บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ลำไย เป็นผลไม้เขตร้อนและกึ่งร้อนที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางจีนตอนใต้และบริเวณที่ราบต่ำของอินเดีย ศรีลังกา และพม่า (Tongdee, 1997) ซึ่งจัดอยู่ในตระกูล Sapindaceae จำแนกออกได้เป็น 2 ชนิด (species) ขึ้นอยู่กับลักษณะของลำต้น ผล เมล็ด และการใช้ประโยชน์ คือ สายพันธุ์ลำไยต้น *Euphoria longana* Lam. หรือ *Euphoria longana* Lour. หรือ *Dimocarpus longan* Lour. และอีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ ลำไยเถา *Euphoria scandens* Winit. Kerr. ใช้เป็นไม้ประดับ โดยตัดเป็นไม้พุ่มเตี้ยหรือปลูกเป็นไม้กันลม (Subhadrabundhu, 1990)

สำหรับประเทศไทยสันนิษฐานว่า มีการนำต้นลำไยเข้ามาจากประเทศจีนตอนใต้ และได้นำมาปลูกที่กรุงเทพฯและเชียงใหม่ ต่อมาได้แพร่พันธุ์กระจายไปทั่ว แหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทยอยู่ในเขตภาคเหนือตอนบน โดยเฉพาะจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน นอกจากนี้ยังมีพื้นที่ปลูกในภาคกลาง เช่น จังหวัดสมุทรสงครามและสมุทรสาคร ปัจจุบันการปลูกลำไยได้แพร่กระจายไปจังหวัดต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดเลย หนองคาย นครพนม และภาคใต้ เช่น จังหวัดพัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราช (พาวิน, 2543) พันธุ์ลำไยในประเทศไทยมีมากมายหลายพันธุ์ที่นิยมปลูกกันทั่วไป คือ พันธุ์ดอ สีชมพู แห้ว และเบี้ยวเขียว สำหรับพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุดในปัจจุบันนี้ คือ พันธุ์ดอ ซึ่งให้ผลผลิตคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมดในประเทศ การที่ชาวสวนนิยมปลูกพันธุ์ดอมากที่สุด เนื่องจากเป็นพันธุ์เบา สามารถเก็บเกี่ยวได้ก่อนทำให้ได้ราคาดีเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศและสามารถจำหน่ายได้ทั้งผลสดและนำไปแปรรูป (จริยาและคณะ, 2545)

ลำไยจัดได้ว่าเป็นผลไม้ยอดเยี่ยม (product champion) ซึ่งผู้บริโภคได้ให้ความนิยมบริโภคเพราะมีรสชาติหวาน และมีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากลำไยจัดได้ว่าเป็นผลไม้ที่ให้พลังงานแก่ผู้บริโภคสูงเป็นแหล่งของสารอาหารคาร์โบไฮเดรต มีน้ำตาลอยู่ 3 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ซึ่งมีอัตราส่วนของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่แตกต่างกันตามกระบวนการเมแทบอลิซึมระยะความแก่ และพันธุ์ (Jiang *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังให้สารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (ตารางที่ 1) และทางการแพทย์จีนแผนโบราณได้นำผลลำไยแห้งไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงหัวใจ บำรุงเลือด บำรุงประสาท ช่วยในการย่อยอาหาร แก้อาการเจ็บคอ และเสมหะเหลือง (พาวิน, 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของลำไย

คุณค่าทางโภชนาการ	เนื้อลำไยสด	เนื้อลำไยแห้ง	
		ลำไยไทย	ลำไยไต้หวัน
ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	81.10	17.80	24.00
ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	0.11	0.40	0.05
เส้นใย (เปอร์เซ็นต์)	0.28	1.60	1.90
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	0.97	4.60	5.20
เถ้า (เปอร์เซ็นต์)	0.56	2.86	3.70
คาร์โบไฮเดรต (เปอร์เซ็นต์)	16.98	72.70	65.12
พลังงานความร้อน(กิโลแคลอรี/100 กรัม)	305.70	1310.00	1180.00
แคลเซียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	5.70	27.70	30.00
เหล็ก (มิลลิกรัม/100 กรัม)	0.35	2.39	3.30
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/100 กรัม)	35.30	59.50	140.10
วิตามินซี (มิลลิกรัม/100 กรัม)	69.20	137.80	22.75
โซเดียม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	-	4.50	6.50
โพแทสเซี่ยม (มิลลิกรัม/100 กรัม)	-	2012.00	650.00
ไนอาซิน (มิลลิกรัม/100 กรัม)	-	3.03	2.85
กรดแพนโททีนิก (มิลลิกรัม/100 กรัม)	-	0.57	0.53
วิตามินบีสอง (มิลลิกรัม/100 กรัม)	-	0.37	1.45
วิตามินบีหนึ่ง (มิลลิกรัม/100 กรัม)	-	-	พบเล็กน้อย

(ที่มา : Tongdee, 1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะประจำพันธุ์ของลำไยพันธุ์ดอ

ลำไยพันธุ์ดอ เป็นลำไยกลุ่มกระโหลก เป็นพันธุ์เบา คือออกดอกและเก็บเกี่ยวผลก่อนพันธุ์อื่น การเจริญเติบโตเร็ว ให้ผลสม่ำเสมอออกผลทุกปีและให้ผลผลิตดีพอสมควร ผลมีขนาดปานกลางถึงค่อนข้างใหญ่น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 18.5 กรัม/ผล ทรงกลมแป้นเบี้ยวเล็กน้อย ยกบ่าข้างเดียว และบริเวณฐานผล (หัวขั้ว) นูน เส้นผ่านศูนย์กลางผลส่วนกว้างประมาณ 2.6 เซนติเมตร ส่วนแคบ 2.3 เซนติเมตร ส่วนสูงประมาณ 2.4 เซนติเมตร เปลือกมีสีเขียวปนน้ำตาล ผลลำไยที่

เจริญเติบโตเต็มที่ส่วนของ pericarp มี 3 ชั้น ชั้นนอกสุด หรือ epicarp เป็นชั้นที่มี cuticle ปกคลุม ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์ของ epidermis และ subepidermal sclerenchyma ชั้นกลางหรือ middle mesocarp ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ parenchyma ชั้นในสุดหรือ inner endocarp เป็นชั้นที่บางที่สุด ประกอบด้วย epidermal cells ที่ไม่มี suberin ปกคลุม pericarp จะมีสีเขียวจนกระทั่งผลเจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งช่วงนี้ส่วนของ pericarp มีการสังเคราะห์รงควัตถุสีเหลืองขึ้น ผิวผลมีลักษณะเป็นกระหรือตาห่างๆ กระสีน้ำตาลเข้ม เนื้อผลหนา สีขาวขุ่น ค่อนข้างเหนียวไม่กรอบ มีกลิ่นคาวเล็กน้อย รสหวาน หากเก็บรักษาไว้นานจะมีรสจืด เมล็ดมีสีน้ำตาลแก่ ขนาดโตพอประมาณ ลักษณะค่อนข้างแบน จุกไม่ใหญ่นัก ถ้าปล่อยให้แก่จัดจุกจะขยายใหญ่และแข็ง หรือที่เรียกว่า ขึ้นหัว (ดีรี, 2540 ; กลุ่มเกษตรกรสัญจร, 2542 และ Jiang *et al*., 2002)

ดัชนีการเก็บเกี่ยว

ดัชนีการเก็บเกี่ยวของผลลำไยพันธุ์ดอนับตั้งแต่ดอกเริ่มบานจนกระทั่งผลแก่ใช้เวลาประมาณ 21 สัปดาห์ ทั้งนี้ ขึ้นกับความผันแปรของฤดูกาล พื้นที่ปลูก และพันธุ์ (Tongdee, 1997) นอกจากนี้สามารถสังเกตุจากลักษณะทางกายภาพของผลลำไย คือ ผิวเปลือกด้านนอกเรียบ เปลือกด้านในมีลักษณะเป็นเส้นคล้ายร่างแห เมล็ดมีสีน้ำตาลแก่ เนื้อมีรสหวาน และจากลักษณะทางเคมีของผลลำไย คือ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้อยู่ในช่วง 16-22 เปอร์เซ็นต์ (Paull and Chan, 1987 อ้างโดย พาวิน, 2543)

การเก็บรักษาผลลำไย

ลำไยจัดเป็นผลไม้ประเภทบ่มไม่สุก (non – climacteric fruit) มีอัตราการหายใจที่อุณหภูมิ 10 และ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 8-12 และ 15-25 มิลลิลิตรของก๊าซ CO_2 / กิโลกรัม / ชั่วโมง ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีอัตราการผลิตก๊าซเอทธิลีนต่ำกว่า 0.1 ไมโครลิตรของก๊าซ C_2H_4 / กิโลกรัม / ชั่วโมง (Kader, 2002) ผลลำไยไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน เนื่องจากลักษณะภายนอกรวมทั้งกลิ่นและรสชาติมีคุณภาพด้อยลงและเน่าเสียได้ง่าย ในสภาพอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) พบว่า ผลลำไยมีอายุการเก็บรักษาเพียง 2-3 วัน เท่านั้น (Tongdee, 1997) หากเก็บรักษาผลลำไยไว้ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำ จะทำให้เปลือกแห้ง และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาผลลำไยควรประมาณ 85-90 เปอร์เซ็นต์ หากความชื้นสูงเกินไปจะเกิดการฉ่ำน้ำ (water soak) และเน่าเสีย (Jiang *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บรักษาผลลำไยที่อุณหภูมิต่ำ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากวิธีหนึ่ง เนื่องจากอุณหภูมิต่ำจะช่วยการชะลอกระบวนการเมแทบอลิซึมของผลิตผล ซึ่งเป็นผลให้ยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น สำหรับผลลำไยนั้น การเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิต่ำ ที่ระดับอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-95 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บรักษาได้นาน 5-6 สัปดาห์ (จริงแท้, 2542) และมีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 2-4 สัปดาห์ (Kader, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับดนัยและคณะ (2543)ได้เก็บรักษาผลลำไยที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสสามารถเก็บรักษาได้นาน 2 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ด้วย หากเก็บรักษาภายใต้สภาพอุณหภูมิต่ำกว่านี้จะทำให้ผลลำไยเกิดการสะท้านหนาวได้ เช่น พบว่าการเก็บรักษาผลลำไยที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส ทำให้ผลลำไยเกิดอาการสะท้านหนาวในเวลา 5-6 วัน ขณะที่ผลลำไยพันธุ์ Shixia ของจีนเกิดสีน้ำตาลที่ผิวเปลือก เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส ขณะที่พันธุ์ Wunoglin และ Wuyuan มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำกว่า พันธุ์ Shixia (Jiang *et al*., 2002)

อาการสะท้านหนาว

อาการสะท้านหนาวเป็นอาการผิดปกติทางสรีรวิทยาของพืช เนื่องจากได้รับอุณหภูมิต่ำ แต่ต้องเป็นอุณหภูมิต่ำในระดับที่สูงกว่าจุดเยือกแข็งของผลิตผลนั้นๆ ความเสียหายของอาการสะท้านหนาว มิได้เกี่ยวข้องกับการเกิดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ จึงต่างจากอาการ freezing injury พืชที่อ่อนแอต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวจะไวต่ออุณหภูมิต่ำตลอดทุกๆระยะการเจริญเติบโต รวมทั้งอวัยวะส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชนั้นก็จะอ่อนแอด้วย ยกเว้นในระยะเมล็ดแก่ที่แห้งแล้วเท่านั้น อาการสะท้านหนาวอาจจะเกิดได้ทั้งในพื้นที่เพาะปลูก ระหว่างการขนส่ง ระหว่างการเก็บ-รักษา ที่ตลาดขายส่งและขายปลีก หรือแม้กระทั่งในตู้เย็นบ้านทั่วๆไป (ดนัย, 2540) ส่วนใหญ่แล้วอาการสะท้านหนาวมักเกิดกับพืชที่มีแหล่งกำเนิดในเขตกึ่งร้อนและเขตร้อน เช่น กล้วย มะเขือเทศ มะม่วง และลำไย เป็นต้น (Wang, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะอาการสะท้านหนาว

เมื่อผลิตผลได้รับอุณหภูมิต่ำที่ทำให้เกิดอาการสะท้านหนาว ลักษณะอาการสะท้านหนาวจะค่อยๆ ปรากฏขึ้น โดยลักษณะอาการที่เกิดคล้ายกับการได้รับบาดแผล หรือปัจจัยความเครียดอื่นๆ (Wang, 1990) อาการสะท้านหนาวของผลิตผลแต่ละชนิดแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามมีอาการหลายอาการที่เป็นผลซึ่งเกิดมาจากการได้รับอุณหภูมิต่ำ มักเกิดรุนแรงเมื่อนำออกมาสู่อุณหภูมิที่ สูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดอาการสะท้านหนาว อาการที่เกิดขึ้นกับผลิตผลพอสรุปได้ดังนี้ (ดนัย, 2540)

1. การยุบตัวของผิว (surface pitting) เป็นอาการที่ผิวของผลิตผลยุบตัวลงเป็นแห่งๆ บริเวณที่ยุบตัวลงอาจจะมีสีผิดปกติไปจากเดิม นอกจากนั้นผลิตผลจะสูญเสียน้ำมาก ทำให้จุดนั้นขยายขนาดใหญ่ขึ้น พบมากในมะเขือเทศ (Whitaker, 1993) พริกหวาน (เพชรดา, 2540) และอะโวกาโด (Sanxter *et al.*, 1994)

2. การฉ่ำน้ำ เกิดจากการสลายตัวของโครงสร้างของเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียการเลือกผ่าน (membrane permeability) เป็นผลให้มีการปล่อยสารจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ไปอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์สามารถเข้าทำลายได้ง่าย ส่วนใหญ่เกิดกับใบต่อมาเกิดการเหี่ยวแห้งและตายไปในที่สุด เช่น พบในมะละกอ (Chen and Paull, 1986)

3. การเปลี่ยนสีของเนื้อและเปลือก เนื้อของผลไม้บางชนิดเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำจะเปลี่ยนจากสีปกติเป็นสีน้ำตาล โดยมักจะเกิดขึ้นโดยรอบๆ ท่อน้ำและท่ออาหาร การเปลี่ยนสีในลักษณะนี้อาจเป็นเพราะกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ที่ออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอลที่มีอยู่ในเซลล์ เช่น ส้มเขียวหวาน เกิดจุดสีน้ำตาลที่ผิวผล ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบฟีนอลเป็นเหตุให้มีการตายของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น (Martinez–Tellez and Lafuente, 1993) และพบอาการดังกล่าวที่เปลือกของผลลิ้นจี่ (สัณห์, 2538) และผลลำไย (ดนัยและคณะ, 2543 ; Jiang *et al.*, 2002) โดยเกิดเป็นจุดคล้ำสีน้ำตาลบริเวณเปลือกด้านในและด้านนอก

4. การสลายตัวของเนื้อเยื่อ ทำให้มีสารเมแทบอไลต์ต่างๆ เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล และแร่ธาตุต่างๆ ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์เข้าทำลายได้ง่าย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ติดอยู่ที่ผิวนอกของผักและผลไม้ในระหว่างการเก็บเกี่ยวและการขนย้ายเพื่อวางจำหน่าย ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการเน่าเสียมากขึ้น (ดนัย, 2540) การศึกษาโดยใช้ electron spin resonance (ESR) ต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆ ของพืช พบว่าอาการสะท้านหนาวมีผลโดยตรงต่อชั้นไขมันของเยื่อหุ้มที่เป็นของเหลว (membrane fluidity) ทำให้เนื้อเยื่อสูญเสียการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Wang, 1990) การยอมให้สารต่างๆ ผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถวัดได้จากอัตราการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ ซึ่งทำได้โดยวัดค่าการนำไฟฟ้าของชิ้นเนื้อเยื่อ (King and Ludford, 1983) ซึ่งพบว่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์มีค่าสูงขึ้นเมื่อเกิดอาการสะท้านหนาว (L'Heureux *et al.*, 1993) ตัวอย่างเช่น ผลเกรฟฟรุตที่แสดงอาการสะท้านหนาวมีการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์มากกว่าผลที่ไม่แสดงอาการสะท้านหนาว (McCollum and McDonald, 1991) เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ (ธเนศวร์, 2541) ผลลำไย (ดนัยและคณะ, 2544) และผลมะเขือเทศ (นันทวุฒิ, 2545) ดังนั้นจึงนิยมใช้ค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ในการประเมินการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งสามารถบ่งชี้ความรุนแรงของอาการสะท้านหนาวของผลไม้บางชนิดได้ด้วย

5. ขาดคุณสมบัติในการสุก ผลไม้ดิบที่แก่จัดหลายชนิดเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานานพอสมควร อาจเสียคุณสมบัติในการสุกเมื่อนำไปบ่ม

6. เร่งอัตราการเสื่อมสภาพของผลไม้ให้เกิดเร็วขึ้น เช่น ผลลำไยที่เกิดอาการสะท้านหนาวจะเกิดการเสื่อมสภาพ และแสดงอาการเน่าเสียจากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ได้ง่ายกว่าผลลำไยที่ไม่เกิดอาการสะท้านหนาว (ดนัยและคณะ, 2543)

7. ส่วนประกอบทางเคมีเปลี่ยนแปลงไป มักมีกลิ่นและรสชาติผิดปกติ

8. ขาดคุณสมบัติในการเจริญต่อเนื่อง เช่น ไม่สามารถงอกได้ ซึ่งจะส่งผลเสียไปถึงส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ของพืชที่เก็บรักษาในสภาพที่อุณหภูมิต่ำเกินไป

9. มีอายุการเก็บรักษาที่สั้นลง อันเนื่องมาจาก สาเหตุต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

อาการที่ได้กล่าวมาแล้วทั้งหมดนี้ อาจจะเกิดขึ้นเพียงอาการใดอาการหนึ่งหรือหลายอาการร่วมกันทั้งนี้แล้วแต่ชนิดของผลไม้ ระดับอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ

ลักษณะอาการสะท้านหนาวของผลลำไย

อาการสะท้านหนาวของผลลำไยจะแสดงอาการที่ผิวของเปลือกเป็นสีคล้ำ รสชาติผิดปกติและเน่าเสียง่าย (Kader, 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาของดนัยและคณะ (2543) ที่รายงานว่าเมื่อเก็บรักษาผลลำไยที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส ผลลำไยแสดงอาการสะท้านหนาว โดยผิวเปลือกเปลี่ยนเป็นสีคล้ำลงทั้งด้านในและด้านนอก มีการรั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์จากเนื้อเยื่อของเปลือกเพิ่มขึ้นมากกว่าผลลำไยปกติ โดยสีเปลือกด้านในของผลลำไยเป็นดัชนีบ่งบอกถึงการเกิดอาการสะท้านหนาวได้ดีกว่าสีเปลือกด้านนอก เพราะมีสีแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด และการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รั่วไหลของสารอิเล็กโตรไลต์ที่เนื้อไม่สามารถบอกถึงอาการสะท้านหนาวได้ แต่ที่เปลือกสามารถทำนายอาการสะท้านหนาวได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดอาการสะท้านหนาว

1. ระยะความแก่ (maturity) ผลไม้ขณะสุกจะมีความต้านทานต่ออาการสะท้านหนาวมากกว่าผลไม้ที่ยังไม่สุก ผลไม้ที่ยังไม่สุกถ้าผ่านการสะท้านหนาวจะไม่สุก หรืออาจสุกได้คุณภาพไม่ดี หรืออาจสุกช้ากว่าปกติ เช่น ผลอะโวกาโดทั้งพันธุ์ Hass และ Fuerte จะต้านทานต่ออาการสะท้านหนาวในระยะ post climacteric ซึ่งในระยะดังกล่าวผลอะโวกาโดทั้งสองพันธุ์สามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6-7 สัปดาห์ ส่วนผลอะโวกาโดที่อยู่ในระยะ climacteric peak จะอ่อนแอต่ออาการสะท้านหนาวโดยผลจะแสดงอาการเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสนาน 19 วัน (ดนัย, 2540) การเก็บรักษาพริกหวานพันธุ์ Bison และ Doria ที่สุกไว้ที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ พบว่าพริกหวานที่สุกไม่แสดงอาการสะท้านหนาว ขณะที่พริกหวานระยะแก่จัดมีสีเขียวแสดงอาการสะท้านหนาว (Lin *et al.*, 1993)

2. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์สูง จะช่วยลดความอ่อนแอของผลิตผลต่ออาการสะท้านหนาวได้ ซึ่งพบได้ในผลมะม่วง และอะโวกาโด (ดนัย, 2540) กล่าวคือ การเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการเก็บรักษาผลอะโวกาโดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ช่วยลดอาการสะท้านหนาวได้ (Marcellin and Chaves, 1983)

3. ลักษณะทางพันธุกรรม ผลิตผลที่ผลิตได้จากแหล่งต่างกัน หรือพันธุ์ต่างกันอาจแสดงอาการสะท้านหนาวแตกต่างกันได้ ถึงแม้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิเดียวกันก็ตาม โดยเฉพาะผลิตผลเมืองร้อน ส่วนประกอบทางเคมีของเยื่อหุ้มเซลล์จะต่างไปจากผลิตผลเขตอบอุ่น จึงทำให้มีความอ่อนแอต่ออุณหภูมิต่ำ ในแอปเปิลแต่ละพันธุ์จะอ่อนแอต่อลักษณะ low temperature breakdown ไม่เหมือนกัน เช่น ในพันธุ์ McIntoch แสดงอาการไส้มีสีน้ำตาล (brown core) พันธุ์ Yellow Newtown แสดงอาการ internal breakdown พันธุ์ Grimes Golden แสดงอาการ soggy breakdown พันธุ์ Jonathan แสดงอาการ soft scald แสดงให้เห็นว่าความอ่อนแอหรือการแสดงอาการสะท้านหนาวนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะทางกรรมพันธุ์ของผลิตผล (ดนัย, 2540)

4. ธาตุอาหาร การแทรกซึม (infiltration) ของสารละลายแคลเซียมเข้าไปในผลอะโวกาโดจะช่วยลดอาการสะท้านหนาวได้ นอกจากนี้การจุ่มผลแอปเปิลลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์หลังการเก็บเกี่ยวสามารถลดอาการสะท้านหนาวของแอปเปิลพันธุ์ Jonathan ได้ แคลเซียมอาจจะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

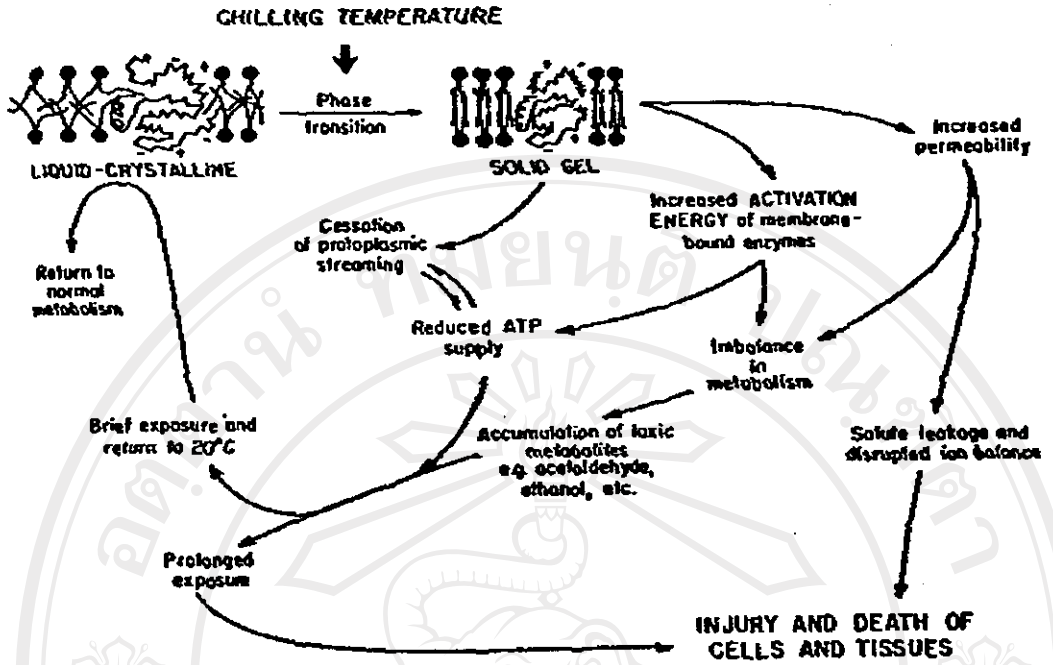
เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ ธาตุอาหารที่ปรากฏอยู่ในต้นและผลแอปเปิลมีผลกระทบต่ออาการสะท้านหนาวโดยตรง เช่น ผลแอปเปิลซึ่งมีปริมาณธาตุฟอสฟอรัส และแคลเซียมต่ำจะอ่อนแอต่ออาการสะท้านหนาว (ดนัย, 2540)

5. การทำให้ผลิตผลเคยชิน (acclimation) ต่ออุณหภูมิต่ำ พืชบางชนิดที่ได้รับความเย็นเป็นช่วงสั้นๆ แต่ไม่ใช่ที่อุณหภูมิที่ทำให้เกิดอาการสะท้านหนาว จะทำให้เนื้อเยื่อเคยชินต่ออุณหภูมิต่ำ ซึ่งจะช่วยลดความอ่อนแอต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวได้ (ดนัย, 2540)

การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของพืชต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวที่อุณหภูมิต่ำ

การเกิดอาการสะท้านหนาวมีข้อสันนิษฐานว่าเกิดขึ้นเนื่องจากส่วนประกอบทางเคมีของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเยื่อหุ้มอวัยวะภายในเซลล์บางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มนั้นผิดปกติไป ส่งผลให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการทางสรีรวิทยาภายในเซลล์ขึ้น และส่งผลให้เซลล์ตายได้ในที่สุด เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย และเยื่อหุ้มอวัยวะภายในเซลล์อื่นๆ มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเหมือนกัน คือ ประกอบไปด้วยชั้นของฟอสโฟลิพิดและโปรตีน เยื่อหุ้มเหล่านี้ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ นอกจากนั้นยังเป็นบริเวณที่มีกระบวนการสำคัญต่างๆ เช่น การหายใจและการสังเคราะห์แสงเกิดขึ้น ภายหลังการเก็บเกี่ยวผลิตผลเยื่อหุ้มเหล่านี้เสื่อมสภาพลง ทำให้การควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เสื่อมลงด้วย ส่งผลให้สารตั้งต้น (substrate) มีโอกาสสัมผัสกับเอนไซม์ได้โดยขาดการควบคุม ทำให้เซลล์ขาดสมดุล และตายในที่สุด ผลิตผลแต่ละชนิดสามารถทนต่อการสะท้านหนาวได้ต่างกัน ซึ่งมีผู้สันนิษฐานว่าเกิดเนื่องจากกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์ของผลิตผลเหล่านี้แตกต่างกัน คือ พวกที่เกิดอาการสะท้านหนาวได้ง่าย เป็นพวกที่มีกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดซึ่งจะเปลี่ยนสภาพทางกายภาพจากลักษณะที่เป็นของเหลว (liquid crystalline) มาเป็นลักษณะแข็ง (solid gel) ทำให้การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์นั้นเสื่อมลง ก่อให้เกิดผลเสียต่างๆ ตามมา เช่น การสะสมของสารพิษทำให้ผลิตผลเสื่อมคุณภาพลงและตายไปในที่สุด (ภาพที่ 1) ส่วนผลิตผลที่ทนต่ออุณหภูมิต่ำจะมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เป็นองค์ประกอบเป็นส่วนใหญ่ เมื่ออุณหภูมิต่ำลงก็ยังคงรักษาสถานะที่เป็นของเหลวอยู่ได้ (จริงแท้, 2542)

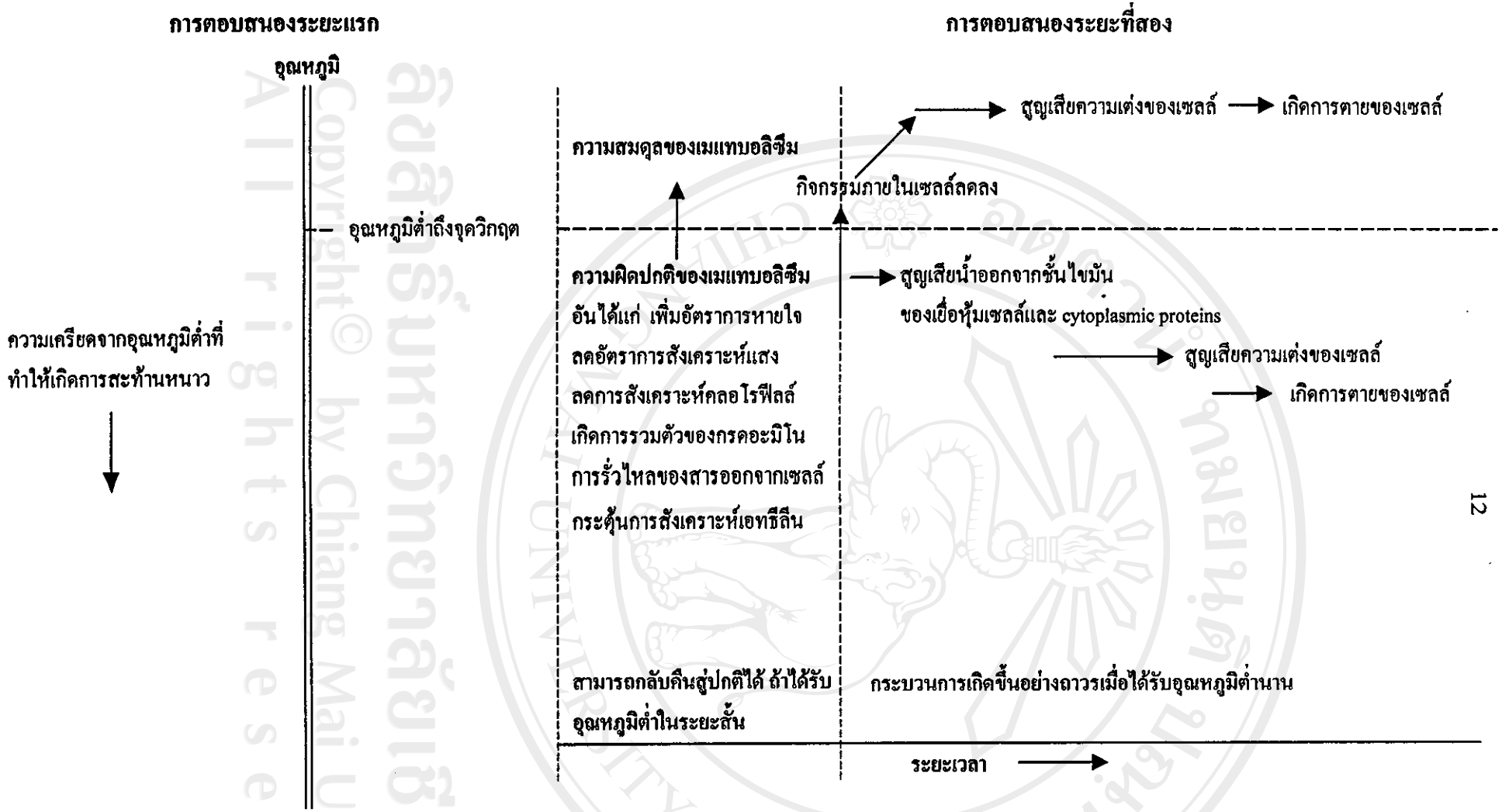
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 1 สมมุติฐานของกระบวนการทางสรีรวิทยาที่ก่อให้เกิดอาการสะท้านหนาวในพืช
(Lyons, 1973)

นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและชีวเคมีเกิดขึ้นอย่างมากมายในพืชที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ ระดับการเปลี่ยนแปลงและความสามารถของพืชที่จะทนต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นได้หรือไม่เป็นสิ่งกำหนดว่าพืชชนิดนั้นจะทนหรืออ่อนแอต่ออาการสะท้านหนาว การตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืชที่อ่อนแอต่ออุณหภูมิต่ำ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะแรก (primary response) เป็นการเปลี่ยนสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์จากลักษณะของไหลเป็นสภาพคล้ายวุ้นที่แข็งตัว การเปลี่ยนแปลงสภาพของเยื่อหุ้มอาจนำไปสู่การตอบสนองในระยะที่สอง (secondary response) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ถาวรหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ได้รับ และระยะเวลาที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ การเปลี่ยนแปลงขั้นต้นจะนำไปสู่การเสีย membrane integrity เกิดการรั่วไหลของสารละลาย เยื่อหุ้มหมดคุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ออร์กะเนลล์ต่างๆ ออกจากกัน อัตราการหายใจของไมโตครอนเดรียลดลง เอนไซม์ที่ติดอยู่กับเยื่อหุ้มต่างๆ มี energy of activation สูงขึ้น จากนั้นการไหลของโปรโตพลาสซึมในเซลล์หยุดชะงัก อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง เซลล์ออร์กะเนลล์ทำงานไม่ได้ และเกิดความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึม มีการสะสมสารพิษภายในเซลล์ นำไปสู่การแสดงอาการสะท้านหนาว และการตายของเนื้อเยื่อในที่สุด (ภาพที่ 2) (ดนัย, 2540 ; Wang, 1982)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 โครงสร้างของการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำในพืชพันธุ์ที่อ่อนแอต่ออาการสะท้านหนาว (Wang, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การลดความรุนแรงของอาการสะท้านหนาว

การลดอาการสะท้านหนาวเป็นการเพิ่มความทนทานของเนื้อเยื่อพืชต่ออุณหภูมิต่ำก่อนการเก็บรักษา และการชะลอหรือลดการพัฒนาอาการสะท้านหนาวของพืชภายหลังได้รับอุณหภูมิต่ำ การลดอาการสะท้านหนาวสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรมของพืช การใช้สารเคมี การใช้ฮอร์โมนพืช การควบคุมสภาพบรรยากาศ การได้รับอุณหภูมิสูงสลับการได้รับอุณหภูมิต่ำ การลดอุณหภูมิลำดับขั้น และการใช้อุณหภูมิสูงก่อนการเก็บรักษา (Wang, 1990) ซึ่งวิธีการลดความรุนแรงของอาการสะท้านหนาวที่น่าสนใจที่สุด คือ การให้อุณหภูมิสูงก่อนการเก็บรักษาเนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก ประหยัด และปลอดภัยเนื่องจากไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผลิตผล นอกจากนี้ยังมีผลต่อการควบคุมโรคและแมลงหลังการเก็บเกี่ยวได้ด้วย (Ferguson *et al* ., 2000)

การใช้อุณหภูมิสูงก่อนการเก็บรักษา

การใช้อุณหภูมิสูงไม่ว่าจะเป็นอากาศร้อน น้ำร้อน หรือไอน้ำ ก่อนการเก็บรักษาผลิตผลจะช่วยเพิ่มความทนทานต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวในผักและผลไม้บางชนิดได้ โดยระดับอุณหภูมิที่ใช้กับผลิตผลก่อนการเก็บรักษานั้นขึ้นอยู่กับอัตราการนำความร้อนของผลิตผลซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิด พันธุ์ ขนาด รูปร่าง และสัณฐานวิทยาของผลิตผลด้วย (Paull and Chen, 2000)

Sanxter *et al.* (1994) รายงานว่า การเก็บรักษาผลอะโวกาโดพันธุ์ Sharwil ที่อุณหภูมิ 37-38 องศาเซลเซียส นาน 17-18 ชั่วโมงก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1.1 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน สามารถลดอาการสะท้านหนาวของผลอะโวกาโดได้ เช่นเดียวกับ Nishijima *et al.* (1995) รายงานว่า การเก็บรักษาผลอะโวกาโดพันธุ์ Sharwil ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 8-12 ชั่วโมงก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 2.2 องศาเซลเซียส ทำให้อาการสะท้านหนาวของผลอะโวกาโดลดลง นอกจากนี้ การใช้อากาศร้อนที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 3, 6 และ 10 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที กับผลอะโวกาโดพันธุ์ Hass ก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส สามารถลดอาการสะท้านหนาว ซึ่งเกิดที่ผิวภายนอกได้ (Woolf *et al.*, 1995) การเก็บรักษาผลอะโวกาโดพันธุ์ Hass ไว้ในอากาศร้อนอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 6-12 ชั่วโมง ก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ช่วยป้องกันผลอะโวกาโดจากการสะท้านหนาวได้ และพบว่า การเก็บรักษาผลอะโวกาโดที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 3, 6 หรือ 10 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นานครึ่งชั่วโมงก่อนการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2 องศา-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลเซียส ช่วยลดอาการสะท้านหนาวซึ่งเกิดที่ผิวภายนอกของผลอะโวกาโดพันธุ์ Hass ได้เช่นกัน (Florissen *et al.*, 1996)

การแช่ผลมะเขือเทศดิบในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีแล้วเก็บรักษาไว้ในอากาศอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ช่วยลดอาการสะท้านหนาวของผลมะเขือเทศได้ เช่นเดียวกันกับ Hakim and Voipio (1995) ที่รายงานว่า การแช่ผลมะเขือเทศดิบในน้ำที่มีอุณหภูมิ 38-46 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2, 4 หรือ 6 สัปดาห์ และเมื่อนำผลมะเขือเทศมาแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน สามารถลดอาการสะท้านหนาวของผลมะเขือเทศได้ (นันทวุฒิ, 2545)

การใช้อุณหภูมิสูงก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำยังมีผลชักนำให้ผลิตผลเกิดการสร้างโพลีเอมีน (polyamines) เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้เกิดความต้านทานต่ออาการสะท้านหนาวได้ พบว่าผลมะนาวฝรั่ง และผลเกรฟฟรุต ที่แช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส มีพูทรีสซีน (putrescine) เพิ่มขึ้น (Rodov *et al.*, 1995) ส่วนทับทิมที่ผ่านการแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 และ 28 วัน พบว่า ระดับของโพลีเอมีนเพิ่มขึ้นภายหลังจากการแช่น้ำร้อน (Artes *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการแช่ผลส้มพันธุ์ Fortune ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที และอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน สามารถลดอาการสะท้านหนาวของผลส้มและมีปริมาณของโพลีเอมีนเพิ่มขึ้นด้วย (Rodov *et al.*, 1995) จึงเชื่อกันว่าความต้านทานต่ออาการสะท้านหนาวนั้นเกิดขึ้นในช่วงที่ได้รับอุณหภูมิสูงโดยเนื้อเยื่อสามารถที่จะเมแทบอไลต์สารพิษ ซึ่งสะสมขึ้นในระหว่างที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ และเนื้อเยื่อสามารถสร้างสารที่ขาดหายไปขึ้นมาทดแทนได้ (ดนัย, 2540)

อุณหภูมิสูงเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อพืช ในพืชแต่ละชนิดเมื่อได้รับอุณหภูมิสูงจะมีกลไกการตอบสนองที่แตกต่างกัน เพื่อเพิ่มความทนทานต่อความเครียดที่เกิดขึ้น โดยการป้องกันและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ หรือโดยการสร้างอวัยวะที่รับรู้ความเครียดที่มากระทบเพื่อทำให้สามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอด กลไกอย่างหนึ่งที่พืชใช้ในการปรับตัวคือการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษ ขึ้นมา เรียกว่า Heat Shock Proteins (HSPs) (Ferguson *et al.*, 2000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Heat Shock Proteins (HSPs)

HSPs ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1962 จากการศึกษาโครโมโซมต่อมน้ำลายของตัวอ่อนแมลงหวี่ (*Drosophila buschkii*) ที่ได้รับความร้อนในระดับที่ไม่ถึงขั้นเสียชีวิต (Ritossa, 1962) ซึ่งอีก 10 ปีต่อมาพบว่าเมื่ออุณหภูมิสภาพแวดล้อมเพิ่มสูงขึ้น 5-10 องศาเซลเซียส จากระดับอุณหภูมิปกติชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนส์ของสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่สิ่งมีชีวิตที่มีเซลล์เดียวไปจนถึงสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งเป็นผลมาจากยีนส์ส่วนใหญ่ที่มีกิจกรรมก่อนหน้านี้ถูกแปลรหัสลดลง การสังเคราะห์โปรตีนปกติถูกระงับ และมีการแสดงออกของโปรตีนชนิดพิเศษเกิดขึ้น (HSPs) (Nover, 1991)

ปัจจุบันปัจจัยต่างๆ อันได้แก่ การได้รับสารเคมีต่างๆ เช่น โลหะหนักและโซเดียม-อาเซไนท์ การมีอนุมูลอิสระจำนวนมาก ความเครียดจากค่าออสโมซิสของน้ำ การได้รับแสงหรือรังสีต่างๆ มากเกินไป การขาดธาตุอาหาร การขาดออกซิเจน การเจ็บป่วย และการติดเชื้อไวรัส สามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ HSPs ได้เช่นกัน (Diarra *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการรักษาตัวเองของเซลล์ให้สามารถมีชีวิตรอดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (คนัยและอังสนา, 2540) ผลการศึกษาในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตสามารถแบ่ง HSPs ตามน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 5 ชนิด คือกลุ่มที่หนึ่ง HSP100 มีน้ำหนักโมเลกุล 104-110 กิโลดาลตัน กลุ่มที่สอง HSP90 มีน้ำหนักโมเลกุล 80-95 กิโลดาลตัน กลุ่มที่สาม HSP70 มีน้ำหนักโมเลกุล 63-78 กิโลดาลตัน กลุ่มที่สี่ HSP60 มีน้ำหนักโมเลกุล 53-62 กิโลดาลตัน และกลุ่มที่ห้า เป็น HSPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำตั้งแต่ 17-30 กิโลดาลตันรวมทั้งโปรตีนในกลุ่ม ubiqutin ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 8.5 กิโลดาลตัน (Neumann *et al.*, 1989 ; Nover, 1991)

Heat Shock Preteins (HSPs) ที่พบในพืช

HSPs ในพืชถูกค้นพบครั้งแรกในถั่วเหลือง (Barnett *et al.*, 1980) HSPs ที่พบในพืชชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ หรือเรียกว่า Small Heat Shock Proteins (smHSPs) พืชบางชนิดอาจมี smHSPs ที่แตกต่างกันถึง 40 ชนิด (Vierling, 1991) การสะสม smHSPs ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะแปรผันไปตามอุณหภูมิที่ได้รับ และระยะเวลาที่ได้รับความเครียดจากอุณหภูมิสูงซึ่งเป็นอุณหภูมิในระดับที่ต่ำกว่าขั้นเสียชีวิต จะก่อให้เกิดการสร้างและสะสม smHSPs มากที่สุด และ smHSPs บางชนิดมีเสถียรภาพภายหลังได้รับความเครียด โดยมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 30-50 ชั่วโมง (Chen *et al.*, 1990) smHSPs แสดงออกอย่างเป็นอิสระในระหว่างที่ได้รับความเครียดในช่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

meiotic prophase (Dietrich *et al.*, 1991) microsporogenesis (Zarsky *et al.*, 1995) seed development และใน somatic embryos (Dong and Dunstan,1996) นอกจากนี้ยังพบใน vegetative organs บางชนิด เช่น ในรากของ *Craterostigma plantagineum* (Alamillo *et al.*, 1995) และเนื้อเยื่อพาเรนไคม่าของต้นหม่อนในเขตหนาว (Ukaji *et al.*, 1999) smHSPs ในพืชถูกแปลรหัสจากยีนส์ที่แตกต่างกันหลายชนิดจึงสามารถสังเคราะห์ได้ตามอวัยวะที่แตกต่างกัน ในพืชชั้นสูงสามารถแบ่ง smHSPs ได้เป็น 5 กลุ่ม ตามอวัยวะที่สังเคราะห์ คือ กลุ่มที่หนึ่ง Cytosolic *I* และกลุ่มที่สอง Cytosolic *II* สังเคราะห์ที่ไซโตซอล กลุ่มที่สาม สังเคราะห์ที่คลอโรพลาสต์ กลุ่มที่สี่ สังเคราะห์ที่ไมโตคอนเดรีย และกลุ่มที่ห้า สังเคราะห์ที่เอนโดพลาสมิคเรติคิวลัม (Lenne *et al.*, 1995)

โครงสร้างและชีวเคมีของ Small Heat Shock Proteins (smHSPs)

smHSPs ในพืชนั้นมีการเรียงลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน alpha-crystalline ที่เป็นส่วนประกอบของเลนส์ตาในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Plesofsky–Vig *et al.*, 1992) จึงเรียกลำดับของกรดอะมิโนดังกล่าวว่า alpha – crystalline domain หรือ small heat shock protein domain ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนประกอบด้วย หน่วยย่อยที่มีกรดอะมิโนที่สอดคล้องกัน 2 หน่วย คือ หน่วยที่หนึ่ง เรียกว่า consensus *I* เป็นโครงสร้างของโปรตีนที่มีกรดอะมิโนยาว 27 หน่วยที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 9 หน่วยที่เหมือนกัน และกรดอะมิโน 7 หน่วยที่จัดเป็น conservative replacement ลำดับของกรดอะมิโน (conservative motif) ดังกล่าวจะมี ลำดับเป็น Pro-X (14)-Gly-Val-Leu พบ consensus *I* อยู่ใน smHSPs ของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตทุกชนิด (Lindguist and Craig, 1988) ส่วนหน่วยที่สอง เรียกว่า consensus *II* เป็นโครงสร้างของโปรตีนที่มีกรดอะมิโนยาว 29 หน่วย ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโน (conservative motif) ที่คล้ายกับ consensus *I* คือ Pro-X(14)-X-Val / Leu / Ile- Val / Leu / Ile นอกจากนี้ smHSPs ยังมี amino – terminal domains ที่แตกต่างไปตามส่วนประกอบต่างๆ ของพืช ตัวอย่างเช่น ในคลอโรพลาสต์มีโปรตีนที่มีกรดอะมิโน methionine อยู่เป็นจำนวนมากในส่วนปลายของด้าน N – terminal (Water *et al.*, 1996)

ผลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า smHSPs มีหน่วยโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างไปจากหน่วยโครงสร้างของโปรตีนที่พบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต คือ มีโครงสร้างแบบ oligomeric quaternary structure และใน native state มีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงมากถึง 200-800 กิโลดาลตัน (Suzuki *et al.*, 1998) ส่วนโครงสร้างที่เป็น homo – oligomers จะเป็นโครงสร้างของ smHSPs

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่พบทั่วไปในพืช ซึ่งประกอบด้วย alpha – crystalline domain ที่ต้องมีส่วนของ N–terminal สำหรับการเกิด oligomerization (Leroux *et al.*, 1997)

smHSPs มีรูปร่างลักษณะที่ซับซ้อนอันเนื่องมาจากการเรียงลำดับของกรดอะมิโนที่จำเพาะ จากคุณสมบัติของโปรตีนทำให้สามารถใช้เทคนิค cryoelectron microscopy เพื่อศึกษา recombinant protein : human alphaB-crystalline พบว่า มีโครงสร้างแบบ quaternary structure ที่มีการรวมตัวกันแบบไม่สมมาตร (Wieske *et al.*, 1999) และโครงสร้างผลึกของ HSP16.5 จาก *Methanacoccus jannaschii* มีรูปร่างเหมือน hollow sphere ที่ประกอบด้วยทรงสามเหลี่ยม 8 อัน (eight trigonal) และทรงสี่เหลี่ยม 6 อัน (six square) เปรียบเสมือน "windows" ซึ่งรูปร่างลักษณะดังกล่าวมีความจำเป็นสำหรับกิจกรรมที่ตอบสนองต่อความเครียดต่างๆ ของ smHSPs มีส่วนทำให้โครงสร้างของ smHSPs จากกระบวนการ oligomerization เกิดขึ้นและรวมตัวกันอย่างรวดเร็ว เพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากภายนอก และป้องกันอันตรายให้โปรตีนชนิดอื่น (Kim *et al.*, 1998)

การย้อมสีโปรตีนโดยใช้ hydrophobic dyes 8- anilino – 1 – napthalene sulfonate (ANS) และ 1,1' –bi (4 - anilino) naphthalene –5,5' – disulfonic acid (bis - ANS) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ smHSP พบว่า alpha – crystallin หรือ Small Heat Shock Protein มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนโดยมีส่วนของ hydrophobic sites ที่พบบนผิวของ smHSP เพิ่มขึ้นซึ่งขึ้นอยู่กับระดับของอุณหภูมิที่ได้รับ (Lee *et al.*, 1995) นอกจากนี้ smHSPs ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถเกิดการ phosphorylation เพื่อตอบสนองต่อสภาพเครียดและปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญได้ (Rouse *et al.*, 1994) ส่วน smHSPs ของพืชไม่พบว่ามีการเกิด phosphorylation เนื่องจากไม่มีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็น recognisable phosphorylation motifs (Water *et al.*, 1996)

การสังเคราะห์ Heat Shock Proteins (HSPs)

ในระหว่างที่พืชได้รับความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิสูงจะทำให้การแปลรหัสของยีนส์เปลี่ยนแปลงไป พบว่า กิจกรรมของ mRNAs ปกติที่อยู่ในโพลีโซม (polysome) ถูกระงับและถูกเคลื่อนย้ายออกจากโพลีโซม เพื่อนำไปเก็บไว้ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของพืชในระหว่างที่พืชได้รับอุณหภูมิสูง ต่อมาจะเกิดการแปลรหัสของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยอุณหภูมิสูงโดยเฉพาะ HSPs อย่างทันทีหลังจากที่พืชได้รับความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิสูง (Nover, 1991) การถอดรหัสและการแปลรหัสของ mRNAs ปกติที่ถูกยับยั้งจะไม่ถูกย่อยสลายไปในระหว่างที่พืชได้รับอุณหภูมิสูง แต่จะถูกแยกออกไปเนื่องจากพืชมีกลไกที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้เมื่อการตอบสนองด้วย HSPs หยุดลง (Lindguist and Craig., 1988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลไกของการสังเคราะห์ HSPs เริ่มแรกเมื่อพืชได้รับสัญญาณที่อยู่ใน RNA และ protease – containing particles เรียกว่า โปรทีโซม (proteasomes) หรือ ใน large RNA - containing particles เรียกว่า HSG ทำให้การแปลรหัสของ mRNAs ปกติถูกระงับและถูกแยกออกไปเก็บไว้ดังกล่าว (Stuger *et al.*, 1999) ต่อมาการสังเคราะห์โปรตีนที่มีแปลรหัสของ mRNAs ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่โพลีโซมทำให้ HSPs ถูกสังเคราะห์ขึ้นเป็นจำนวนมากแทนที่โปรตีนปกติ ในขณะที่การแปลรหัสที่ไซโตพลาสซึมทำให้ได้ smHSPs และ mRNAs เพียงบางส่วนซึ่งเหมือนกับการแปลรหัสที่โพลีโซมในสภาวะปกติ และ mRNAs ที่ถูกแยกออกไปจะสามารถกลับมาทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนปกติได้ใหม่ในขณะที่การตอบสนองเนื่องจากสภาวะความเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิสูงหมดไป (Nover *et al.*, 1989) ผลจากการได้รับความร้อนเป็นเวลาสั้นๆ จะไปขัดขวาง หรือเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมปกติ การสังเคราะห์ HSPs มีความสัมพันธ์กับความทนทานต่ออุณหภูมิสูง (Vierling, 1991) และอุณหภูมิที่เกิดอาการสะท้านหนาว (Sabehat *et al.*, 1995)

บทบาทหน้าที่ของ Heat shock protein (HSPs)

หน้าที่และกลไกของ HSPs ในการตอบสนองต่อสภาพเครียดต่างๆ ยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัดนัก ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ HSPs ในสิ่งมีชีวิตต่อการต้านทานอุณหภูมิสูงนำไปสู่การตั้งสมมุติฐานที่ว่า HSPs เป็นปัจจัยหลักในการป้องกันและต้านทานต่อความเสียหายของเซลล์เมื่อได้รับอุณหภูมิสูง (Lavoie *et al.*, 1995) ซึ่งพอสรุปบทบาทและหน้าที่ของ HSPs ได้ดังนี้

1. HSPs มีความสำคัญต่อเนื้อเยื่อ ทำให้สามารถทนต่อความร้อนได้มากขึ้น และป้องกันความเสียหายเป็นช่วงเวลาสั้นๆ ขณะที่เนื้อเยื่อได้รับอุณหภูมิสูงได้ (thermoprotection) กล่าวคือ เมื่อเนื้อเยื่อได้รับอุณหภูมิสูงจะสังเคราะห์ HSPs ขึ้น ซึ่งทำหน้าที่ช่วยให้โปรตีนมีความคงตัว (stabilized protein) โดยการที่ HSPs จะไปรวมกับโปรตีนชนิดอื่นๆ ทำหน้าที่เหมือน chaperone (Lay–Yee *et al.*, 1997) กล่าวคือ ในสภาพปกติ molecular chaperone จะทำหน้าที่จับกับโปรตีนที่สังเคราะห์เสร็จใหม่ๆ แล้วเกิดการรวมตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่ทำให้เกิดเป็น conformation ของโปรตีนได้อย่างปกติ (ดนัยและอังสนา, 2540) ส่วน HSPs chaperone ทำหน้าที่จับกับโปรตีนที่เสียสภาพเนื่องจากสภาวะเครียดต่างๆ แล้วทำให้เกิดการรวมตัวสร้างเป็นโปรตีนที่สมบูรณ์และถูกต้องอีกครั้ง รวมทั้งป้องกันไม่ให้โปรตีนรวมตัวกันอย่างผิดระเบียบ (Landry and Gierasch, 1994) ตัวอย่างเช่น HSP70 รวมตัวกับโปรตีนที่ผิดธรรมชาติ ที่เกิดในระหว่างความเครียดเนื่องจากความร้อน ทำให้มีการม้วนพับหรือการจัดตัวของโปรตีนใหม่ พร้อมทั้งมีการไฮโดรไลส์ ATP เพื่อให้พลังงาน (Vierling, 1991) การสังเคราะห์ HSPs ในผลอะโวกาโด พันธุ์ Hass ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้รับความร้อนอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่า มีการสร้าง HSP70 และHSPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ทำหน้าที่เหมือน chaperone จึงเป็นไปได้ว่า HSPs ที่สร้างในผลอะโวกาโด สามารถลดอาการสะท้านหนาวของผลอะโวกาโดได้ (Woolf *et al.*, 1995) HSPs มีบทบาทในการป้องกันเซลล์และอวัยวะในเซลล์จากความเครียดโดยป้องกันการสะสมของโปรตีนที่เสียหาย (damaged proteins) ซึ่งเป็นผลที่เกิดจากความเครียด หรือโดยทำหน้าที่เป็นโมเลกุล chaperone ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะที่ป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน กล่าวได้ว่า HSPs ทำให้เนื้อเยื่อเพิ่มความทนทานต่ออาการสะท้านหนาวได้โดยผ่านผลของการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับโปรตีนภายในเซลล์ และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้ม (cytosolic and membrane associated proteins) (Sabehat *et al.*, 1996)

2. HSPs ช่วยให้เกิดการซ่อมแซมเซลล์ออร์กะเนลล์ส่วนที่เสียหาย ทำให้สามารถกลับมาทำงานได้อีกภายหลังจากการได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อน หรือช่วยให้เซลล์ปรับตัวให้ทนทานต่อการได้รับความร้อนในครั้งต่อไปได้ (Jinn *et al.*, 1997) กลไกดังกล่าวทำให้เซลล์สามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอด กล่าวคือ การตอบสนองต่อความร้อนเมื่อเซลล์ได้รับอุณหภูมิที่สูงเกินไป HSPs ที่ถูกสร้างจะช่วยซ่อมแซมโปรตีนที่เสื่อมสภาพ และเซลล์หลายชนิดมีความสามารถสังเคราะห์ DNA Repair enzyme ได้ (ดนัยและอังสนา, 2540) เมื่อเซลล์ของพืชได้รับความเครียดจากความร้อนการสร้าง HSPs จะสร้างได้มากหรือน้อยต้องขึ้นกับเวลา และอุณหภูมิที่ได้รับความเครียดนั้นๆ ดังเช่น ผลมะเขือเทศที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมงไม่สามารถป้องกันอาการสะท้านหนาวของผลมะเขือเทศซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสได้ แต่การที่ผลมะเขือเทศได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมงสามารถลดอาการสะท้านหนาวของผลมะเขือเทศได้ 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อได้รับความร้อนที่ 38 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จะทำให้อาการสะท้านหนาวหายไปเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสนาน 4 สัปดาห์ (Lurie and Sabehat, 1997) ความต้านทานต่ออาการสะท้านหนาวของผลมะเขือเทศจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ HSPsในเนื้อเยื่อ (Sabehat *et al.*, 1996)

3. HSPs อาจทำให้โปรตีนในเซลล์ที่อยู่ในรูปของสารละลายมีความทนทาน พบว่า HSPs ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถป้องกันความเสียหายของโปรตีนในการที่จะถูกละลายในสารละลายเกลือ (high-salt-extractable proteins) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวกับเยื่อหุ้ม (membrane associated) (Jinn *et al.*, 1997)

4. HSPs ช่วยในการขนส่งโปรตีน (transport proteins) ผ่านเยื่อหุ้ม (membrane) (Vierling, 1991)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งพอสรุปตำแหน่ง อุณหภูมิที่กระตุ้นการสังเคราะห์ และหน้าที่ของ HSPs บางชนิดได้ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิด ตำแหน่ง และอุณหภูมิที่กระตุ้นการสังเคราะห์ และหน้าที่ของ Heat Shock Proteins (HSPs)

ชนิด	ตำแหน่งและอุณหภูมิที่กระตุ้นการสังเคราะห์ HSPs		หน้าที่
	37 องศาเซลเซียส	42 องศาเซลเซียส	
HSP110	นิวคลีโอโซม	นิวคลีโอโซม	ยังไม่ทราบหน้าที่
HSP100	ไลโซโซม	ไลโซโซม	ยังไม่ทราบหน้าที่
HSP90	ไซโตพลาสซึม	ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส	รวมกับ actin filament เพื่อให้สามารถเกาะกับส่วนของ steroid receptor ได้
HSP78	ชั้นลูเมนของเอนโดพลาสมิคเรติคิวลัม	ชั้นลูเมนของเอนโดพลาสมิคเรติคิวลัม	จับยึดกับโปรตีนที่เริ่มสร้างขึ้นมาใหม่เพื่อแยกเอากลูโคสออกจากโมเลกุล
HSP75	ชั้นแมทริกซ์ไมโตคอนเดรีย	ไมโตคอนเดรีย	เปิดส่วนโครงสร้างส่วนที่เป็น chatarin
HSP73	ไซโตพลาสซึม	ไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส	1.เป็น molecular chaperone 2.ช่วยในการเคลื่อนย้ายโปรตีน
HSP71	ไซโตพลาสซึม	นิวเคลียส	รวมตัวกับ ATP ทำให้สามารถเกาะกับโปรตีนที่สร้างใหม่
HSP60	ไมโตคอนเดรีย	เกาะกับ HSF ของไมโตคอนเดรีย	ช่วยในการเคลื่อนย้ายโปรตีนระหว่างเยื่อหุ้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

HSP47	เอนโดพลามิคเรติคิวลัม	ไลโซโซม	1.เกาะกับ collagen 2.ช่วยในการเกิด transformation 3.ช่วยในการตัด intron ออกจาก mRNA
HSP27	ไซโตพลาสซึม	ไซโตพลาสซึม	ควบคุมการเกิด phsphorelation ในส่วนของ actin cytoskeleton
Ubiquitin	ไซโตพลาสซึม	ไซโตพลาสซึม	ช่วยในการสลายโปรตีน

(ที่มา : Hill, 1998)

เทคนิคในการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลาย

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน สามารถทำได้หลายวิธี โดยแต่ละวิธีจะมีความไว (sensitivity) ต่อการวิเคราะห์และข้อจำกัดที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบในสารละลายโปรตีนหรือปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งจะต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ สำหรับในการศึกษานี้เลือกใช้วิธี การหาปริมาณโปรตีน คือ วิธี protein-dye binding หรือวิธี bradford (Bradford, 1976) โดยโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับสีย้อม coomassie brilliant blue G-250 (dye) ในสารละลายกรด ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีแดง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจากการจับกันของโปรตีนกับสีย้อมที่อยู่ในสารละลายกรด และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน ซึ่งดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาระหว่างประจุลบ (sulfonic acid group) ของสีย้อมกับประจุบวก (amino group) ของโปรตีน ปฏิกิริยานี้เกิดได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 2 นาที และสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นมีความเสถียรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง การวิเคราะห์โปรตีนวิธีนี้ทำได้ 2 วิธีคือ วิธีมาตรฐาน ซึ่งเหมาะสำหรับ ตัวอย่างโปรตีนที่มีปริมาณ 20-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และวิธีปริมาณน้อย ซึ่งใช้สำหรับกรณีที่สารตัวอย่างมีโปรตีนปริมาณน้อย 0.2-1.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ข้อดีของการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีนี้คือ สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว อีกทั้งมีการรบกวนจากอิออนและสารประกอบต่างๆ เช่น triton X-100, sodium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

dodecyl sulfate (SDS) และอะซีโตนน้อยกว่าวิธีอื่นๆ ซึ่งในการวิเคราะห์นี้ถูกรบกวนจากบัฟเฟอร์ที่มีสมบัติเป็นด่างแก่ ซึ่งต้องใช้ tris เป็นตัวควบคุม วิธีนี้สามารถใช้หาปริมาณโปรตีนในสารละลาย crude protein หรือ undialysed proteins ได้ดีและให้ผลถูกต้องกว่าวิธีอื่นๆ ประสิทธิภาพในการวิเคราะห์อยู่ในช่วง 20-200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 0.2-1.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์โปรตีนในปริมาณปานกลางและปริมาณต่ำตามลำดับ อย่างไรก็ตามการหาปริมาณโปรตีนต่างชนิดกัน จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสีย้อมได้ต่างกันขึ้นกับหมู่อะมิโนในโปรตีน ซึ่งเป็นผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ได้ (Bradford, 1976 ; Caprette, 1997)

เทคนิคในการวิเคราะห์และแยกชนิดของโปรตีน

อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟรีซิส เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลโดยอาศัยหลักการว่าสารชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ต่างกัน โปรตีนมีประจุได้เนื่องจากการแตกตัวของหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อื่นๆในโครงสร้างของโมเลกุลที่ค่าพีเอชหนึ่งๆ ของสารละลายโปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของประจุสุทธิแตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจเป็นบวก ลบหรือเป็นกลาง การแยกชนิดโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสนั้น จะมีตัวกลางเป็นที่รองรับให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านไป ซึ่งตัวกลางนั้นต้องมีคุณสมบัติเฉื่อย ตัวกลางที่ใช้สำหรับโปรตีน เช่น starch gel, polyacrylamide gel, agar และ agarose สำหรับในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะตัวกลางที่เป็น polyacrylamide gel ซึ่งใช้กันมากสำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีน (Harris and Angel, 1990)

ก. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีประจุโดยอาศัยการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโมเลกุลไปยังขั้วไฟฟ้า (electrode) ตรงกันข้ามด้วยอัตราเร็วไม่เท่ากัน ระยะทางการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเป็นปฏิภาคกับความแรง (magnitude) ของประจุ และยังขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของสารที่มีประจุนั้นๆ คือ สารที่มีประจุมากจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีประจุน้อย และสารที่มีโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารที่มีโมเลกุลใหญ่ และความแรงของประจุนี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามพีเอชของสารละลายนั้นๆ เช่น โปรตีนที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเท่ากับ pI จะไม่เคลื่อนที่เนื่องจากมีประจุสุทธิเท่ากับศูนย์ ถ้าอยู่ในสารละลายที่มีพีเอชต่ำกว่าค่า pI โปรตีนจะมีประจุรวมเป็นบวก (net positive charge) จึงเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ หากอยู่ในสารละลายที่มีพีเอชสูงกว่าค่า pI โปรตีนจะมีประจุรวมเป็นลบ (net negative charge) และเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก บัฟเฟอร์จะนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระแสไฟฟ้าและรักษาระดับพีเอชให้คงที่ นอกจากพีเอชแล้วความแรงของไอออน (ionic strength) ของบัฟเฟอร์ยังมีความสำคัญ เนื่องจากกระแสไฟฟ้าถูกนำโดยไอออนที่มีอยู่ นอกจากนี้แรงดันและกระแสไฟฟ้าก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของไอออนด้วย เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสนี้มีหลายชนิด ขึ้นอยู่กับตัวกลางที่สารเคลื่อนที่ผ่าน ในการทดลองนี้ใช้ polyacrylamide gel เป็นตัวกลาง ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมากในการวิเคราะห์และแยกชนิดของโปรตีน (Harris and Angel, 1990)

สำหรับการเตรียมเจลนั้นเกิดจากปฏิกิริยา polymerization ของ acrylamide และ N,N'–methylene-bis-acrylamide (BIS) โดยใช้ ammonium persulphate และใช้ TEMED (N,N,N',N'–tetramethylethylenediamine) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ขั้นแรกของปฏิกิริยาจะเป็นการเกิด sulphate free radical จาก persulphate ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ acrylamide เกิดเป็น acrylamide sulphate free radical ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ของ acrylamide ต่อไป และ BIS ที่เติมลงไปจะทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ระหว่างสาย polyacrylamide เป็นตาข่ายร่างแห ดังปฏิกิริยาที่แสดงในภาพที่ 3 ลักษณะของตาข่าย 3 มิติที่เกิดขึ้นจะมีรูขนาดเล็กหรือใหญ่ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ของ acrylamide ที่ใช้อีกด้วย (อาภัสสรา, 2537)

การทำ PAGE เพื่อแยกชนิดของโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง โปรตีนยังคงมีโครงสร้างและรูปร่างในสภาพธรรมชาติ การแยกจึงขึ้นกับความหนาแน่นของประจุและขนาด สามารถเลือกระบบบัฟเฟอร์ที่เหมือนกันได้เกือบทั้งหมดที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 3 –10 แต่ควรเลือกบัฟเฟอร์ที่มีความแรงไอออนค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการนำไฟฟ้าที่ต่ำจะช่วยลดความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำ PAGE ช่วงพีเอชที่ใช้ต้องเป็นช่วงพีเอชที่ทำให้โปรตีนเสถียร และทำให้การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสดำเนินไปได้เร็วและมีประสิทธิภาพในการแยก ถ้าพีเอชของบัฟเฟอร์ห่างจากค่า pI ของโปรตีนที่ต้องการแยกมากจะทำให้โปรตีนมีประจุสูงขึ้น เพราะฉะนั้นเวลาที่ใช้จะสั้นลง และทำให้แถบคมชัดมากขึ้น เนื่องจากการแพร่ลดลง (ไพโรจน์, 2538 ; Harris and Angel, 1990)

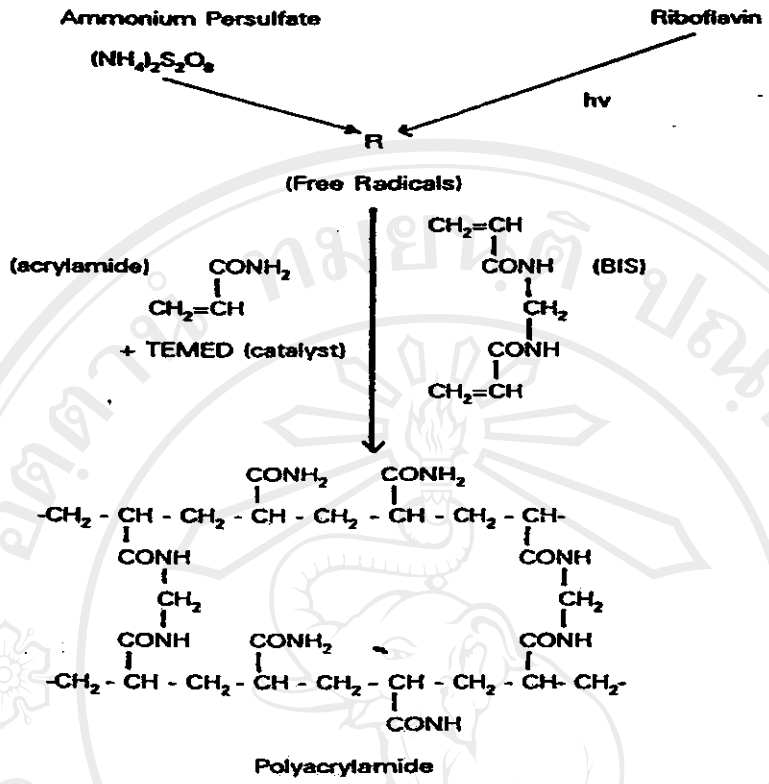
ข. SDS- Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS –PAGE)

sodium dodecyl sulphate (SDS) เป็นสารซักฟอก (detergent) ที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจากโมเลกุลเป็น anionic detergent และมีสูตรโครงสร้างคือ $CH_3(CH_2)_{11}$-O-SO_3^- Na^+ ซึ่งมีทั้งส่วนที่มีขั้ว (โพลาร์) และไม่มีขั้ว (นอนโพลาร์) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน เมื่อนำสารผสมของโปรตีนที่ต้องการศึกษามาผสมกับ SDS ในสารละลายที่เป็นกลาง และมี mercaptoethanol จะทำให้โปรตีนซึ่งจับกันอยู่ในลักษณะของโครงสร้างแบบจตุรภูมิด้วยพันธะไดซัลไฟด์หลุดออกจากกันกลายเป็นหน่วยย่อยของโปรตีน รวมทั้งโครงสร้างแบบตติยภูมิก็จะสลายไป ทำให้โครงสร้างของโปรตีนอยู่ในลักษณะเป็นสายโซ่พอลิเพปไทด์ที่ตรงเหมือนกันหมด โปรตีนกับ SDS จะจับตัวกันได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งมีประจุลบ โดยอัตราส่วนของประจุต่อมวลของโปรตีนจะ

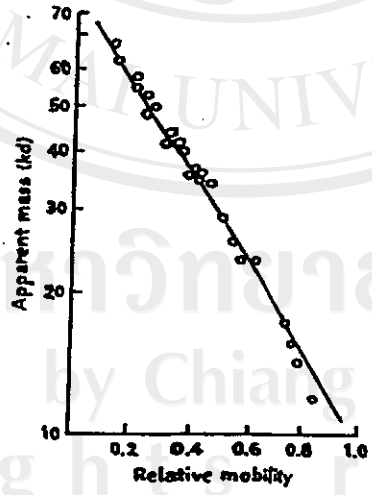
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เท่ากัน ทั้งนี้เพราะ SDS จับกับโปรตีนในอัตราส่วนที่ค่อนข้างคงที่ คือ 1.4 กรัม ของ SDS ต่อ 1 กรัมโปรตีน เมื่อนำโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับ SDS มาศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE พบว่า การแยกโปรตีนจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของขนาดหรือมวลโมเลกุลของโปรตีนนั้นๆ เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เพราะเจลที่ใช้เป็นตัวค้ำจุนในที่นี้จะทำหน้าที่เป็นเสมือนเครื่องกรองให้โปรตีนโมเลกุลเล็กๆ ผ่านไปก่อนหรือเคลื่อนที่ได้เร็ว ในขณะที่โปรตีนโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า จึงสามารถหามวลโมเลกุลของโปรตีนได้ โดยนำโปรตีนมาตรฐานที่มีขนาดต่างๆ กัน ซึ่งทราบมวลโมเลกุลแล้วมาทำ SDS-PAGE ควบคู่ไปกับโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการทราบมวลโมเลกุล ระยะทางที่โปรตีนชนิดนั้นๆ เคลื่อนที่ต่อความยาวของเจล เรียกว่า relative mobility (R_m) เมื่อนำค่า R_m ที่ได้มาเขียนกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_m กับ log มวลโมเลกุลของสาร ทำให้ได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 4 ดังนั้นจึงสามารถหามวลโมเลกุลของสารตัวอย่างได้จากการลากเป็นเส้นบนแกน X (R_m) ไปตัดเส้นกราฟมาตรฐานแล้วอ่านค่า log มวลโมเลกุลจากกราฟ ก็จะได้ค่าที่ถูกต้องใกล้เคียงความจริง การหามวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE นี้ มีความผิดพลาดประมาณ ±5-10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการย้อมสีโปรตีนในเจลปัจจุบันนิยมใช้ amido black nigrosine หรือ coomassie brilliant blue R-250 การย้อมสีจะต้องมีการ fixed โปรตีนให้เสียสภาพด้วย methanol : acetic : H_2O ในอัตราส่วน 3 : 1 : 6 ซึ่งทำให้แถบคมชัด และติดทนนานเป็นผลให้วิเคราะห์ชนิดของโปรตีนได้ง่ายสะดวก และรวดเร็วขึ้น (อาภัสสรา, 2537 ; ไพโรจน์, 2538 ; Harris and Angel, 1990)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการเกิด polymerization ของ acrylamide และ BIS (Cooper, 1977)



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานโปรตีนในการหาน้ำหนักโมเลกุลของแอบโปรตีนโดย SDS – PAGE (ไพโรจน์, 2538)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved