำตาลในเห็ดยังขึ้นกับลักษณะเห็ด ภูมิศาสตร์ด้านการปลูกของเห็ด จากที่กล่าวมาการตรวจหาน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดยังพบรายงานน้อยมาก โดยจะกล่าวภายหลัง ทั้งนี้ผลจากการตรวจวิจัยในครั้งนี้ทำการประเมินหาชนิดน้ำตาล ซึ่งเรียกว่า การตรวจสอบด้านคุณภาพวิเคราะห์ ทำด้วยเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟี ซึ่งจัดเป็นที่นิยมในการตรวจหาชนิด องค์ประกอบสารในตัวอย่าง ซึ่งไม่เพียงแต่ใช้ทดสอบชนิดน้ำตาลเท่านั้น การตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ก็ถูกนำมาใช้อย่างเป็นปกติในทุกห้องปฏิบัติการ(Sherma.J., 2000) ทั้งในการศึกษาด้วยเทคนิ คนี้จะต้องทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองที่สนใจจะศึกษาทุกครั้ง ในการทดลองนี้ก็ได้เลือกสภาวะที่นำมาทดลองตั้งแต่ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ ได้ทดลอง ถึง 6 ระบบ และ ศึกษาระบบการตรวจระบุตำแหน่งอีก 4 วิธี ผลที่ได้ตามรายงาน คือ ได้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นเมทา นอล : คลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1 :1 และตรวจวัด ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 20 วิธีนี้ได้มีผู้วิจัยหลายท่านนำไปทดสอบชนิดน้ำตาล แต่ในระบบที่ผู้วิจัยนำมาใช้จะมีการดัดแปลงเล็กน้อย กล่าวคือ ในระบบ เมทานอล ผสมคลอโรฟอร์ม นี้ ผู้วิจัยหลายท่านจะเลือก มีการ ผสมน้ำเข้าไปด้วย (Baron,D.N.และ Economidis,J.,1963) ซึ่งผู้วิจัยได้ทดลองสภาวะนั้นเช่นกัน แต่ไม่พบความแตกต่างมากนัก จึงเลือกใช้ระบบสารผสมสองสารจะสะดวกรวดเร็วกว่า

ในการศึกษาหาปริมาณน้ำตาลในการวิจัยนี้ ผู้วิจัย ได้ทำการเลือกตรวจหาปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิควิสิเบิลสเปกโทรเมตรี แบบการให้น้ำตาลทำปฏิกิริยากับสารรีเอเจนต์มีชื่อ ว่า แอนโทรน ซึ่งมีหลักการทำปฏิกิริยาตามที่กล่าวในบทที่ 2 ผลการทดลอง พบว่า ได้ผลการศึกษาที่ดี โดยเมื่อพลอตกราฟมาตรฐานแล้วหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับแอนโทรน พบว่า มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9993 แสดงว่า ปริมาณน้ำตาลมาตรฐานที่นำมาทดลองมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าผลความสามารถในการดูดกลืนแสงเป็นเชิงเส้นตรง ด้วยค่าสมการ $y = 0.0075 x$ เมื่อทดลองหาขีดจำกัดล่างของการวิเคราะห์พบว่ามีค่า 0.88 มิลลิกรัมต่อ ลูกบาศก์เดซิเมตร แสดงว่าวิธีที่เลือกนำมาใช้ในการวิจัยมีความไวสูงระดับ 0.88 ส่วนในล้านส่วน อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจหาปริมาณด้วยวิธีแอนโทรนก็ยังคงมีข้อเสียบ้างเท่าที่พบรายงานโดย Trevelyan, W. E, et al. (1952) คือ น้ำตาลชนิดต่างๆก็สามารถทำปฏิกิริยาได้กับรีเอเจนต์แอนโทรน จึงทำให้ วิธีนี้นิยมนำไปใช้ตรวจปริมาณน้ำตาลรวมในตัวอย่างทางการเกษตร แต่อย่างไรก็ตามมีข้อมูลทางวิชาการจากการค้นคว้าวิจัยของ Bailey.R.W.(1958) ที่ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างรีเอเจนต์แอนโทรน กับน้ำตาลชนิดต่างๆ ก็พบว่า มีความแตกต่างกันเรื่องความเข้มของสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้น ในเวลาเท่ากันจะแตกต่างกัน ซึ่งวัดจากค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนพบว่ามีความเข้มสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาแตกต่างกัน และนอกจากนี้ การดูดกลืนแสงของน้ำตาลแต่ละชนิด ก็มีความแตกต่างกันบ้างแต่ไม่มากจนชัดเจน ซึ่งผลการทดลองนี้ ผู้วิจัยก็ได้ทำการศึกษามาแล้ว และผลการทดลองก็สอดคล้องกับ ผลการวิจัยของ Bailey.R.W.(1958) จึงทำให้การทดลองนี้ต้องศึกษาหาวิธีการแยกน้ำตาลอื่นๆที่ไม่น้ำตาลทรีฮาโลสออกจากระบบ ด้วยข้อมูลจากการตรวจคุณภาพวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินแลร์ที่ทดลองข้างต้น พบว่า ค่า Rf ของน้ำตาลแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ซึ่งสิ่งที่สำคัญคือต้องแยกน้ำตาลกลูโคสออกจ ากน้ำตาลทรีฮาโลส โดยน้ำตาลทีฮาโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ของน้ำตาลกลูโคส จึงมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าน้ำตาลกลูโคส เพราะโมเลกุลมีขนาดใหญ่กว่า และมีความเป็นขั้วมากกว่าน้ำตาลกลูโคส จึงจับกับวัฏภาคอยู่กับที่ซึ่งใช้ซิลิกาในการแยกได้ดีมากกว่า น้ำตาลกลูโค ส(Harry W. Lewis และ Christopher J. Moody ,1998)โดยผลจากข้อมูลในตารางที่ 1 ค่าR_f ของน้ำตาลทรี

ฮาโลสมีค่าเพียง 0.35 ขณะที่น้ำตาลกลูโคสมีค่า 0.53 ค่าที่แตกต่างกันเช่นนี้ ทำให้สามารถแยกน้ำตาลทั้งสองออกจากันได้ง่าย จึงทำการเพิ่มปริมาณสารในการทดลองทินแลร์ แล้ วแยก จึงเป็นที่มาของการแยกด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography เมื่อแยกน้ำตาลทรีฮาโลสออกจากน้ำตาลกลูโคส จึงนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีแอนโทรน จากขั้นตอนนี้ ผู้วิจัยทราบดีว่าต้องมีการเพิ่มขั้นตอนทดลองพิเศษ คือทำการแยกตัวอย่างน้ำตาลก่อน แ ละตามด้วยการตรวจหาปริมาณน้ำตาล ผู้วิจัยจึงได้พยายามทำการทดลองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งจะแยก และวิเคราะห์หาปริมาณในขั้นตอนเดียวด้วยการแยกในคอลัมน์ที่แยกน้ำตาลโดยเฉพาะ และตรวจวัดสารด้วยเครื่องมื อวัดที่เหมาะสม จากการค้นคว้าพบว่ า การวิเคราะห์ น้ำตาลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมาก แต่ก็มีวิธีการตรวจวัดสารด้วยวิธีที่เหมาะสมไวมาก คือ วัดดรรชนีหักเหของน้ำตาล เรียกว่า ตัวตรวจวัด refractive index(Wannet WJ, et al.,1998)(Min –Young Kim , et al., 2009.) ผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลองด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงกับเครื่องมือที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี พบว่า สัญญาณพีคไม่สามารถแยกน้ำตาลทั้ง 2 ออกจากกันได้ จากการทดลองหลายครั้งจึงทราบว่า เครื่องมือนี้มีส่วนของตัวตรวจวัดสารเกิดการเสื่อมที่หลอดทำงาน จึงเปลี่ยนไปใช้วิธีตรวจวัดสัญญาณด้วยเทคนิคอัลตราไวโอเลตสเปกโทรเมตรี พบว่า ไม่สามารถแยกสารทั้งสอง จึงต้องดำเนินการวิจัยด้วยเทคนิค preparative thin layer chromatography ก่อน แล้ววิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิควิสิเบิลสเปกโทรเมตรีโดยใช้สารแอนโทรน อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ก็จัดว่าได้ผลดีที่สุด ซึ่งเทคนิคทินแลร์โครมาโทกราฟีก็มีผู้รายงานว่าเป็นวิธีที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน ไม่ได้ล้าสมัย และยังมีข้อดีกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทค นิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตรงที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้จำนวนมากในเวลาเดียวกัน ซึ่งเทคนิคโครมาโทกราฟีจะทดลองได้ใน 1 โครมาโทแกรมทีละ 1 ตัวอย่างเท่านั้น (Sherma, J. และ Fried,B.,2003)

การทดลองที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดฟาง ซึ่งทดลองวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลในเห็ดฟางสดที่เพิ่งจัดซื้อมาใหม่ พบว่า มีน้ำตาลทรีฮาโลสอย่างเดียว ในปริมาณเฉลี่ย 5.12 มิลลิกรัม /100 กรัมเห็ดสด แต่เมื่อจำลองสถานการณ์ ว่าเห็ดตกเกรดวางไว้ 1 วันที่อุณหภูมิห้อง

ก็สามารถตรวจพบน้ำตาลทรีฮาโลสได้สูงสุดประมาณ 24.80 มิลลิกรัม / 100 กรัมเห็ดสด ต่อจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเห็ดเริ่มเสียรูปทรงมีน้ำออกมาเยิ้ม โดยผลการตรวจหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสในวันที่ 3 จะพบว่า มีน้ำตาลทรีฮาโลสใกล้เคียงกับวันแรกที่เป็นเห็ดสด เนื่องจากไม่มีรายงานวิจัยของผู้ใดทำการตรวจสอบเช่นนี้มาก่อน จึงคาดว่า ผลการเก็บที่อุณหภูมิห้องแล้วพบว่า เกิดการกระตุ้นให้เห็ดมีน้ำตาลทรีฮาฌลสมากขึ้น อาจเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ หรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลให้ได้น้ำตาลทรีฮาโลส ออกมาจากเห็ดฟางมากขึ้น อย่างไรก็ตามผลการแช่เย็นก็พบในลักษณะเดียวกัน คือในวันที่ 1 ของการนำเห็ดฟางไปแช่เย็นจะทำให้น้ำตาลทรีฮาโลสมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น แม้จะไม่ทราบสาเหตุ แต่คาดว่าน่าจะเป็นผลจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ และเอนไซม์ ที่ทำงานได้อยู่ แม้จะอยู่ในที่เย็น แต่ก็ไม่ได้เย็นจัด อุณหภูมิในตู้เย็นอาจเหมาะสมกับการเกิดกิจ กรรมต่างๆได้ดี นอกจากนี้พบรายงานการทดลองแช่เห็ดหอมในช่องแช่แข็ง โดย Takao Terashita , et al., ในปี 2003 พบว่า ไม่มีผลกระทบต่อปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส ซึ่งเป็นผลจากการที่น้ำตาลทรีฮาโลสสามารถทดต่อภาวะกดดัน(stress)เมื่อถูกความเย็น ดังนั้นผลที่มีน้ำตาลทรีฮาโล สมากในเห็ดฟางแช่เย็นอาจเป็นเหตุผลเดียวกัน การทดลองในตอนนี้ทำให้ทราบข้อมูลว่า เห็ดเมื่อไม่สามารถจัดจำหน่ายได้ในวันแรก แต่ถ้านำไปแช่เย็นก็จะทำให้มีน้ำตาลทรีฮาโลสเพิ่มขึ้นมากในเนื้อเห็ด ดังนั้นการจะนำไปสกัดเตรียมเป็นน้ำตาลทรีฮาโลสที่มีราคาสูงมากกว่าราคาเห็ ดฟางสดมาก เป็นการเพิ่มมูลค่าแก่เห็ดฟางที่ไม่มีโอกาสจำหน่ายได้เพราะมีสีดำคล้ำไม่น่านำไปบริโภค

เมื่อพิจารณาถึงการแปรรูปเห็ดฟางเป็นอาหารอื่นๆที่บริโภคได้ ที่พบมีจำหน่ายคือ ทำการดองเห็ด ซึ่งในที่นี้ก็ได้ลองเลือกกระทำการดอง 3 วิธี คือ การดองด้วยน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 20 การดองด้วยน้ำส้มสายชู และ การนำเห็ดฟางไปแช่ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 ผลการตรวจทางคุณภาพวิเคราะห์เพื่อตรวจหาว่ามีน้ำตาลทรีฮาโลสหรือไม่ ก็พบว่า การดองใน 2 กรณีแรก สามารถให้ผลการตรวจสอบชัดเจน ว่าพบน้ำตาลทรีฮาโลสในตัวเห็ดที่ผ่านการดองแล้ว จึงทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลส พบว่า เห็ดที่ดองด้วยน้ำส้มสายชูมีปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสสูงกว่าการดองด้วยน้ำเกลือ คาดว่าเป็นผลจากมีรายงาน โดย Murao,et al., (1985) ได้รายงานผลถึงความทนทานของ

น้ำตาลทรีฮาโลสเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรด ดังนั้นการดองเห็ดในน้ำ ส้มสายชูซึ่งมีตัวกลางเป็นกรดอะซิติกนั่นเอง จะเป็นการทำให้เอนไซม์ทรีฮาเลสที่มีในพืชไม่สามารถตัดโครงสร้างของน้ำตาลทรีฮาโลสได้ในสภาวะกรด ผลการทดลองนี้จึงสอดคล้องกับผลการวิจัยที่มีรายงาน อย่างไรก็ตามการดองด้วยน้ำเกลือก็สามารถตรวจพบน้ำตาลทรีฮาโลสได้แม้จะพบปริ มาณน้อยกว่า แต่ก็คาดว่า เป็นผลจากทรีฮาโลสก็มีความทนต่อเกลือด้วย ทั้งนี้ได้มีรายงานการวิจัยการปลูกข้าวในที่เค็มโดย Ajay K. Garg,et al.,.(2002) พบว่า มีน้ำตาลทรีฮาโลสเกิดขึ้นในข้าว แสดงว่า ข้าวมีกลไกการปรับตัวให้ผลิตทรีฮาโลสได้แม้จะเติบโตในแหล่งอาหารที่มีเกลือมาก และมีรายงานการคงทนของน้ำตาลทร้อาโลสในสภาวะมีเกลือและอุณหภูมิสูงโดย Reina-Bueno M, et al. (2012) เช่นกัน จึงคาดว่า เหตุการณ์ที่ตรวจพบน้ำตาลทรีฮาโลสในเห็ดแช่น้ำเกลือก็คงเป็นเหตุผลลักษณะเดียวกัน

การทดลองในการศึกษาผลการแปรรูปทำให้ได้ข้อมูลว่า แม้เห็ดฟางตกเกรดจำหน่ายไม่ได้สามารถนำไปดอง ก็สามารถจะสกัดน้ำตาลทรีฮาโลสออกมาได้ แต่ ก็ควรทำในช่วงวันแรกๆๆของการแปรรูป เพราะยิ่งทิ้งไว้นานมาก เนื้อเห็ดอาจเปื่อยยุ่ยเสียหาย น้ำตาลทรีฮาโลสอาจถูกย่อยกลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้หมด

สุดท้ายของการวิจัยนี้ ทำการศึกษาวิธีการเต รียมน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางตกเก รดแล้วพบว่า วิธีที่ดีที่สุดควรจะเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางแช่เย็นที่แช่ในวันแรก แต่ก็อาจทำได้ไม่ควรเกิน 3 วัน เพราะเห็ดฟางจะเน่าเปื่อยหมดสภาพ ดังนั้นในสภาพจริงที่ผู้จะเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางสดแช่เย็นอาจทำไม่ทันก่อนที่น้ำตาลทรีฮาโลสจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส ก็อาจจะนำเห็ดฟางไปดองในน้ำส้มสายชูจะทำให้สามารถเตรียมน้ำตาลทรีฮาโลสได้มากที่สุดที่ระยะเวลาการดองประมาณ 2 วัน สำหรับวิธีที่จะแยกน้ำตาลออกจากเห็ดฟางนั้น ใช้วิธีสกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ก่อน แล้วนำไปแยกด้วยเทคนิคpreparative thin layer chromatography เพื่อแยกน้ำตาลทรีฮาโลสออกจากน้ำตาลกลูโคส จากนั้น สกัดน้ำตาลที่แยกได้จากวัฏภาคดูดซับที่อยู่นิ่งกับที่ ด้วยน้ำ แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดที่มีน้ำตาลทรีฮาโลส แต่อาจจะยังไม่บริสุทธิ์ ต้องนำไปตกผลึกใหม่ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อจะได้น้ำตาลทรีฮาโลสที่บริสุทธิ์ ในการทดลองนี้ได้ทดลองแยกน้ำตาลทรีฮาโลส

จากเห็ดฟางที่ดองในน้ำส้มสายชู ได้สารสกัดหยาบน้ำตาลเท่านั้ น คิดเป็นน้ำหนักร้อยละ 0.01 เท่านั้น ถ้าเพิ่มเห็ดฟางในระดับกิโลกรัมก็ควรจะได้สารสกัดหยาบประมาณ 0.1 กรัม ซึ่งน้อยมาก แต่เมื่อคิดว่าคัมค่ามากกว่าการทิ้งเห็ดฟางตกเกรดลงสู่ถังขยะ ซึ่งไม่มีมูลค่าใดเลย การที่ในการทดลองนี้ยังไม่สามารถทำการตกผลึกน้ำตาลออกมาให้บริสุทธิ์ได้นั้น เพราะตัวอย่างน้ำตาลที่ได้น้อยมาก ไม่คุ้มกับการตกผลึกซ้ำ และต้องทำการฟอกสีด้วยจึงต้องใช้เวลาอีกนานในการศึกษาในขั้นตอนนั้น

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการทดลองประยุกต์ความรู้ทางทฤษฎีของวิธีการแยกทางโครมาโทกราฟีมาทำการแยกน้ำตาลทรีฮาโลสจากเห็ดฟางที่ตกเกรด และอาจไม่สามารถจำหน่ายได้อีก โดยสามารถแยกและตรวจหาปริมาณน้ำตาลทรีฮาโลสได้จริง จัดเป็นงานวิจัยที่สามารถดำเนินการทางอุตสาหกรรมได้จริง แม้จะไม่สามารถแยกน้ำตาลทรีฮาโลสได้มากเท่าการเตรียมจากวัตถุดิบอื่น แต่ก็จัดเป็นวิธีพื้นฐานที่สามารถประยุกต์กับกา รใช้เห็ดฟางตกเกรดขายไม่ได้ แล้ว ให้นำไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า เนื่องจากน้ำตาลทรีฮาโลสมาตรฐานที่บริสุทธิ์หนัก 1 กรัม จำหน่าย ในราคาประมาณ 7000 บาท นับว่ามีคูลค่ามาก ข้อเสนอแนะ ควรมีการทดลองต่อเนื่องถึงกรรมวิธีทำให้บริสุทธิ์ เพราะเป็นขั้นตอนที่ต้องใช้เวลาศึกษานานระยะหนึ่ง ซึ่งไม่ได้ครอบคลุมในขอบเขตการวิจัยนี้

ข้อเสนอแนะที่น่าสนใจ เกี่ยวกับเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เมื่อเสียหาย อาจจะด้วยอายุการใช้งานของเครื่องนาน หลอดแหล่งกำเนิดแสงมีอายุกำหนดชั่วโมงไว้ เมื่อเกิดหมดอายุกระทันหัน ผู้วิจัยไม่สามารถจะสั่งซื้อได้เพราะเป็นส่วนวัสดุภัณฑ์ที่มีราคาประมาณแสนกว่าบาท การวิจัยเฉพาะทางเช่นนี้เป็นเรื่องเกี่ยวกับข้อมูลที่สำคัญบางครั้งจะนำไปทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการอื่นคงไม่สะดวก ดังนั้นทางสถาบันยุทธศาสตร์น่าจะมีการเอื้อให้สามารถจัดซ่อมเครื่องมือได้ในราคาระดับแสน

บรรณานุกรม

Ajay K. Garg, Ju-Kon Kim, Thomas G. Owens, Anil P. Ranwala, Yang Do Choi, Leon V. Kochian, and Ray J. Wu.(2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.PNAS.99(25): 15898-15903.

Arakawa.T.and Timasheff.S.N.(1982).Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemmistry*.21.pp.6536-6544

Bailey.R.W.(1958). The reaction of pentoses with anthrone. Biochem J. 68(4): 669–672.

Baron,D.N. and J. Economidis.J.(1963) Thin-layer chromatography for amino-acids and sugars. *J Clin Pathol.* 16(5): 484–486

Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 55, 4781–4788.

Cabib.E and Leloir.L.F.(1957).The biosynthesis of trehalose phosphate. *Journal of American Chemical Society*.75:259-275

Chen, J. N., Wang, Y. T., & Wu, J. S. B. (2009). A glycoprotein extracted from golden oyster mushroom pleurotus citrinopileatus exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:6706–6711.

Faccin, L. C., Benati, F., Rincao, V. P., Mantovani, M. S., Soares, S. A., Gonzaga, M. L.,

et al. (2007). Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from Agaricus brasiliensis against poliovirus type 1.*Letters in Applied Microbiology*, 45 : 24–28.

Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Abreu, R. M. V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. Current Medicinal Chemistry, 16, 1543–1560.

Garcia -Lafuente, A., Moro, C., Villares, A., Guillamon, E., Rostagno, M. A., D'Arrigo, M., et al. (2010). Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents. *Antiinflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 9:125–141.

Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Villares, A., et al. (2010). Edible mushroom: Their roles in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81: 715–723.

Haibo Zhao, Johnathan E. Holladay, Heather Brown, Z. Conrad Zhang (2007). "Metal Chlorides in Ionic Liquid Solvents Convert Sugars to 5-Hydroxymethylfurfural". *Science*. 316 (5782): 1597–1600.

Harry W. Lewis and Christopher J. Moody . *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice* (Illustrated ed.).(1989) WileyBlackwell. pp. 159–173.

Higashiyama.T.(2002).Novel functions and applications of trehalose.*Pure and Applies Chemistry*.74(7): 1263- 1269.

Hossain, S., Hashimoto, M., Choudhury, E. K., Alam, N., Hussain, N., Hasan, M., et al.(2003). Dietary mushroom (Pleurotus ostreatus) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30: 470–475.

Joan-Hwa Yans, Hsiu-Ching Lin and Jeng – lean Mau .(2001) Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*.72: 465-471.

Kidd.G and Devorak.J (1994). Trehalose is a sweet target for agrobiotech. *Biotechnology.* 12. :1328- 1329.

LEES TM, DEMURIA PJ.(1962). A simple method for the preparation of thin layer chromatography plates. *J Chromatogr.* 8:108–109.

Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., & Julich, W. D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 285–299.

Manzi, P., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L. (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73, 321–325.

Michiko Miyagi, Hirokazu Yokoyama, Toshifumi Hibi.(2007) Sugar microanalysis by HPLC with benzoylation: Improvement via introduction of a C-8 cartridge and a high efficiency ODS column, *Journal of Chromatography B*, 854 :286–290

Min-Young Kim, Ill-Min Chung ,Sun-Joo Lee ,et al., 2009. Comparison of free amino acid , carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms.Food Chemistry, 113:386-393.

Murao, Sawao; Nagano, Hiroto; Ogura, Sei; Nishino, Toyokazu. (1985)Enzymic synthesis of trehalose from maltose. Agricultural and Biological Chemistry , 49(7): 2113-18.

Paiva.C.L.A. and Panek.A.D.(1996).Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnolog.Annu*al *Review* .2:293-314.

Patist.A and Zoerb.H.(2005).Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems.*Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* .40:107 -113.

Poole, C. F.; Poole, S. K. (1994).Instrumental Thin-Layer Chromatography," *Anal. Chem. 66*, 27A.

Reina-Bueno M, Argandoña M, Salvador M, Rodríguez-Moya J, Iglesias-Guerra F, et al. (2012) Role of Trehalose in Salinity and Temperature Tolerance in the Model Halophilic Bacterium *Chromohalobacter salexigens*. PLoS ONE 7(3): e33587.

Roser. B. (1991).Trehalose a new approach to premium dry food. *Trends in Food Sci*ence and Technology.7: 166-169.

Roser. B and Caloco.C.A. (1993).A Sweeter way to fresher food.*New Scientist*. 15: 25-28.

Sherma.J.(2000).Review Thin layer Chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*,880:129 -147.

Sherma,J. and Bernard Fried,B. Handbook of Thin Layer Chromatography, 3 rd ed, Chromatographic Science Series . vol.89, Marcel Dekker, Inc. 2003.Switzerland.pp1295

Takeshita.K,Suga.A, Takada.G and Izumori.K.(2000).Mass production of D-Psicose from D-Fructose by continuos Bioreactor System Using ImmobilizedD-Tagatose3-Epimerase.*Journal of Bioscience and Bioenineering* .90.(4).pp 453-455.

Terashita,T, Yoshida,K., Suzuki,A., Sakai,T., Yoshikawa,K.,and Nagai . M.(2003). Effect of trehalose on the spawn storage in some edible mushroom fungi (2): Effect on preservation in the freezer.Mycoscience.44(1):71-74

Trevelyan, W. E.; Forrest, RS; Harrison, JS (1952). "Determination of Yeast Carbohydrates with the Anthrone Reagent". *Nature* **170** (4328): 626–627

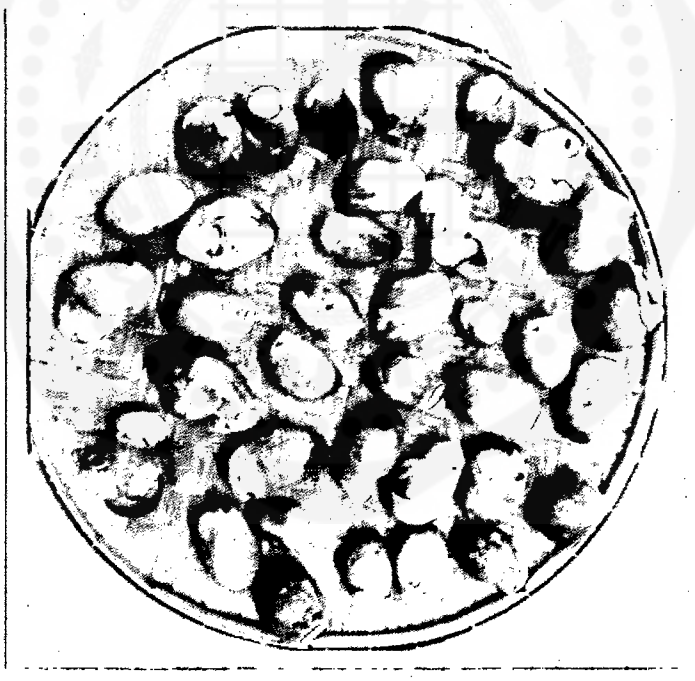
Wannet WJ, Op den Camp HJ, Wisselink HW, van der Drift C, Van Griensven LJ, Vogels GD. .(1998)Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom Agaricus bisporus .*Biochim Biophys Acta.* 16;1425(1):177-88.

Westh.P and Ramlov.H(1991).Trehalose accumulation in tartigrade *Adorybiotus coronifer* uring anhydrobiosis. *Journal of Experimental Zoology.*258.pp303-311.

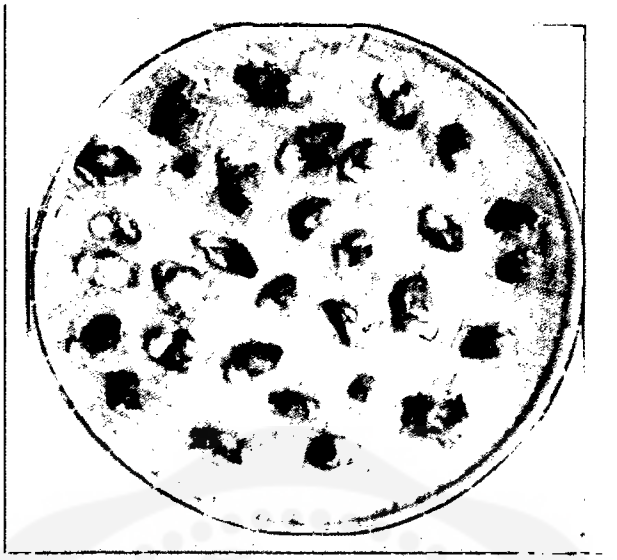
www.sigmaaldrich.com

ภาคผนวก

ภาพประกอบภาคผนวก 1 ตัวอย่างเห็ดฟางที่นำมาทดลอง

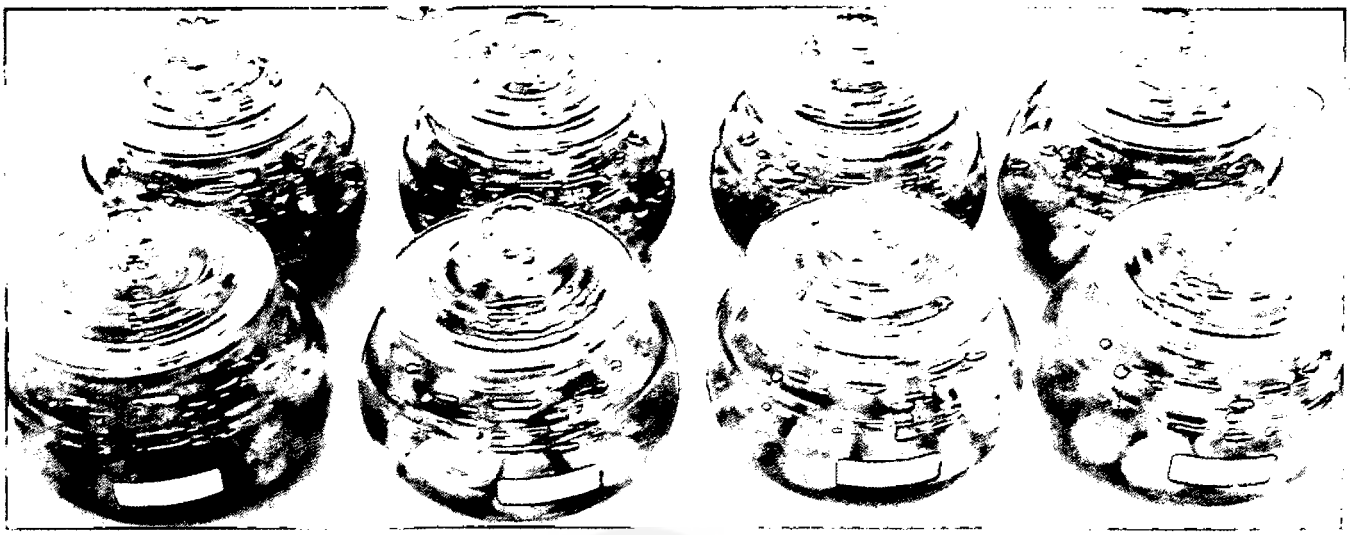


ภาพประกอบภาคผนวก 2 เห็ดฟางตกเกรดที่นำมาทดลองเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน



ภาพประกอบภาคผนวก 3 เห็ดฟางตกเกรดที่นำมาทดลองเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน

ภาพประกอบภาคผนวก 4 เห็ดฟางตกเกรดที่นำมาทดลองเก็บในตู้เย็นนาน 3 วัน



ภาพประกอบภาคผนวก 5 ตัวอย่างเห็ดฟางตกเกรดดอง

ภาพประกอบภาคผนวก 6 เห็ดฟางดองด้วยน้ำเกลือนาน 1 วัน

ภาพประกอบภาคผนวก 7 เห็ดฟางดองด้วยน้ำส้มสายชูนาน 1 วัน

ประวัติย่อผู้ทำวิจัย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง พรพิมล ม่วงไทย

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs Pornpimol Muangthai

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

โทรศัพท์ ทำงาน 02-6641000 ต่อ 8455

มือถือ 084-3285527

บ้าน 02-5520308

โทรสาร 02-2592097

E-mail pornpi @ swu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วท.บ.(เคมี) เกียรตินิยม อันดับ 2 จาก มหาวิทยาลัยศิลปากร ปี 2522

ปริญญาโท วท.ม.(เคมีวิเคราะห์) จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2524

ปริญญาเอก ปร.ด.(วิทยาศาสตร์การอาหาร)จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2546