547 ส94ก
ว.3

การศึกษาวิธีการแยกและลมบัติของอากาโรสจากสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียในประเทศไทย

ปริญญานิพนธ์
ของ
เสาวนีย์ เสาวภาพโสภา

27 พ.ย. 2533

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
มีนาคม 2533
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

171147

คณะกรรมการที่ปริกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการที่ปริกษา

..... ประธาน

(ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ)

..... กรรมการ

(ผศ.สุวลี จันทร์กระจ่าง)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธาน

(ดร.ธารารัตน์ ศุภศิริ)

..... กรรมการ

(ผศ.สุวลี จันทร์กระจ่าง)

..... กรรมการ

(รศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศ.ดร.สมพร บัวทอง)

วันที่ ...11... เดือน ...เมษายน... พ.ศ. 2533

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยคำแนะนำและความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง จาก ดร. ธารารัตน์ คุภคิริ ผศ. สุวลี จันทร์กระจ่าง รศ.ดร. เปี่ยมสุข พงษ์ลวัลติ์ และคณาจารย์ทุกท่านในหน่วยวิจัยไบโอพอลิเมอร์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณปวีณา วรรักษ์เสรี คุณนริณี ศิริวิริยะสมบูรณ์ คุณสุจินต์ อังกุราวิรุฑธ์ และขอขอบคุณ ผู้มีพระคุณทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ด้วยดีจนกระทั่งปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อย

เสาวนีย์ เสาวภาพโสภา

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ	1
	คำนำ	1
	ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า	2
	ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า	3
	ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า	3
	คำนิยามศัพท์เฉพาะ	3
2	ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง	5
	องค์ประกอบทางเคมี	5
	การสกัดอากาโรส	8
	สมบัติที่สำคัญของอากาโรส	8
	การนำอากาโรสมาใช้ในงานวิเคราะห์วิจัย	10
	ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า	11
3	วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า	14
	การสกัดวุ้น	14
	อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	14
	การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์	15
	การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล	15
	การสกัดแยดอากาโรสโดยใช้ไดตินหรือไคโตแซน	16
	การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้ไอโซโปรปานอล	17
	การศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของวุ้นและอากาโรส	17
4	ผลการศึกษาค้นคว้า	24
	ผลการสกัดวุ้น	24
	ผลการสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์	25
	ผลการสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล	27

บทที่ หน้า

ผลการลกัดแยกอากาโรสโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซน 29
ผลการลกัดแยกอากาโรสโดยใช้ไอโซโปรปานอล 30
ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของวุ้น 31
ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรส 32
ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้
สารละลายเบนโซโพเนียมคลอไรด์ 32
ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้
สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล 36
ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้ไคติน
หรือไคโตแซน 40
ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้
ไอโซโปรปานอล 43

5 สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ 44
สรุปและอภิปรายผล 44
ข้อเสนอแนะ 47

บรรณานุกรม 48

ภาคผนวก 52

ประวัติย่อของผู้วิจัย 59

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ปริมาณวุ้นและมูลค่าที่นำเข้าประเทศไทย	1
2	แสดงค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซีสของอากาโรสบางชนิด	10
3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของวุ้นกับ ค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซีส	13
4	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่เตรียมวุ้นกับ ค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซีส	13
5	แสดงผลผลิตร้อยละของวุ้นที่สกัดจากสาหร่ายทะเล และวุ้นที่สกัดจาก สาหร่ายทะเลแล้วทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20	24
6	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของวุ้นทั้ง 3 ชนิด	31
7	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียม-คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5	33
8	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียม-คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 7	34
9	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียม-คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10	35
10	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารพอลิเอทิลีนไกลคอล ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40	37
11	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารพอลิเอทิลีนไกลคอล ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50	38
12	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารพอลิเอทิลีนไกลคอล ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60	39
13	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดได้โดยใช้ไดคตินและล้างตะกอน อากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	41
14	แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดได้โดยใช้ไคโตแซนและล้างตะกอน อากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	42

ตาราง หน้า

15 แสดงลมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดได้โดยใช้ไอโซโปรปานอล
และล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 43

บัญชีตารางภาพ

ภาพประกอบ หน้า

1 โครงสร้างของอากาโรไบโอส 5

2 อินฟราเรดสเปกตรัมของวุ้นและอากาโรส 6

3 กลไกการเกิดเจล 9

4 ภาพแสดงตำแหน่งของเด็กซ์แทรนและอัลบูมินในการหาค่าอิเล็กโทร-เอนโดสโมซิส 12

5 ก แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด) ที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และะล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 26

ข แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด) ที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 26

6 ก แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด) ที่สกัดโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 28

ข แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด) ที่สกัดโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 28

7 แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด) ที่สกัดโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซน และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 30

8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตร้อยละ ความแข็งของเจลของวุ้นชนิดต่าง ๆ 46

9 สาหร่ายทะเล และสาหร่ายทะเลแห้งสะอาด 53

10 เครื่องกรองภายใต้ความดัน 54

11 เครื่องวัดความแข็งของเจล 55

12 เครื่องมืออิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้ในการหาค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส .. 56

ภาพประกอบ หน้า

13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซัลเฟต
มาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร 57
14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายฟรุกโตส
มาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร 58

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

สาหร่ายทะเลเป็นทรัพยากรธรรมชาติอย่างหนึ่งที่พบได้ทั่วโลก ประเทศที่มีชายฝั่งทะเลได้นำสาหร่ายทะเลมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น อาหาร ยา เป็นต้น และเพื่อให้เป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติให้มีประโยชน์มากที่สุด จึงได้มีการศึกษาและค้นคว้าเกี่ยวกับสาหร่ายทะเล พบว่าสิ่งที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลบางชนิดเป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) เช่น วุ้น (agar) คาร์ราจีแนน (carrageenan) (Chapman, 1970 : 130) ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย ประเทศไทยต้องนำเข้าวุ้นและผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายอื่น ๆ จากต่างประเทศเป็นจำนวนมากทุกปี ดังตาราง 1 (กรมศุลกากร, 2530 : 20) เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง

ตาราง 1 ปริมาณวุ้นและมูลค่าที่นำเข้าประเทศไทย

ปี	การนำเข้าวุ้น	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2526	307	101
2527	260	88
2528	234	95
2529	120	52
2530	277	113

นอกจากนี้ยังมีการใช้วุ้นเป็นตัวกลางค้ำจุน (supporting medium) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและใช้ในงานด้านวิเคราะห์วิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า (electrophoresis) อิมมูโนดิฟฟิวชั่น (immunodiffusion) (สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2529 : 3) ซึ่งจำเป็นต้องใช้ตัวกลางค้ำจุนที่มีสภาพประจุเป็นกลาง การใช้วุ้นเป็นตัวกลางค้ำจุนในการทำการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้าจะเกิดปัญหาของอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส (electro-endosmosis) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากประจุของตัวกลางค้ำจุน (เนื่องจากวุ้นมีหมู่ประจุลบ เช่น ซัลเฟต ซึ่งจะมีแนวโน้มเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นเบสหรือเป็นกลาง แต่เนื่องจากหมู่ประจุลบนี้เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของวุ้นจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้ แต่จะเกิดการเคลื่อนที่ของไฮโดรเนียมไอออน (hydronium ion) ที่จับคู่อยู่กับหมู่ซัลเฟตไปยังขั้วลบแทน เป็นผลให้มีการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่ไม่แสดงประจุไปยังขั้วลบด้วย จากปัญหานี้จึงได้มีการค้นคว้าและศึกษาเพื่อให้ได้วุ้นที่ปราศจากประจุลบ (Hjerten. 1961 : 514)

อาราไค (Araki) ได้ศึกษาโครงสร้างของวุ้นพบว่าวุ้นประกอบด้วยอากาโรส (agarose) ซึ่งมีประจุเป็นกลาง และอากาโรเพคติน (agaropectin) ซึ่งมีประจุเป็นลบ เนื่องจากมีหมู่ซัลเฟตในปริมาณมาก (Araki. 1956 : 543) ฉะนั้นการแยกอากาโรสออกมาจากวุ้นเพื่อนำมาใช้เป็นตัวกลางค้ำจุนในการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากอากาโรสมีสภาพประจุเป็นกลางจึงเหมาะสมสำหรับใช้เป็นตัวกลางค้ำจุน และพร้อมทั้งกำจัดปัญหาอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสในขณะเดียวกันด้วย

งานวิจัยนี้จึงมุ่งดำเนินการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการแยกอากาโรสจากวุ้นซึ่งผลิตจากสาหร่ายทะเลที่รวบรวมจากชายฝั่งทะเลในจังหวัดสงขลา เพื่อเป็นแนวทางที่จะได้นำเอาสาหร่ายทะเลที่เป็นวัตถุดิบภายในประเทศ มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

<u>ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า</u>

เพื่อศึกษาวิธีการสกัดแยกอากาโรสจากวุ้นที่มาจากสาหร่ายทะเลในประเทศไทย พร้อมทั้งศึกษาสมบัติบางชนิดของอากาโรสที่แยกได้โดยวิธีต่าง ๆ

ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

การศึกษาครั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตอากาโรสเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการในเชิงอุตสาหกรรม

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สาหร่ายทะเลสีแดงจากเกาะยอ จังหวัดสงขลาที่เก็บในช่วงเดือนตุลาคม 2530 โดยตากแดดให้แห้งและเก็บไว้ใช้

2. สกัดวุ้นจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย

3. ศึกษากรรมวิธี ผลผลิตร้อยละและคุณภาพของอากาโรสที่แยกจากวุ้นที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลตัวอย่าง โดยใช้

3.1 เบนโซโทเนียมคลอไรด์

3.2 พอลิเอทิลีนไกลคอล

3.3 ไคตินหรือไคโตแซน

3.4 ไอโซโปรปานอล

4. ศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรส คือ

4.1 ความแข็งของเจล (gel strength)

4.2 อุณหภูมิของการเกิดเจล (gelling temperature)

4.3 อุณหภูมิของการหลอมเหลว (melting temperature)

4.4 ความชื้น (moisture)

4.5 ปริมาณซัลเฟต (sulfate content)

4.6 ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตส (3,6-anhydrogalactose content)

4.7 เถ้า (ash)

4.8 อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

คำนิยามศัพท์เฉพาะ

1. ความแข็งของเจล หมายถึง น้ำหนักที่กดลงบนผิวหน้าของวุ้นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และสามารถทำให้ผิวหน้าของวุ้นแตกเมื่อเวลา 20 วินาที

2. อุณหภูมิของการเกิดเจล หมายถึง อุณหภูมิในขณะที่วุ้นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปลี่ยนสถานะจากโซล (sol) เป็นเจล (gel)

3. อุณหภูมิของการหลอมเหลว หมายถึง อุณหภูมิในขณะที่วุ้นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เปลี่ยนสถานะจากเจลมาเป็นโซล

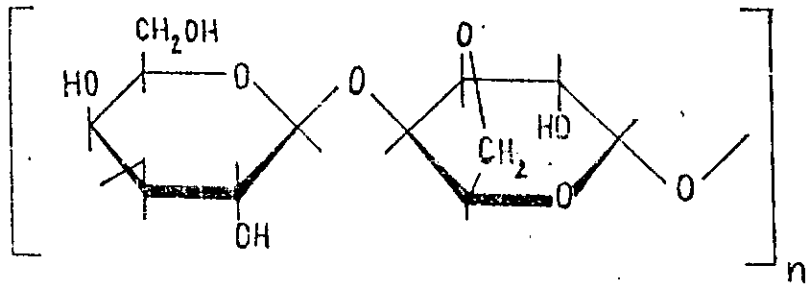
4. อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส หมายถึง ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากประจุของตัวกลางค้ำจุน เช่น หมู่คาร์บอกซิลของกระดาษและหมู่ซัลเฟตของอากาโรเพคตินที่มีอยู่ในวุ้นซึ่งจะแสดงประจุ เมื่ออยู่ในภาวะที่เป็นเบสหรือเป็นกลาง ประจุลบเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก แต่เนื่องจากหมู่ประจุลบเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างของกระดาษหรือวุ้นจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้ จึงทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของหมู่ไฮโดรเนียมไอออนที่ล้อมรอบประจุลบไปยังขั้วลบแทน เป็นผลให้มีการเคลื่อนที่ของสารละลายในตัวกลางค้ำจุน ซึ่งส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่ไม่แสดงประจุไปยังขั้วลบด้วย

บทที่ 2

ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

องค์ประกอบทางเคมี

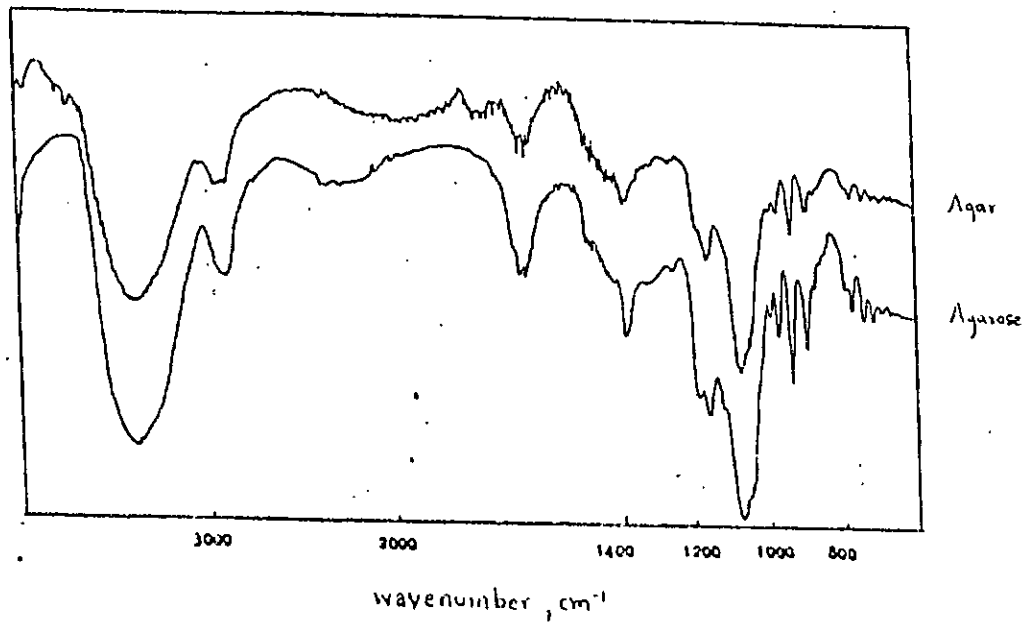
สาหร่ายทะเลที่สามารถนำมาสกัดวุ้นได้เป็นสาหร่ายสีแดงบางชนิด เช่น เจลลิเดียม (Gelidium spp.) กราซิลาเรีย (Gracilaria spp.) เทอโรคลาเดีย (Pterocladia spp.) เป็นต้น (Chapman . 1970 : 151) จากการศึกษาของอาราไคพบว่า วุ้นเป็นพอลิแซคคาไรด์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วยสารสำคัญ 2 กลุ่ม คือ อากาโรส และ อากาโรเพคติน อากาโรสเป็นพอลิเมอร์สายยาวของอากาโรไบโอส (ภาพประกอบ 1)ที่ต่อกันด้วยพันธะ 1⟶3 โดยอากาโรไบโอสคือ เบต้า-ดี-กาแลคโตส (β-D-galactose)ที่ต่อกับ 3,6-แอนไฮโดร-แอลฟา-แอล-กาแลคโตส (3,6-anhydro-α-L-galactose) ด้วยพันธะ 1⟶4 (Araki. 1956 : 543)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างของอากาโรไบโอส

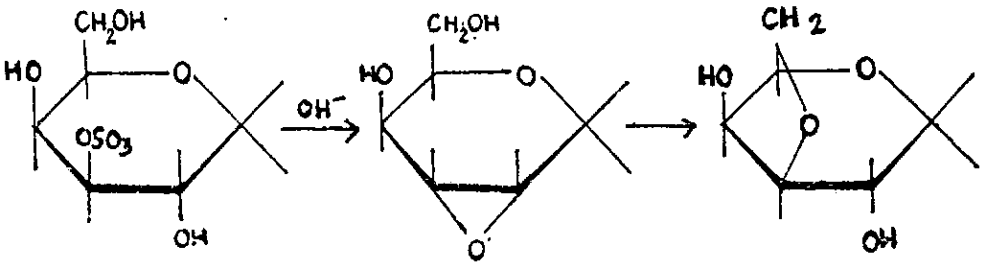
เชื่อว่าอากาโรเพคตินในโมเลกุลมีโครงสร้างแบบเดียวกับอากาโรส เว้นแต่ว่าบางโมเลกุลของ 3,6-แอนไฮโดร-แอลฟา-แอล-กาแลคโตส ถูกแทนที่ด้วยแอล-กาแลคโตสซัลเฟต (L-galactose sulfate) และบางโมเลกุลของเบต้า-ดี-กาแลคโตสถูกแทนที่ด้วยดี-กาแลคโตสซัลเฟต (D-galactose sulfate) หรือด้วย 4,6-โอ-(1-คาร์บอกซีเอทิลิดีน)-ดี-กาแลคโตส (4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactose) (Hirase . 1957 : 68)

จากการศึกษาอินฟราเรดสเปกตรัม เพื่อวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของ วุ้นและอากาโรส พบว่าแถบที่แสดงคาร์โบไฮเดรตซัลเฟตเอสเทอร์ ปรากฏที่บริเวณ 1250 ซม.$^{-1}$ ส่วนบริเวณ 2950 ซม.$^{-1}$ เป็นลักษณะแถบของ C-H (ภาพประกอบ 2) ดังนั้นปริมาณของหมู่ซัลเฟตทั้งหมดอาจพิจารณาจากอัตราส่วนของแถบ 1250 ซม.$^{-1}$ ต่อแถบ 2950 ซม.$^{-1}$ (Park and others. 1986 : 586) สำหรับ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตสแถบสเปกตรัมจะปรากฏที่บริเวณ 930 ซม.$^{-1}$ (Laserna. 1981 : 444)

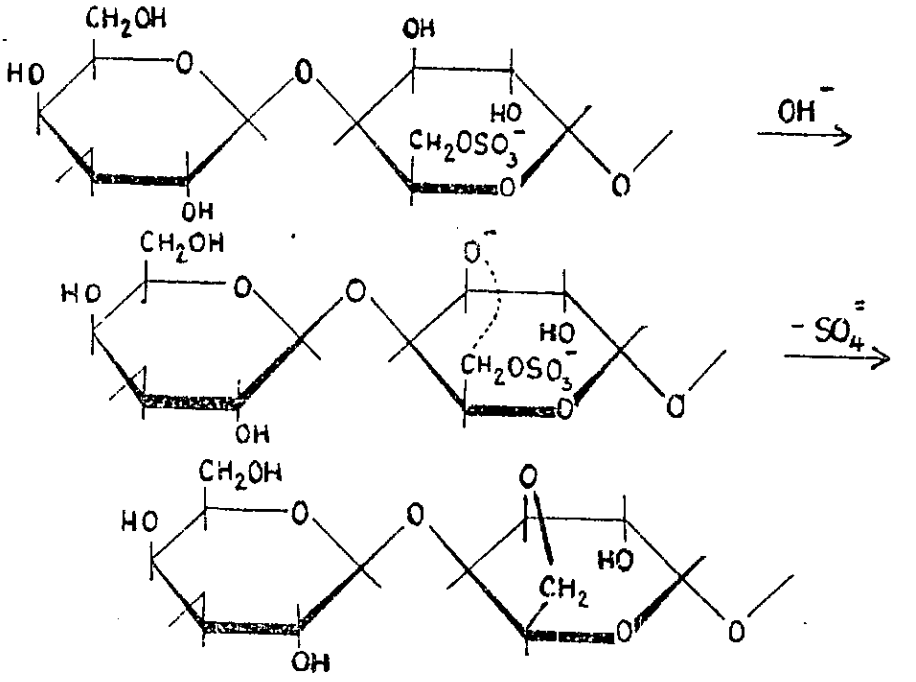


ภาพประกอบ 2 อินฟราเรดสเปกตรัมของวุ้นและอากาโรส

หมู่ซัลเฟตที่อยู่ในโมเลกุลของวุ้นนั้น เป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากหมู่ไฮดรอกซิอิสระของน้ำตาลอาจเกิดได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่งที่ 3 หรือตำแหน่งที่ 6 และอาจถูกกำจัดออกไปโดยให้ทำปฏิกิริยากับเบสดังสมการ (Percival. 1966 : 23, Guiseley and Renn. 1977 : 3)



ลมการแลดง การกำจัดหมู่ซัลเฟตที่ตำแหน่ง 3 ด้วยเบส



ลมการแลดง การกำจัดหมู่ซัลเฟตที่ตำแหน่ง 6 ด้วยเบส

การสกัดอากาโรส

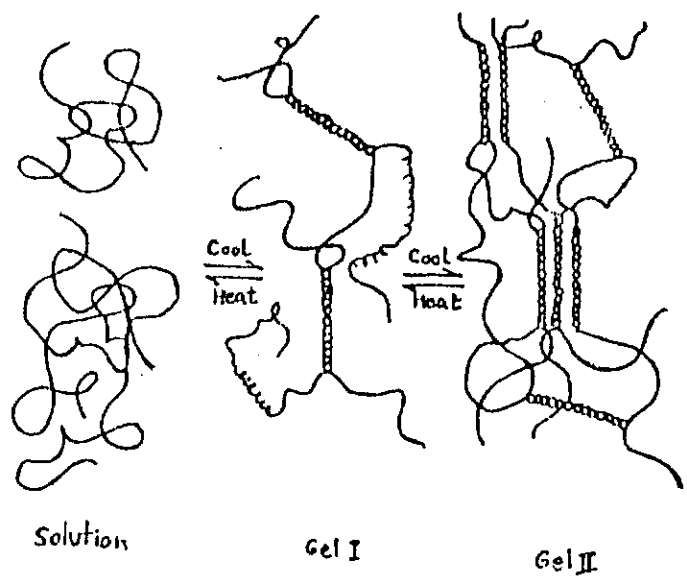
ในปี 1937 อาราไคได้ทำการสกัดอากาโรสครั้งแรกโดยเติมหมู่อะเซตทิลในวุ้น (acetylating agar) แยกวุ้นที่เติมหมู่อะเซตทิลด้วยคลอโรฟอร์ม (chloroform) แล้วนำมาไฮโดรไลซ์ด้วยเบสได้อากาโรส (Araki. 1937 : 1338) และในปี 1962 เจอร์เทนได้เสนอวิธีการแยกอากาโรสออกจากวุ้นที่ง่ายกว่าของอาราไค โดยใช้เซตทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (cetylpyridinium chloride) ตกตะกอนอากาโรเพคตินออกจากอากาโรส (Hjerten. 1962 : 445) ในปี 1967 บลีเทนได้พัฒนาวิธีการของเจอร์เทน โดยการเติมคาร์ราจีแนนเพื่อช่วยในการตกตะกอนจากอากาโรเพคติน (Blethen. 1967 : 4005) ต่อมาในปี 1983 ซานโตส และโดติ (Santos and Doty) ได้เสนอวิธีการสกัดอากาโรสโดยการใช้เบนโซโทเนียมคลอไรด์(benzothonium chloride) เพื่อตกตะกอนอากาโรเพคติน (Santos and Doty. 1983 : 31) และซานโตสได้เสนอวิธีการตกตะกอนอากาโรสในแอลกอฮอล์ โดยการเติมโซเดียม-คลอไรด์ นอกจากการสกัดแยกอากาโรสโดยอาศัยการตกตะกอนของอากาโรเพคตินแล้ว รัสเซล มิด และพอลสัน (Russell, Mead and Polson) ได้ทำการแยกอากาโรสโดยอาศัยความสามารถในการละลายที่ต่างกันของอากาโรสกับอากาโรเพคตินในพอลิ-เอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) (Russell and others. 1964 : 169) และยังได้มีการทดลองเพื่อแยกอากาโรสอีกหลายวิธี โดยใช้สารเคมีต่าง ๆ เช่น แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) (Barteling. 1969 : 1002) ไคโตแซน (chitosan) (Allan and others. 1971 : 234) อะครินอล (acrinol) (Goto. 1971 : 799) เป็นต้น

สมบัติที่สำคัญของอากาโรส (Guiseley and Renn. 1977 : 6)

1. ความแข็งของเจล เป็นสมบัติที่ใช้ประเมินค่าคุณภาพของวุ้นและอากาโรส ความแข็งของเจลส่วนใหญ่เกิดจากอากาโรส วุ้นที่ได้จากสาหร่ายต่างชนิดกันจะมีความแข็งของเจลไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของอากาโรสและอากาโรเพคติน นอกจากนี้ความแข็งของเจลจะลดลงเมื่อวุ้นมีปริมาณซัลเฟตกาแลคโตสมากขึ้น

2. การเกิดเจล อากาโรสเป็นสารที่มีลักษณะพิเศษคือ สามารถเปลี่ยนสถานะจากโซล $\longleftrightarrow$ เจล สำหรับกลไกการเกิดเจลเชื่อว่า เกิดเนื่องจากไฮโดรเจน 3 อะตอมที่ตำแหน่งอิเควโทเรียล (equatorial) ในส่วนของ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปฮีลิค (helix) เมื่ออุณหภูมิของสารละลาย

อากาโรสลดต่ำลง โดยการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายของอากาโรส 2 สาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดเจล ดังนั้นการแทนที่ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตส ด้วยแอล-กาแลคโตสซัลเฟต ทำให้อีลิคเกิดการขดงอเป็นผลให้เจลมีความแข็งต่ำ โดยปกติอากาโรสจะมีอุณหภูมิการเกิดเจลอยู่ในช่วง 40-52 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบ 3 กลไกการเกิดเจล

3. <u>การหลอมเหลว</u> สำหรับอุณหภูมิของการหลอมเหลวมีความสัมพันธ์กับความแข็งและน้ำหนักโมเลกุลของอากาโรส อุณหภูมิของการหล่อมเหลวจะสูงขึ้นเมื่อปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตสเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณซัลเฟตลดลง โดยปกติอากาโรสจะมีอุณหภูมิของการหลอมเหลวอยู่ในช่วง 84-96 องศาเซลเซียส

4. <u>ปริมาณซัลเฟต</u> อากาโรสควรมีซัลเฟตน้อยกว่าร้อยละ 0.7 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แต่โดยทั่วไปนิยมใช้อากาโรสที่มีปริมาณซัลเฟตน้อยกว่าร้อยละ 0.3 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยเฉพาะในงานที่เกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้าเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดปัญหาอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

5. <u>ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตส</u> พบว่าอัตราส่วนของ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตส ต่อ ดี-กาแลคโตส ควรมีค่าเท่ากับ 1 ต่อ 1 เนื่องจากอากาโรสประกอบด้วยโมเลกุลของทั้ง 2 ตัวต่อสลับกัน ถ้ารุ่นที่นำมาสกัดอากาโรสไม่ได้ผ่านขั้นตอนการทำปฏิกิริยากับเบสหรือเกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ อาจทำให้เกิดมี 6-โอ-ซัลเฟตกาแลคโตสเหลืออยู่ ซึ่งจะมีผลต่ออัตราส่วนของ 3,6-แอนไฮโดร-แอล-กาแลคโตส ต่อ ดี-กาแลคโตส

6. <u>อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส</u> อากาโรสที่มีจำหน่ายอยู่ในปัจจุบันหลายชนิด โดยมีค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสต่าง ๆ กัน ดังแสดงในตาราง 2 (FMC Bioproducts Source Book. 1987 : 23) ดูรายละเอียดเพิ่มเติมในหัวข้อ ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า

ตาราง 2 แสดงค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสของอากาโรสบางชนิด

อากาโรส	$-m_r$
extremely low EEO	$\leq$ 0.05
low EEO	0.10-0.15
medium EEO	0.16-0.19
high EEO	0.23-0.26
highest EEO	$\geq$ 0.30

EEO คือ อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

<u>การนำอากาโรสมาใช้ในงานวิเคราะห์วิจัย</u>

งานวิเคราะห์วิจัยในทางชีวเคมีส่วนใหญ่นั้นเป็นเรื่องเกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า ซึ่งเป็นวิธีการแยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ในบางกรณีก็รวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารที่ต้องการแยกด้วย

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า (โสพิศ มงคลศิริเกียรติ. 2529 : 122)

1. สมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดและปริมาณของประจุ ชนิดของประจุของโมเลกุลจะเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า ปริมาณของประจุจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า

1.2 ขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน ซึ่งเกิดกับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) สูงกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก

1.3 รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลมจะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี

2. สนามไฟฟ้า อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์และระยะเวลา แต่แปรผกผันกับความต้านทาน

3. บัฟเฟอร์ นอกจากทำหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-เบสของตัวกลางค้ำจุน และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่างแล้ว ยังเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า

4. ตัวกลางค้ำจุน การเลือกใช้ตัวกลางค้ำจุนให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยกโดยการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้ามีผลต่อการแยกของสาร เพราะตัวกลางค้ำจุนบางตัวอาจทำให้เกิดการดูดซับ (adsorption) ระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไป คือ

4.1 ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา

4.2 ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว

4.3 สามารถแยกสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน

4.4 ตัดเป็นส่วน ๆ ได้ง่าย

วุ้นและอากาโรสเป็นตัวกลางค้ำจุนที่นิยมใช้ในการแยกสารจำพวกแอนติเจน แอนติบอดี ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เป็นต้น การใช้อากาโรสเหมาะสำหรับการแยกสารที่มีขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลมาก ๆ และผู้ใช้สามารถปรับรูตาข่ายของเจลให้เหมาะสมโดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเจลได้ ปัจจุบันมีบริษัทที่สามารถผลิตอากาโรสที่เหมาะสมสำหรับการแยกสารที่มีขนาดเล็กได้ โดยการทำให้ตาข่ายของอากาโรสเล็กลง

การนำวุ้นมาใช้เป็นตัวกลางค้ำจุนทำให้เกิดปัญหาของอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส ทั้งนี้เนื่องจากวุ้นมีหมู่ประจุลบ เช่น ซัลเฟต วีม (Wieme, 1965 : 111) ได้ทำการทดลองวัดค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสโดยการคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างระยะทางของเด็กซ์แทรน (OD) กับผลรวมของระยะทางของเด็กซ์แทรนกับอัลบูมิน (OD+OA) ดังสมการ

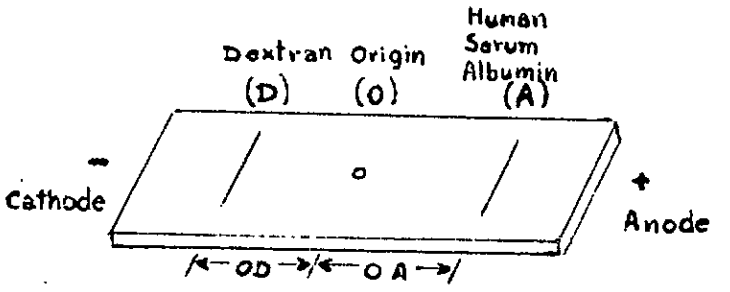
$$-m_r = OD/(OD+OA)$$

กำหนดให้

$-m_r$ = ค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

OD = ระยะทางการเคลื่อนที่ของเด็กซ์แทรนจากจุดเริ่มต้น

OA = ระยะทางการเคลื่อนที่ของอัลบูมินจากจุดเริ่มต้น



ภาพประกอบ 4 ภาพแสดงตำแหน่งของเด็กซ์แทรนและอัลบูมินในการหาค่าอิเล็กโทร-เอนโดสโมซิส

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสมีหลายประการ เช่น สมบัติทางเคมีของเจล ความเข้มข้นของเจล ระยะเวลาที่เตรียมเจล (Wieme , 1965 : 111-121)

ตาราง 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของวุ้นกับค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

ความเข้มข้นของวุ้น (ร้อยละ)	$-m_r$
1	0.59
2	0.64
3	0.69

ตาราง 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่เตรียมวุ้นกับค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

ระยะเวลาที่เตรียมวุ้น (ชั่วโมง)	$-m_r$
1	0.52
5	0.56
24	0.59

บทที่ 3

วิธีดำเนินการศึกษาค้นคว้า

<u>วัสดุชีวภาพที่ใช้</u>

ใช้สาหร่ายทะเลสีแดงสกุลกราซิลาเรีย จากเกาะยอ จังหวัดสงขลาที่เก็บในช่วงเดือนตุลาคม 2530

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย</u>

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) Spectronic 21 Bausch & Lomb
2. เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) Hettich Universal II
3. เครื่องคนแบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Nuova stirrer II
4. เครื่องวัดความแข็งของเจล Nikkansui Type
5. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power Supply) LKB Bromma 2301 Macrodrive I

<u>การสกัดวุ้น</u>

1. <u>สารเคมี</u>
   - 1.1 สารช่วยกรอง (diatomaceous earth)
   - 1.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์
2. <u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>
   - 2.1 การสกัดวุ้นจากสาหร่ายทะเล

2.1.1 นำสาหร่ายที่สะอาดและแห้ง 40 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องอังไอน้ำ นาน 45 นาที ปั่นละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น ให้ความร้อนอีก 45 นาที เติมสารช่วยกรอง 100 กรัม คนให้เข้ากัน ให้ความร้อนอีก 30 นาที

2.1.2 นำสารที่ได้จากข้อ 2.1.1 มากรองด้วยเครื่องกรองภายใต้ความดันโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 และความดัน 70-80 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.1.3 สารที่กรองได้ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้น้ำแข็งละลาย ล้างน้ำให้สะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส

2.1.4 นำวุ้นที่ได้มาทำปฏิกิริยากับเบสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นล้างจนหมดเบส นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส บดเป็นผงเพื่อนำไปแยกอากาโรสต่อไป

<u>การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์</u> (Santos and Doty. 1983 : 31)

1. <u>สารเคมี</u>

1.1 สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 3 5 7 และ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

1.2 สารช่วยกรอง

1.3 แคปปา-คาร์ราจีแนน

2. <u>วิธีดำเนินการทดลอง</u>

2.1 ละลายวุ้น 12 กรัมกับแคปปา-คาร์ราจีแนน 2.4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 800 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส แล้วเทสารละลายวุ้นลงในสารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ จำนวน 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนนาน 5 นาที เติมสารช่วยกรอง 50 กรัม คนให้เข้ากัน

2.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.1 กรองด้วยเครื่องกรองภายใต้ความดัน โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 5 และความดัน 10-20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.3 สารละลายที่กรองได้ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้น้ำแข็งละลาย ล้างด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร 3 ครั้ง อบแห้ง บดละเอียดและนำอากาโรสที่ได้ไปศึกษาสมบัติต่าง ๆ

<u>การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล</u> (Russell and others. 1964 : 169)

1. <u>สารเคมี</u>

1.1 สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 10000 เข้มข้นร้อยละ 40 50 และ 60 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 ละลายวุ้น 4 กรัมด้วยน้ำกลั่น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

2.2 นำสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เติมสารละลายวุ้นจากข้อ 2.1 คนอย่างสม่ำเสมอ เกิดตะกอนอากาโรส

2.3 ปั่นแยกตะกอนอากาโรสด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางโดยใช้ความเร็ว 7000 ร เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำกลั่น 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร 3 ครั้ง อบแห้งและบดละเอียด นำอากาโรสที่ได้ไปศึกษาสมบัติต่าง ๆ

การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซน (Allan and others. 1971 : 234)

1. สารเคมี

1.1 ไคติน

1.2 ไคโตแซน

1.3 ฟอร์มาไมด์

1.4 ไอโซโปรปานอล

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 ละลายวุ้น 4 กรัมด้วยฟอร์มาไมด์ 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เติมไคตินหรือไคโตแซน 4 กรัม คนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.2 ปั่นแยกตะกอนทิ้งด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางโดยใช้ความเร็ว 7000 ร เป็นเวลา 30 นาที สารละลายที่แยกได้นำมาตกตะกอนด้วย ไอโซโปรปานอล กรองและล้างตะกอนด้วยไอโซโปรปานอลและอะซิโตนตามลำดับ อบแห้งและบดละเอียด เติมน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จำนวน 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนนาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

2.3 กรองและล้างตะกอนด้วยไอโซโปรปานอลและอะซิโตนตามลำดับ อบแห้ง บดละเอียด นำอากาโรสที่ได้นำไปศึกษาสมบัติต่าง ๆ

การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้ไอโซโปรปานอล

1. สารเคมี

1.1 ไอโซโปรปานอล

1.2 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2. วิธีดำเนินการทดลอง

ละลายวุ้น 15 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนและตกตะกอนด้วยไอโซ-โปรปานอลเข้มข้นร้อยละ 85 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 2 ลิตร กรองและล้างตะกอนด้วยไอโซโปรปานอลเข้มข้นร้อยละ 65 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และเข้มข้นร้อยละ 85 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อีกครั้ง อบและบด นำอากาโรสที่ได้ไปศึกษาสมบัติต่าง ๆ

การศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของวุ้นและอากาโรส

1. ความแข็งของเจล (Nikkansui Measuring Method)

1. วิธีดำเนินการทดลอง

1.1 ละลายวุ้นและอากาโรส 1.2 กรัมด้วยน้ำกลั่น 78.8 ลูกบาศก์-เซนติเมตรที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตั้งไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

1.2 วัดความแข็งของเจลด้วยเครื่องวัดความแข็งของเจล โดยกดน้ำหนักลงตรงกลางของวุ้นและอากาโรส บันทึกน้ำหนักที่ทำให้หน้าเจลแตกภายในเวลา 20 วินาที โดยจับเวลาตั้งแต่เริ่มกดจนถึงเวลาที่หน้าเจลแตก

2. วิธีการคำนวณหาความแข็งของเจล

$$\log W = \log Wt + 0.18 (\log t - \log 20)$$

โดยที่ W = ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)

Wt = น้ำหนักที่กดลงบนเจล (กรัม)

t = เวลาที่หน้าเจลแตก (วินาที)

2. อุณหภูมิของการเกิดเจล (Guiseley. 1970 : 247)

วิธีดำเนินการทดลอง

ละลายวุ้นและอากาโรส 0.3 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในหลอดทดลอง จุ่มหลอดทดลองในเครื่องอังไอน้ำที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใส่เทอร์โมมิเตอร์ในหลอดทดลอง ลดอุณหภูมิในเครื่องอังไอน้ำลงประมาณ 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที บันทึกอุณหภูมิที่ทำให้วุ้นและอากาโรสเกิดรอยของเทอร์โมมิเตอร์ขณะดึงเทอร์โมมิเตอร์ขึ้น

3. อุณหภูมิของการหลอมเหลว (Guiseley. 1970 : 247)

วิธีดำเนินการทดลอง

ละลายวุ้นและอากาโรส 0.3 กรัมด้วยน้ำกลั่น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กดลูกปืนขนาด 0.25 กรัม ให้จมลงไปในเจล จุ่มหลอดทดลองในเครื่องอังไอน้ำที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพิ่มอุณหภูมิประมาณ 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที บันทึกอุณหภูมิขณะที่ลูกปืนจมลงสู่ก้นหลอดทดลอง

4. ความชื้น

1. วิธีดำเนินการทดลอง

1.1 อบบีกเกอร์ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์แล้วนำไปชั่ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ของบีกเกอร์

1.2 ใส่วุ้นและอากาโรสในบีกเกอร์ให้ได้ค่าคงที่ถูกต้องแน่นอนในช่วงประมาณ 0.10 กรัม อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

2. การคำนวณหาความชื้น

ปริมาณความชื้นร้อยละ = $100(W_1-W_2)/(W_1-W)$

โดยที่ W = น้ำหนักบีกเกอร์

W_1 = น้ำหนักบีกเกอร์ วุ้นและอากาโรส ก่อนอบ

W_2 = น้ำหนักบีกเกอร์ วุ้นและอากาโรส หลังอบ

5. ปริมาณซัลเฟต (Dodgson and Price. 1962 : 106-107)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายแมกนีเซียมไนเตรตอิ่มตัว

1.2 สารละลายกลีเซอรอล-เอทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดรคลอริก (โซเดียมคลอไรด์ 67 กรัม กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 8 ลูกบาศก์เซนติเมตร และน้ำกลั่น 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร)

1.4 กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

1.5 สารละลายซัลเฟตมาตรฐานเข้มข้น 0.10 มิลลิกรัมซัลเฟตไอออนต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (โซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ 0.1479 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร)

1.6 แบเรียมคลอไรด์

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

2.1.1 เตรียมสารละลายซัลเฟตมาตรฐาน ความเข้มข้น 10 15 20 25 30 35 และ 40 มิลลิกรัมซัลเฟตไอออนต่อลิตร จำนวนอย่างละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2.1.2 เติมสารต่อไปนี้

1. สารละลายกลีเซอรอล-เอทานอล จำนวน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร

2. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในกรดไฮโดร-คลอริก จำนวน 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

3. แบเรียมคลอไรด์ 0.2 กรัม

2.1.3 คนเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที คนต่อ 15 วินาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบ

2.1.4 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายซัลเฟตมาตรฐาน

2.2 การหาปริมาณซัลเฟตในรุ้นและอากาโรส

2.2.1 ชั่งรุ้นและอากาโรสประมาณ 0.15 กรัม ให้ได้ค่าที่ถูกต้องในครูซิเบิ้ล เติมสารละลายแมกนีเซียมไนเตรตอิ่มตัว 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้แห้งด้วยเตาไฟฟ้า

2.2.2 เผาที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียสได้เถ้าสีขาว เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำให้มีปริมาตร 50 ลูกบาศก์เซนติเมตรด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลายตามข้อ 2.1:2 และทำการทดลองต่อตามข้อ 2.1.3

2.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบหาปริมาณซัลเฟตจากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณซัลเฟตในรุ้นและอากาโรส

6. ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตส (Yaphe and Arsenault. 1965 :143)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายรีซอร์ซินอล-อะซีตอล ประกอบด้วยสารละลายรีซอร์ซินอล เข้มข้นร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 9 ลูกบาศก์เซนติเมตร สารละลายอะซีตอล เข้มข้นร้อยละ 0.03 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

1.2 สารละลายฟรุกโตสมาตรฐานเข้มข้น 3 มิลลิโมลต่อลิตร (ดี-ฟรุกโตส 0.027 กรัม ในสารละลายอิ่มตัวของกรดเบนโซอิค จนมีปริมาตรเป็น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร)

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 การทำกราฟมาตรฐาน

2.1.1 เตรียมสารละลายฟรุกโตสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.06 0.12 0.18 0.24 และ 0.30 ไมโครโมลต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

2.1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แช่ในอ่างน้ำแข็ง 10 นาที เติมสารละลายรีซอร์ซินอล-อะซีตอล 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำต่อไปนี้ ตามลำดับ

1. อ่างน้ำแข็ง นาน 10 นาที
2. อ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 4 นาที
3. อ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที
4. อ่างน้ำแข็ง นาน 1.5 นาที

2.1.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารละลายเปรียบเทียบ

2.1.4 เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของสารละลายฟรุกโตสมาตรฐาน

2.2 การหาปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตสในวุ้นและอากาโรส

2.2.1 ชั่งวุ้นและอากาโรสประมาณ 0.01 กรัมให้มีค่าถูกต้องแน่นอน ละลายด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ทำให้มีปริมาตร 100 ลูกบาศก์-เซนติเมตร

2.2.2 ปิเปตสารละลายวุ้นและอากาโรส 2 ลูกบาศก์-เซนติเมตร เติมสารละลายตามข้อ 2.1.2 และทำการทดลองตามข้อ 2.1.3

2.2.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบหาปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตสจากกราฟมาตรฐาน และคำนวณปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตสในวุ้นและอากาโรส

7. ปริมาณเถ้า

1. วิธีการดำเนินการทดลอง

1.1 เผาครูซิเบิ้ลที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียสประมาณ 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นำไปชั่ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักที่คงที่ของครูซิเบิ้ล

1.2 ชั่งวุ้นและอากาโรสประมาณ 1 กรัมให้ได้ค่าที่ถูกต้องแน่นอน เผาจนหมดควันดำ และเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นำไปชั่ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

2. การคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้าร้อยละ} = 100 (W_2 - W) / (W_1 - W)$$

โดยที่ W = น้ำหนักครูซิเบิ้ล

W_1 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล วุ้นและอากาโรส ก่อนเผา

W_2 = น้ำหนักครูซิเบิ้ล วุ้นและอากาโรส หลังเผา

171147

8. อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส (Wieme. 1965 : 111)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียม-5,5-ไดเอทิลบาร์บิทูเรท 0.05 โมลต่อลิตร pH 8.2 (ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก)

1.2 สารตัวอย่างประกอบด้วย อิวแมนอัลบูมินเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เด็กซ์แทรน ที 70 เข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และบรอมฟินอลบลูเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์

1.3 สีย้อมโคแมสซี่ บลู อาร์-250 เข้มข้นร้อยละ 0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 45 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 7 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.4 สารละลายที่ใช้ล้างสี ประกอบด้วย เมทานอลเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.5 สารละลายที่ใช้ตกตะกอนเด็กซ์แทรน ประกอบด้วย เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2. วิธีดำเนินการทดลอง

2.1 ละลายอากาโรส 0.5 กรัม ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เทลงบนเพลทที่เตรียมไว้ โดยให้จุดใส่สารตัวอย่างอยู่ห่างจากขั้วลบ 3 เซนติเมตร ตั้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

2.2 ใส่สารละลายตัวอย่างหลุมละ 1 ไมโครลิตร ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 45 โวลต์ นาน 2-3 ชั่วโมง หรือจนกว่าสีน้ำเงินของบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ไปสุดขอบเจล

2.3 แบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วนตามความยาว ส่วนหนึ่งนำไปแช่ในสารละลายที่ใช้ตกตะกอนเด็กซ์แทรน ทิ้งไว้ค้างคืน อีกส่วนหนึ่งแช่สีย้อมโคแมสซี่ บูล นาน 1 ชั่วโมง นำมาล้างสีออก วัดระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงตำแหน่งของอัลบูมิน(OA) และจากจุดเริ่มต้นถึงตำแหน่งของเด็กซ์แทรน (OD)

3. การคำนวณค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

$$-m_r = OD/(OD + OA)$$

โดยที่ OD = ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงตำแหน่งของเด็กซ์แทรน (เซนติเมตร)

OA = ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงตำแหน่งของอัลบูมิน (เซนติเมตร)

$-m_r$ = ค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส

บทที่ 4

ผลการศึกษาค้นคว้า

ผลการสกัดวุ้น

การสกัดวุ้นจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย จังหวัดสงขลา ปรากฏว่าให้ปริมาณวุ้นร้อยละ 30.3 โดยคิดเทียบจากสาหร่ายทะเลแห้งและสะอาด (ตาราง 5) เมื่อนำวุ้นที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยากับเบส พบว่าวุ้นที่สกัดจากสาหร่ายทะเลแล้วทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 ให้ผลผลิตร้อยละไม่ต่างกันแต่มีสีขาวกว่าวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10

ตาราง 5 แสดงผลผลิตร้อยละของวุ้นที่สกัดจากสาหร่ายทะเลและวุ้นที่สกัดจากสาหร่ายทะเลแล้วทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20

ชนิดของวุ้น	ผลผลิตร้อยละของวุ้น*		ลักษณะ
	เทียบจากสาหร่ายแห้งสะอาด	เทียบจากวุ้นที่สกัดจากสาหร่าย	
non-treated agar	30.30 ± 1.0	100.00	เป็นผง สีน้ำตาล
10% alkali-treated agar	18.70 ± 1.3	61.74 ± 4.3	เป็นผง สีน้ำตาลอ่อน
20% alkali-treated agar	19.39 ± 1.0	64.00 ± 2.8	เป็นผง สีเหลืองอ่อน

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง

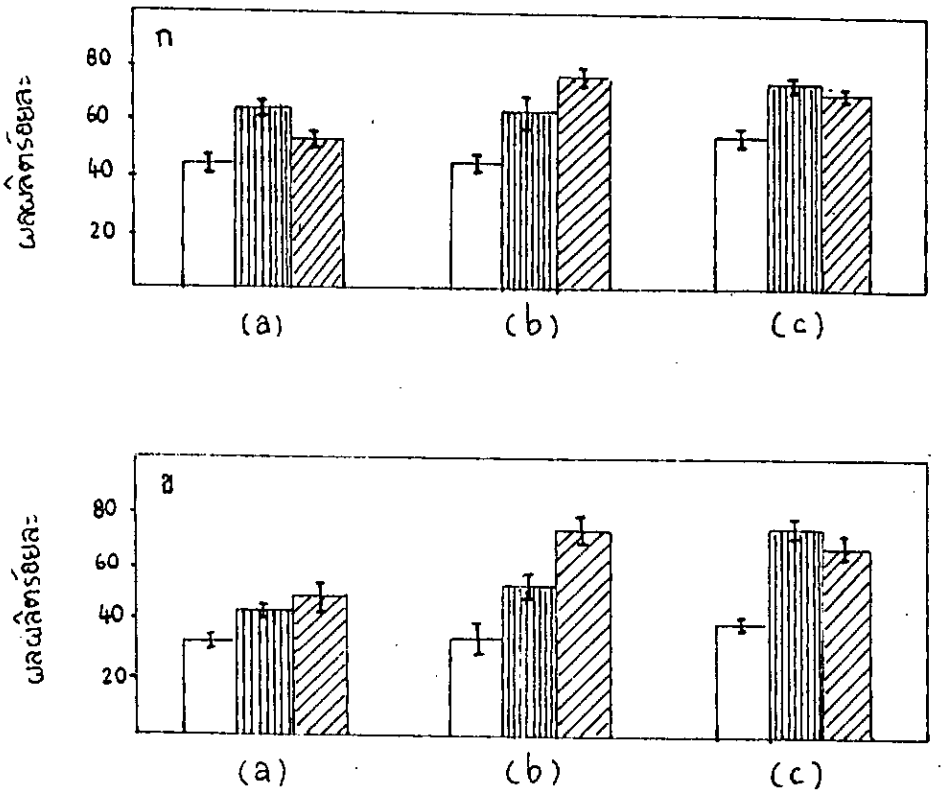
ผลการสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์

จากการทดลองสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 พบว่าจะเกิดตะกอนของอากาโรเพคตินที่ละเอียดมากจนสามารถลอดผ่านกระดาษกรองได้ ทำให้มีตะกอนของอากาโรเพคตินปนอยู่ในสารละลายอากาโรสที่กรองได้ งานวิจัยนี้จึงไม่ศึกษาผลผลิตร้อยละและสมบัติของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3

จากภาพประกอบ 5 พบว่าอากาโรสที่สกัดจากวุ้นทั้ง 3 ชนิดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเดียวกัน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสจะให้ผลผลิตร้อยละมากกว่าการล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และแนวโน้มผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสจะมีค่ามากกว่าอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบส

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ พบว่าจะมีแนวโน้มของผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่สกัดได้มากขึ้นด้วย ไม่ว่าจะสกัดจากวุ้นชนิดใด

ผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่ได้จากการใช้วุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสร้อยละ 10 และ 20 และใช้เบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 จะมีค่าใกล้เคียงกันทั้งในกรณีล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 และ 40 องศาเซลเซียส



ภาพประกอบ 5 ก แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด
□ = non-treated agar, ▥ = 10% alkali-treated agar,
▨ = 20% alkali-treated agar) ที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซ-โทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ข แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด
□ = non-treated agar, ▥ = 10% alkali-treated agar,
▨ = 20% alkali-treated agar) ที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซ-โทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

โดยที่ ความเข้มข้นของสารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่ใช้ (ร้อยละ)

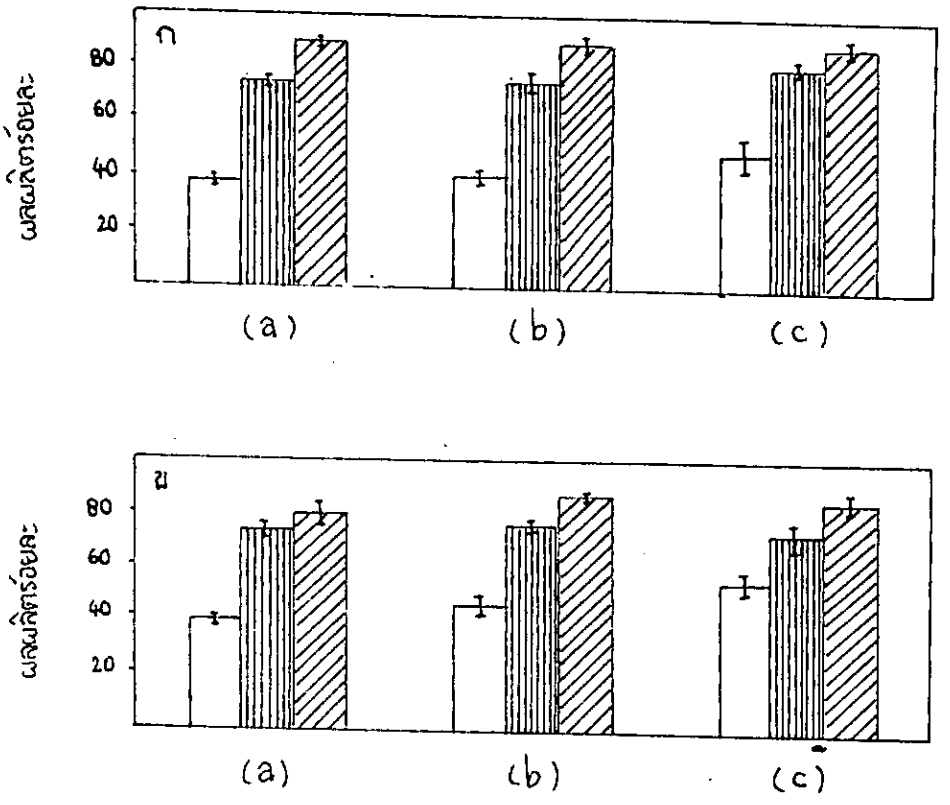
(a) 5 (b) 7 (c) 10

ผลการสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล

จากภาพประกอบ 6 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลเพิ่มขึ้น จะให้ผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่สกัดจากวุ้นทุกชนิดเพิ่มขึ้นด้วย ไม่ว่าจะล้างตะกอนอากาโรลด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 หรือ 40 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ โดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นเท่ากัน จะพบว่าผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบสจะต่ำกว่าที่สกัดจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบส ทั้งที่ล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 หรือ 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 จะให้ผลผลิตร้อยละของอากาโรสสูงกว่าร้อยละ 80 สำหรับทุก ๆ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลทั้งที่ล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 หรือ 40 องศาเซลเซียส

ผลผลิตร้อยละของอากาโรสจากการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 20 หรือ 40 องศาเซลเซียสให้ผลไม่ต่างกันอย่างชัดเจน



ภาพประกอบ 6 ก แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด
□ = non-treated agar, ▥ = 10% alkali-treated agar,
▨ = 20% alkali-treated agar) ที่สกัดโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

ข แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด
□ = non-treated agar, ▥ = 10% alkali-treated agar,
▨ = 20% alkali-treated agar) ที่สกัดโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ และล้างอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

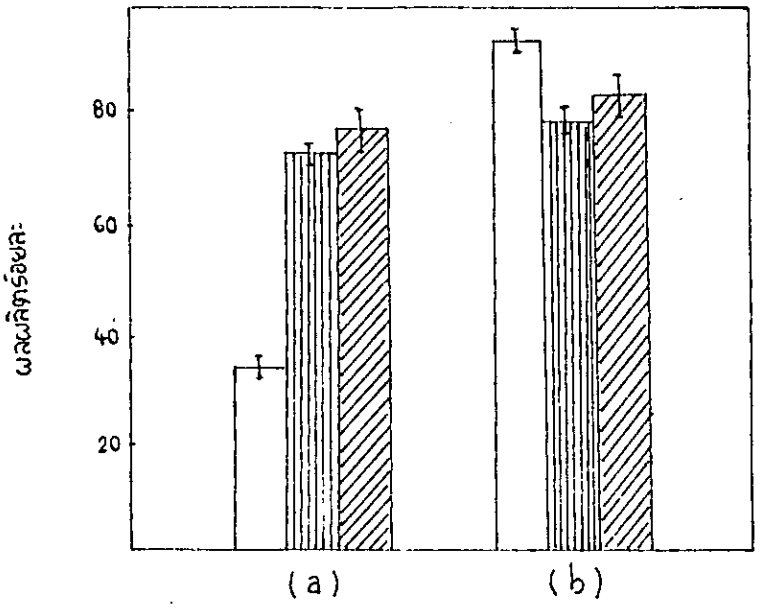
โดยที่ ความเข้มข้นของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลที่ใช้ (ร้อยละ)

(a) 40 (b) 50 (c) 60

ผลการสกัดแยกอากาโรสโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซน

จากการทดลองล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าอากาโรสเกิดการเปลี่ยนสภาพเป็นเจล งานวิจัยนี้จึงศึกษาเฉพาะผลของการล้างตะกอนอากาโรสที่สกัดโดยใช้ไคติน หรือไคโตแซน ด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากภาพประกอบ 7 พบว่าผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดเดียวกันโดยใช้ไคโตแซนจะให้ค่าสูงกว่าการใช้ไคติน

การสกัดอากาโรสจากวุ้นชนิดต่าง ๆ โดยใช้ไคติน พบว่าผลผลิตร้อยละจะสูงขึ้นเมื่อใช้วุ้นที่มีคุณภาพดีนั่นคือ ใช้วุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสแล้วเป็นสารตั้งต้นในการสกัดอากาโรส ส่วนการสกัดอากาโรสจากวุ้นชนิดต่าง ๆ โดยใช้ไคโตแซน พบว่าอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบสจะมีผลผลิตร้อยละของอากาโรสสูงกว่าที่สกัดจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสและปรากฏว่า วุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 จะให้ผลผลิตร้อยละของอากาโรสสูงกว่าวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10



ภาพประกอบ 7 แสดงผลผลิตร้อยละของอากาโรส (เทียบจากวุ้นที่ใช้สกัด
□ = non-treated agar, ▥ = 10% alkali-treated agar,
▨ = 20% alkali-treated agar) ที่สกัดโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซน
และล้างด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
โดยที่ (a) ไคติน
(b) ไคโตแซน

<u>ผลการสกัดแยกอากาโรสโดยใช้ไอโซโปรปานอล</u>

ผลการสกัดแยกอากาโรสจากวุ้นที่สกัดได้ และจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 โดยใช้ไอโซโปรปานอลแล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลผลิตร้อยละของอากาโรสเท่ากับ 52.69 67.12 และ 94.00 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่สกัด โดยใช้ไอโซโปรปานอลจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 จะมีค่าสูงกว่าการสกัดด้วยวิธีอื่นที่ได้ศึกษาในงานวิจัยนี้

ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของวุ้น

ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของวุ้นและอากาโรสที่สกัดแยกโดยวิธีต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว แสดงในตาราง 6 - ตาราง 15

ตามตาราง 6 วุ้นที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลแล้วทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 10 ให้ค่าความแข็งของเจลเท่ากับ 825 และ 570 กรัมต่อตารางเซนติเมตร เมื่อพิจารณาสมบัติอื่น ๆ จะเห็นว่าวุ้นที่สกัดจากสาหร่ายทะเลแล้วทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 มีลักษณะที่ดีที่สุดคือมีอุณหภูมิของการเกิดเจล 40.4 องศาเซลเซียส มีปริมาณซัลเฟตลดลงและปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตสเพิ่มขึ้นจากวุ้นที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ส่วนค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสมีค่าเท่ากับ 0.28 ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุดในวุ้นทั้ง 3 ประเภท

ตาราง 6 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของวุ้นทั้ง 3 ชนิด

สมบัติ	ชนิดของวุ้น		
	non-treated agar	10%alkali-treated agar	20%alkali-treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	114	570	825
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	30.5	37.6	40.4
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	80.0	87.0	94.5
ความชื้น (ร้อยละ)	17.86	15.67	18.50
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	4.30	0.89	0.85
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	26.25	25.55	36.60
เถ้า (ร้อยละ)	2.90	2.14	2.03
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	0.50	0.32	0.28

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

ผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรส

ผลการศึกษาสมบัติของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียม-คลอไรด์

การสกัดอากาโรสโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่าอากาโรสที่ได้จากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสเข้มข้นร้อยละ 20 จะให้ความแข็งของเจลสูงสุด เมื่อเทียบกับอากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดอื่นคือมีค่า 1070 และ 850 กรัมต่อตารางเซนติเมตร เมื่อล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตาราง 7)

สมบัติอื่น ๆ ของอากาโรสที่ได้จากการใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่ามีอุณหภูมิของการเกิดเจลใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 39-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของการหลอมเหลวอยู่ในช่วง 83-95 องศาเซลเซียส และมีปริมาณเถ้าร้อยละ 0.5-2.0 สำหรับปริมาณซัลเฟตจะมีค่าน้อยลง และปริมาณ 3,6 แอนไฮโดรกาแลคโตสมีค่าเพิ่มขึ้นในอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นมากขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสของอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบสจะสูงกว่าวุ้นที่ได้ทำปฏิกิริยากับเบสด้วย อย่างไรก็ตามอากาโรสที่สกัดได้ด้วยวิธีนี้มีค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสอย่างต่ำเพียง 0.15 เท่านั้น ซึ่งก็ยังจัดอยู่ในช่วงของอากาโรสที่เป็น low EEO

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์เป็นร้อยละ 7 และ 10 พบว่าสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่ได้จะคล้ายกับเมื่อใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 แต่ค่าความแข็งของเจลจะต่ำกว่าตามตาราง 8-9

ตาราง 7 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียม-คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 20 องศาเซลเซียส			อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส		
	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	378	590	1070	550	600	850
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	38.6	40.5	39.9	39.0	40.1	40.1
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	83.0	88.0	92.5	88.0	90.5	94.5
ความชื้น (ร้อยละ)	15.45	11.31	12.10	15.44	13.57	17.48
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	2.78	0.82	0.14	1.74	0.81	0.45
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	28.32	34.89	40.26	27.39	29.08	38.00
เถ้า (ร้อยละ)	2.12	1.19	1.02	1.93	0.45	0.98
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	0.44	0.15	0.21	0.50	0.17	0.23

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

ตาราง 8 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียม-คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 7

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 20 องศาเซลเซียส			อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส		
	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	277	547	588	294	601	824
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	38.0	38.0	39.9	37.9	38.5	39.5
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	83.0	87.5	94.0	84.0	89.0	94.0
ความชื้น (ร้อยละ)	15.71	16.36	10.82	13.49	14.28	13.80
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	2.45	1.00	1.10	1.50	1.09	0.47
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	28.83	31.90	31.99	28.27	31.59	36.35
เถ้า (ร้อยละ)	1.86	1.27	1.05	1.31	1.82	0.67
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	0.34	0.15	0.20	0.36	0.34	0.20

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

ตาราง 9 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียม-คลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 20 องศาเซลเซียส			อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส		
	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	237	446	553	388	462	663
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	37.4	38.1	39.5	37.2	39.0	39.5
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	85.0	87.5	93.0	86.0	85.5	93.5
ความชื้น (ร้อยละ)	15.67	11.91	14.24	13.53	16.92	18.08
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	3.43	1.33	0.87	2.02	0.79	0.72
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	26.50	32.73	36.61	31.65	33.24	34.87
เถ้า (ร้อยละ)	2.50	1.46	1.77	2.78	0.32	0.25
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	0.69	0.24	0.21	0.43	0.13	0.11

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

ผลการศึกษาสมบัติต่างๆของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีน-ไกลคอล

การสกัดแยกอากาโรสโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40 จากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 และล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ค่าความแข็งของเจลสูงสุด เมื่อเทียบกับอากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดอื่น คือมีค่าสูงถึง 887 กรัมต่อตารางเซนติเมตร (ตาราง 10) จะมีปริมาณซัลเฟตร้อยละ 0.48 และค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส 0.27 ซึ่งจัดว่าอยู่ในช่วง high EEO และยังพบอีกว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นร้อยละ 50 และ 60 ตามตาราง 11-12 ก็จะเป็นไปในทำนองเดียวกันคือ อากาโรสที่สกัดแยกจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 และล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะให้ค่าความแข็งของเจลสูงเมื่อเทียบกับอากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดอื่น ส่วนค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสของอากาโรสนั้นก็ยังจัดอยู่ในช่วง high EEO คือมีค่าเท่ากับ 0.28 และ 0.30 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงสมบัติด้านอื่น ๆ แล้ว อากาโรสที่สกัดได้โดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล จะมีอุณหภูมิของการเกิดเจลอยู่ในช่วง 35.5-45.5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของการหลอมเหลวอยู่ในช่วง 75.0-94.5 องศาเซลเซียส และมีเถ้าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.82-1.63

อย่างไรก็ตามอากาโรสที่ได้จากการล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ก็มีแนวโน้มว่าจะมีสมบัติด้านต่าง ๆ ดีขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลและใช้วุ้นที่มีคุณภาพดี คือใช้วุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสเป็นสารตั้งต้นในการสกัดอากาโรส

ตาราง 10 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีน-ไกลคอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 20 องศาเซลเซียส			อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส		
	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	888
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	*	*	*	*	*	45.5
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	*	*	*	*	*	94.5
ความชื้น (ร้อยละ)	16.49	15.15	16.09	16.04	15.66	19.03
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	0.82	0.88	0.47	1.22	0.50	0.48
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	37.10	36.59	36.27	36.40	38.14	35.40
เถ้า (ร้อยละ)	1.10	0.87	1.49	1.15	0.85	1.41
อิเล็กโทรเอนโดสโมซีส	*	*	0.25	*	*	0.27

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

* = ไม่ได้หาค่า

ตาราง 11 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายนอลิเอทิลีน-ไกลคอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 20 องศาเซลเซียส			อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส		
	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	839
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	*	*	*	*	*	45.5
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	*	*	*	*	*	94.5
ความชื้น (ร้อยละ)	13.75	14.41	13.45	14.99	15.24	18.49
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	1.17	0.77	0.63	1.48	0.48	0.80
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	36.38	36.40	33.21	37.10	36.89	34.15
เถ้า (ร้อยละ)	1.52	0.86	1.48	1.36	0.82	1.40
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	*	*	*	*	*	0.28

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

* = ไม่ได้หาค่า

ตาราง 12 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีน-ไกลคอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 60

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 20 องศาเซลเซียส			อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ 40 องศาเซลเซียส		
	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar	non-treated agar	10% alk. treated agar	20% alk. treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	< 100	526	600	< 100	< 100	870
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	*	35.5	41.1	*	*	44.2
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	*	83.0	75.0	*	*	94.5
ความชื้น (ร้อยละ)	16.88	14.54	16.38	15.06	12.95	18.00
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	1.46	0.71	0.66	1.38	0.90	0.69
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	31.25	33.66	33.26	36.71	33.21	37.47
เถ้า (ร้อยละ)	1.23	1.19	1.46	1.63	1.36	1.18
อิเล็กโทรเอนโดลโมซิส	*	0.26	0.25	*	*	0.30

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

* = ไม่ได้หาค่า

ผลการศึกษาสมบัติของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซน

เมื่อพิจารณาถึงสมบัติด้านต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซน พบว่าการใช้วุ้นที่มีคุณภาพดีเป็นสารตั้งต้นจะให้อากาโรสที่มีคุณภาพดี ทั้งวิธีการสกัดโดยใช้ไคตินและโดยใช้ไคโตแซนนั่นคือ อากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยใช้ไคตินหรือไคโตแซนจะให้ความแข็งของเจล 800 กรัมต่อตาราง-เซนติเมตร (ตาราง 13-14) มีปริมาณซัลเฟตร้อยละ 0.39 และ 0.49 ตามลำดับ ส่วนค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสมีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.24 และ 0.25 ตามลำดับ ซึ่งจัดว่าอยู่ในช่วง high EEO สำหรับอากาโรสที่สกัดแยกจากวุ้นชนิดอื่น ๆ จะมีค่าความแข็งของเจลต่ำ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ไคตินในการสกัดแยกอากาโรสจะมีแนวโน้มให้อากาโรสที่มีคุณภาพดีกว่าการใช้ไคโตแซน เมื่อใช้วุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบสเป็นสารตั้งต้น

ตาราง 13 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดได้โดยใช้ไคตินและล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ		
	non-treated agar	10%alkali-treated agar	20%alkali-treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	185	353	800
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	39.3	37.4	37.5
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	90.0	83.0	94.0
ความชื้น (ร้อยละ)	15.21	16.01	13.93
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	2.48	0.84	0.39
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	30.52	35.60	36.62
เถ้า (ร้อยละ)	1.47	2.03	1.75
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	0.48	0.25	0.24

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

ตาราง 14 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดได้โดยใช้ไคโตแซนและล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจากวุ้นชนิดต่าง ๆ		
	non-treated agar	10%alkali-treated agar	20%alkali-treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	< 100	320	800
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียล)	*	37.6	37.5
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียล)	*	84.0	93.5
ความชื้น (ร้อยละ)	15.01	16.37	17.37
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	2.01	1.02	0.49
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	31.59	32.99	38.85
เถ้า (ร้อยละ)	2.88	1.66	1.50
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	*	0.34	0.25

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

* = ไม่ได้หาค่า

ผลการศึกษาสมบัติของอากาโรสที่สกัดแยกโดยใช้ไอโซโปรปานอล

การสกัดแยกอากาโรสโดยวิธีนี้จะให้อากาโรสที่มีค่าความแข็งของเจลสูงถึง 870 กรัมต่อตารางเซนติเมตร มีปริมาณซัลเฟตร้อยละ 0.35 และค่าอิเล็กโทร-เอนโดสโมซิส 0.23 ซึ่งจัดว่าอยู่ในช่วง high EEO (ตาราง 15)

เมื่อพิจารณาถึงสมบัติด้านต่าง ๆ ของอากาโรสที่ได้โดยวิธีนี้จะพบว่าเป็นอากาโรสที่มีคุณภาพดีพอสมควรเทียบกับอากาโรสที่ได้โดยวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้วิธีการเตรียมอากาโรสก็สะดวกรวดเร็ว ใช้สารเคมีที่หาง่ายและราคาถูก

ตาราง 15 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสที่สกัดได้โดยใช้ไอโซโปรปานอลและล้างตะกอนอากาโรสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

สมบัติ	อากาโรสที่สกัดจาก 20% alkali- treated agar
ความแข็งของเจล (กรัมต่อตารางเซนติเมตร)	870
อุณหภูมิของการเกิดเจล (องศาเซลเซียส)	41.5
อุณหภูมิของการหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	96.0
ความชื้น (ร้อยละ)	16.85
ปริมาณซัลเฟต (ร้อยละ)	0.35
ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดร-กาแลคโตส (ร้อยละ)	37.96
เถ้า (ร้อยละ)	2.17
อิเล็กโทรเอนโดสโมซิส	0.23

(ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ครั้ง)

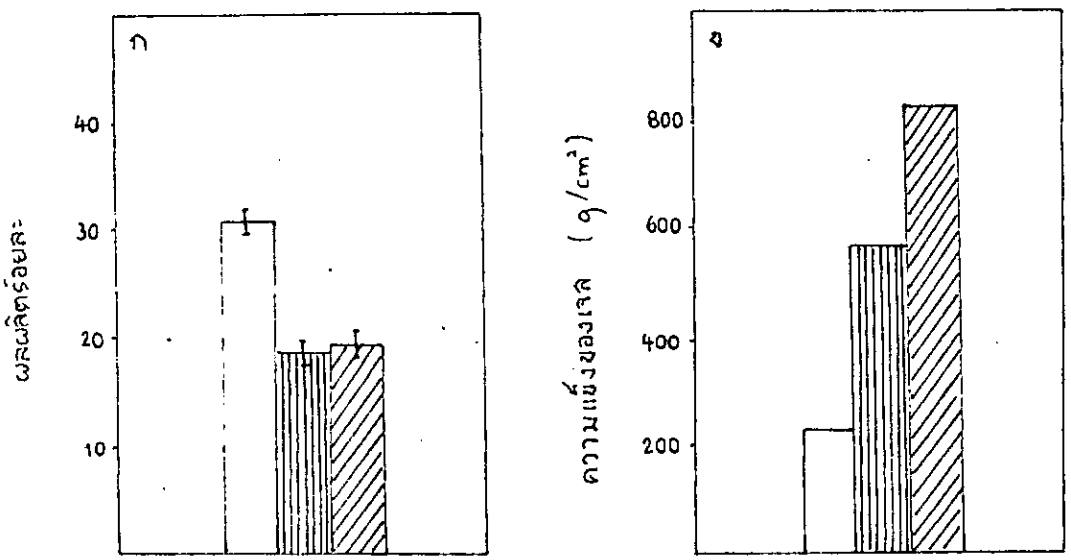
บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

ผลจากการศึกษาสมบัติของวุ้นที่สกัดได้พบว่า วุ้นที่สกัดจากสาหร่ายทะเลจะมีคุณภาพดีขึ้น เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับเบสโดยจะมีค่าความแข็งของเจลสูงขึ้นจาก 114 เป็น 825 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ทั้งนี้เนื่องจากมีการกำจัดหมู่ซัลเฟตออกไปจากโมเลกุลของกาแลคโตสซัลเฟต และเกิดเป็น 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตส ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เพิ่มความแข็งให้แก่วุ้นนั่นเอง (Duckworth and others. 1971 : 9) ดังนั้นปริมาณซัลเฟตและปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตสของวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นมากขึ้นจะมีค่าสวนทางกัน คือ ปริมาณซัลเฟตจะลดลง และปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตสเพิ่มขึ้น (ตาราง 6) ซึ่งผลการวิจัยของซานโตสและโดตี (Santos and Doty. 1983 : 34) ก็มีข้อมูลที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ อย่างไรก็ตามปริมาณซัลเฟตที่เหลืออยู่ในวุ้นก็ยังมีอยู่มากพอสมควรจึงทำให้วุ้นที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับเบสแล้ว มีค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสจัดอยู่ในขั้น high EEO (ตาราง 2) และเมื่อพิจารณาถึงผลผลิตร้อยละของวุ้นที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล จะเห็นว่ามีค่าลดลงจากร้อยละ 30 เป็นร้อยละ 19 เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับเบส (ตาราง 5) หรือลดลงประมาณ 1/3 เท่า เมื่อคิดเทียบจากวุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบส แต่ค่าความแข็งของเจลจะสูงขึ้นมากกว่า 7 เท่าของวุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบส (ภาพประกอบ 8)

การสกัดอาการาโรสโดยวิธีการต่าง ๆ ปรากฏว่า เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของอาการาโรสนั้น มีหลายประการ เช่น คุณภาพของวุ้นที่ใช้เป็นสารตั้งต้น กรรมวิธีที่ใช้ในการสกัดอาการาโรสโดยอาศัยหลักการหรือใช้สารเคมีที่แตกต่างกัน และวิธีการล้างตะกอนอาการาโรสที่สกัดได้อย่างไรก็ตามก็ต้องขึ้นอยู่กับจุดมุ่งหมายว่าจะนำอาการาโรสมาใช้ประโยชน์ในด้านใด ทั้งนี้เนื่องจากว่าอาการาโรสที่ใช้ในงานด้านต่าง ๆ จะมีคุณภาพแตกต่างกันไป



ภาพประกอบ 8 ก แสดงผลผลิตร้อยละของวุ้นชนิดต่าง ๆ

ข แสดงความแข็งของวุ้นชนิดต่าง ๆ

□ = non-treated agar

▥ = 10% alkali-treated agar

▨ = 20% alkali-treated agar

เมื่อพิจารณาผลการทดลองตามตาราง 7-15 นั้นจะเห็นว่าแนวโน้มของอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ทำปฏิกิริยากับเบสซึ่งเป็นวุ้นที่ปรับคุณภาพให้ดีขึ้นแล้วนั้น จะมีคุณภาพดีคือมีความแข็งของเจลสูง ปริมาณซัลเฟตต่ำ และค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสต่ำ เมื่อเทียบกับอากาโรสที่สกัดโดยวิธีเดียวกัน จากวุ้นที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับเบส ดังนั้นในการสกัดอากาโรสให้มีคุณภาพดี ก็ควรใช้วุ้นที่มีคุณภาพดีเป็นสารตั้งต้นในการสกัด แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องพิจารณาถึงต้นทุนของการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมด้วย

กรรมวิธีในการสกัดอากาโรสก็มีผลต่อคุณภาพของอากาโรสเช่นกัน การใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์มีแนวโน้มที่จะให้อากาโรสที่มีคุณภาพดีมาก คือมีความแข็งของเจลสูง ปริมาณซัลเฟตต่ำ ปริมาณ 3,6-แอนไฮโดรกาแลคโตสสูง

และค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสต่ำ (ตาราง 7-9) เกย์สิเลและเรน (Guiseley and Renn. 1987 : 10) ได้ทำการทดลองสกัดแยกอากาโรสโดยวิธีการต่าง ๆ จากวุ้นที่มีปริมาณซัลเฟตร้อยละ 2.17 พบว่าอากาโรสที่ได้จากการใช้ควอเทอนารี-แอมโมเนียมคลอไรด์และคาร์ราจีแนน จะมีปริมาณซัลเฟตร้อยละ 0.40 ส่วนอากาโรสที่ได้จากการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล จะมีปริมาณซัลเฟตร้อยละ 0.80 สำหรับการใช้สารละลายเบนโซโท่เนียมคลอไรด์ ในการสกัดอากาโรสนั้น ได้อาศัยหลักการตกตะกอนของอากาโรเพคติน โดยใช้ควอเทอนารีแอมโมเนียมคลอไรด์และคาร์ราจีแนนทำให้ตะกอนของอากาโรเพคตินมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ใช้ในการสกัดอากาโรสเชิงอุตสาหกรรม (FMC Bioproducts Source Book. 1987 : 17) สำหรับอากาโรสที่สกัดโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอลจะมีคุณภาพต่ำกว่าวุ้นที่ใช้เป็นสารตั้งต้น (ตาราง 10-12) เช่น ทางด้านความแข็งของเจลมีค่าต่ำกว่า 100 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ทั้งนี้อาจเนื่องจากยังคงมีพอลิเอทิลีนไกลคอลปะปนอยู่ในอากาโรสที่ได้ ซึ่งวิธีการล้างตะกอนอากาโรสไม่สามารถทำให้อากาโรสที่ได้นั้นบริสุทธิ์ขึ้น

การสกัดอากาโรสจากสาหร่ายสกุลกราซิลาเรีย จากเกาะยอ จังหวัดสงขลานั้น พบว่า อากาโรสที่สกัดได้โดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์จะมีแนวโน้มที่จะเป็นอากาโรสชนิด LE (low EEO) ตามตาราง 7-9 (FMC Bioproduct Source Book. 1987 : 23) คือ มีแนวโน้มที่จะให้ค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสต่ำกว่า 0.15 ส่วนในการสกัดอากาโรสโดยใช้สารละลายพอลิเอทิลีนไกลคอล และไอโซโปรปานอล จะเป็นแนวทางในการสกัดอากาโรสชนิด HGT (high gelling temperature) สำหรับการสกัดอากาโรสโดยใช้ไคตินหรือไคโตแซนจะเป็นแนวทางในการสกัดอากาโรสชนิด HE (high EEO) (FMC Bioproduct Source Book. 1987 : 23) ซึ่งอากาโรสแต่ละชนิดจะเหมาะสมสำหรับงานทางชีวเคมีต่าง ๆ กันไป

เมื่อเทียบสมบัติต่าง ๆ ของอากาโรสแล้วจะพบว่า การสกัดอากาโรสแต่ละวิธีจะให้อากาโรสที่มีคุณภาพแตกต่างกันไป แต่อย่างไรก็ตามการใช้เบนโซโทเนียมคลอไรด์จะได้อากาโรสที่มีค่าความแข็งของเจลสูงมาก แต่ต้นทุนที่ใช้ในการผลิตจะสูงด้วย การใช้ไอโซโปรปานอลสกัดอากาโรสจะให้อากาโรสที่มีค่าความแข็งของเจลต่ำกว่าอากาโรสที่สกัดโดยใช้เบนโซโทเนียมคลอไรด์ แต่ค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสไม่แตกต่างกันมาก และการสกัดโดยใช้ไอโซโปรปานอลก็เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและต้นทุนต่ำ

นอกจากชนิดของวุ้นที่ใช้ในการสกัด กรรมวิธีในการสกัดแล้ว การล้างอากาโรสก็มีบทบาทสำคัญอย่างมากในการกำหนดคุณภาพและผลผลิตร้อยละของอากาโรส ได้มีการ

ทดลองนำเอาวุ้นที่ล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำหลาย ๆ ครั้งมาศึกษาเกี่ยวกับค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส พบว่าค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสจะลดลงเมื่อเทียบกับวุ้นเดิม (Guiseley and Renn. 1987 : 22) ทั้งนี้เนื่องจากการล้างตะกอนอากาโรสสามารถกำจัดสิ่งเจือปนบางอย่างออกไปได้ และยิ่งถ้าใช้อุณหภูมิในการล้างสูงขึ้น ความสามารถในการละลายของสิ่งเจือปนต่าง ๆ จะยิ่งสูงขึ้นจึงทำให้ผลผลิตร้อยละของอากาโรสน้อยกว่าการล้างที่อุณหภูมิต่ำ จากการศึกษาการสกัดอากาโรสโดยใช้เบนโซโทเนียมคลอไรด์ ผลผลิตร้อยละของอากาโรสที่ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะต่ำกว่าที่ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนการล้างตะกอนอากาโรสที่สกัดด้วยพอลิเอทิลีนไกลคอลนั้น การใช้น้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิสูงจะให้อากาโรสที่มีคุณภาพดีกว่าการใช้น้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิต่ำ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการสกัดอากาโรสแต่ละวิธีจะมีการล้างตะกอนอากาโรสที่เหมาะสมเฉพาะของแต่ละวิธี ทั้งนี้ยังคงต้องมีการศึกษาค้นคว้าต่อไปอีก

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

1. ศึกษาวิธีการสกัดแยกโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การใช้ DEAE-cellulose หรือ anion exchange resin อื่น ๆ ที่มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุเพื่อแยกอากาโรเพคตินออกไป

2. ศึกษาผลของการนำอากาโรสที่สกัดได้ไปใช้ในงานชีวเคมีขั้นสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์

3. ศึกษาแหล่งของสาหร่ายทะเลที่จะนำมาใช้สกัดอากาโรสที่มีคุณภาพดีที่สุด เพื่อเป็นแนวทางในการสกัดแยกอากาโรสในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป

4. ศึกษากรรมวิธีการล้างตะกอนที่เหมาะสมในแต่ละวิธีการสกัด เพื่อให้ได้อากาโรสที่มีคุณภาพดีที่สุด

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

สุวลี จันทร์กระจ่าง. "โครงสร้างและส่วนประกอบทางเคมีของวุ้น", ใน เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "การผลิตวุ้นจากสาหร่ายทะเล". หน้า 3-8. กรุงเทพ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2529.

โสพิศ มงคลศิริเกียรติ. "หลักการและเทคนิค Electrophoresis", ใน เอกสารการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม". หน้า 122-138. ขอนแก่น : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2529

ศุลกากร, กรม. "สถิติการค้าระหว่างประเทศของประเทศไทย", กรุงเทพมหานคร, 2530.

Allan, G.G. and others. "Marine polymers. Part I. A New Procedure for the Fractionation of Agar," Carbohydrate Research. 18(3) : 234-236; March, 1971.

Araki, C. "Agar-Agar. III. Acetylation of the Agar-like Substance of Gelidium amansii," Journal of the Chemical Society of Japan. 58(10) : 1338-1350; October, 1937.

_____. "Structure of the Agarose Constituent of Agar-Agar," Bulletin of the Chemical Society of Japan. 29(4) : 543-544; June, 1956.

Barteling, S.J. "A Simple Method for the Preparation of Agarose," Clinical Chemistry. 15(10) : 1002-1005; October, 1969.

Blethen, J. "Method for the Separation of Agaropectin from Agarose," Chemical Abstract. 66(4) : 1199; January, 1967.

Chapman, V.J. Seaweed and Their Uses. London : Methum Co. Ltd., 1970.

Dodgson, K.S. and R.C. Price. "A Note on the Determination of the Ester Sulphate Content of Sulphate Polysaccharides," Biochemical Journal. 84(1) : 106-110; January, 1962.

Duckworth, M. and others. "Agar polysaccharides of Gracilaria species," Carbohydrate Research. 18(1) : 1-9; January, 1971.

FMC Bioproducts Source Book. Maine : FMC Corporation. 1988.

Goto, F. and T. Fuse. "Studies on Utilization of Agar. Part X. Some Properties of Agarose and Agaropectin isolate from Various Mucilaginous Substances of Red Seaweeds," Agricultural and Biological Chemistry. 35(6) : 799-804; June, 1971.

Guiseley, K.B. "The Relationship Between Methoxyl Content And Gelling Temperature of Agarose," Carbohydrate Research. 13(1) : 247-256; January, 1970.

Guiseley, K.B. and D.W. Renn. "Agarose" Marine Colloids. FMC Corporation. 1977, 1-34 p.

_____. "Agarose as A Repleacement for Agar in Biomedical Applications." Marine Colloids. FMC Corporation. 1987, 1-37 p.

Hirase, S. "Chemical Constitution of Agar-Agar. XIX. Pyruvic Acid as A Constituent of Agar-Agar. I. Identification and Estimation of Pyruvic Acid in Hydrolysis of Agar," Bulletin of Chemical Society of Japan. 30(1) : 68-70; January, 1957.

Hjerten, S. "Agarose as An Anticonvection Agent in Zone Electrophoresis," Biochimica Et Bipphysica Acta. 53(3) : 514-517; November, 1961.

_____. "A New Method for Preparation of Agarose for Gel Electrophoresis," Biochimica Et Biophysica Acta. 62(3) : 445-449; August, 1962.

Laserna, E.C. and R.L. Veroy. "Extracts from Some Red and Brown Seaweed of Philippine," Proceedings of the Tenth International Seaweed Symposium. 10(1) : 443-448; August, 1981.

Park, Y.Y. and others. "Effect of Acid Treatment of Extractability and Properties of Agar," Chemical Abstract. 104(9) : 586; March, 1986.

Percival, E. "Algal Polysaccharides and Their Biplogical Relationships," Proceedings of the Fourth International Seaweed Symposium. 5(1) : 18-35; September, 1966.

Rees, D.A., "Shapely Polysaccharides," Biochemical Journal. 126(1) : 257-273; January, 1972.

Russell, B., T.H. Mead and A. Polson. "A Method of Preparating Agarose," Biochimica Et Bipphysica Acta. 86(1) : 169-174; April, 1964.

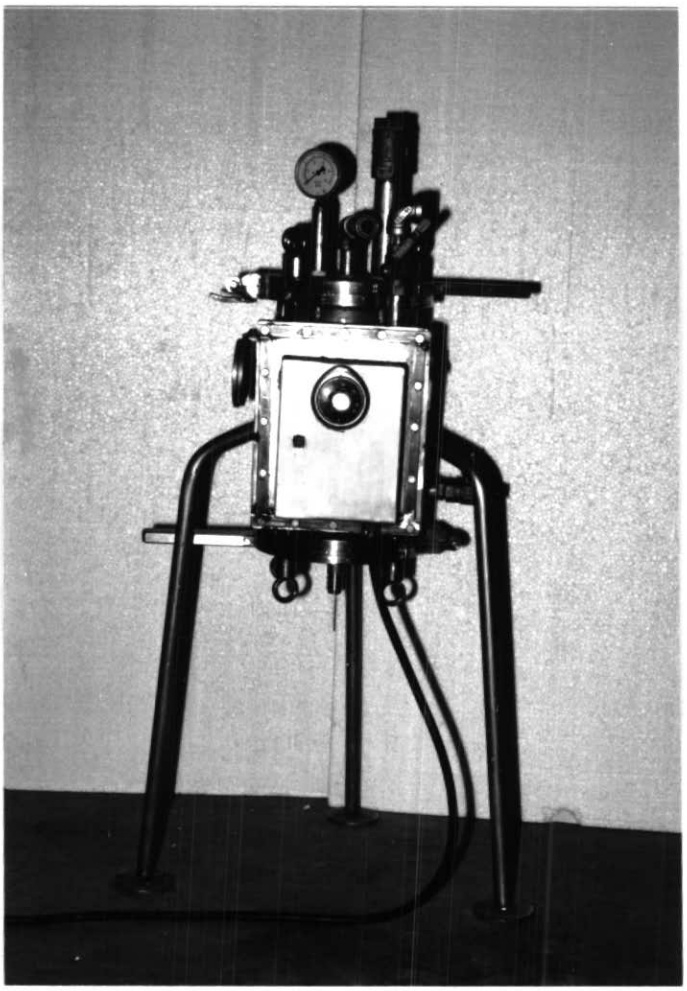
Santos, G.A. and M.S. Doty. "Agarose from Gracilaria cylindrica," Botanica Marina. 26(1) : 31-34; August, 1983.

Wieme, R.J. Agar Gel Electrophoresis. 2nd ed. Amsterdam : Elsevier Publishing Company, 1965.

Yaphe W. and G.P. Arsenault. "Improved Resorcinol Reagent for the Determination of Fructose, and of 3,6-Anhydrogalactose in Polysaccharides," Analytical Biochemistry. 13(1) : 143-148; October, 1965.

ภาคผนวก

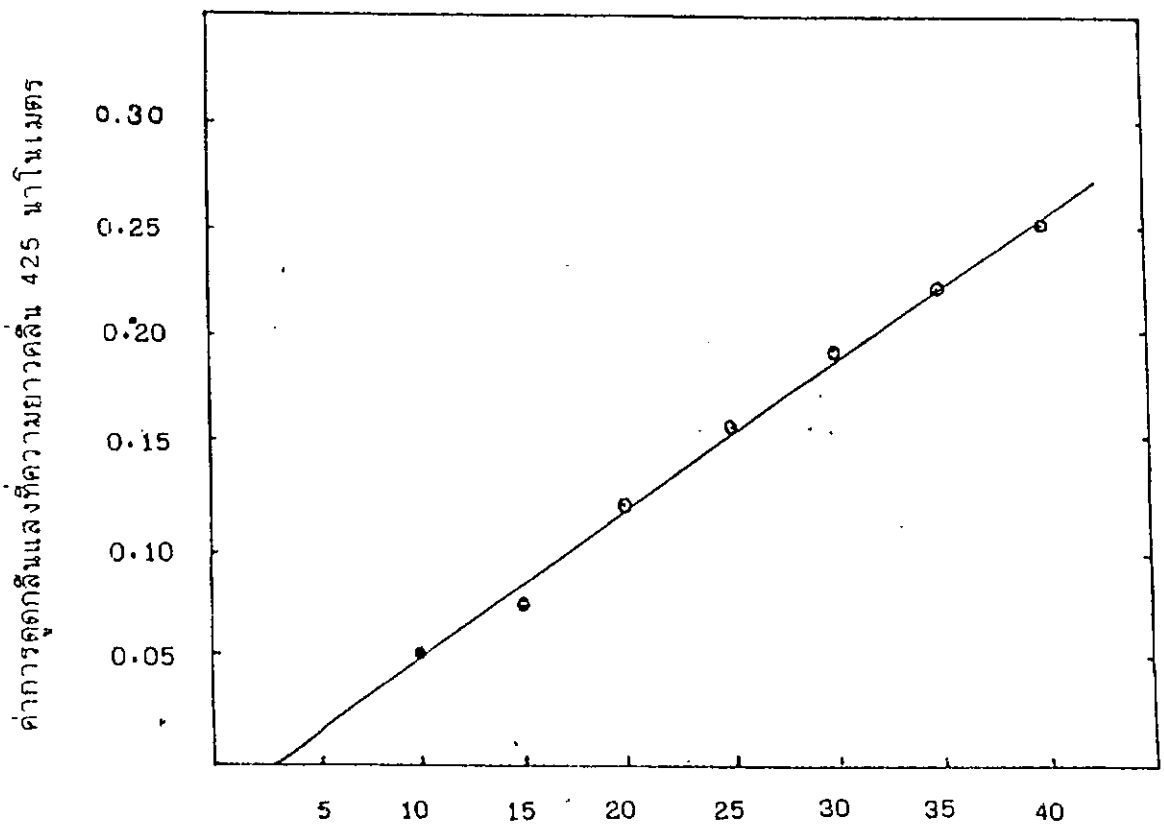
ภาพประกอบ 9 สาหร่ายทะเลแห้งและสาหร่ายทะเลแห้งสะอาด



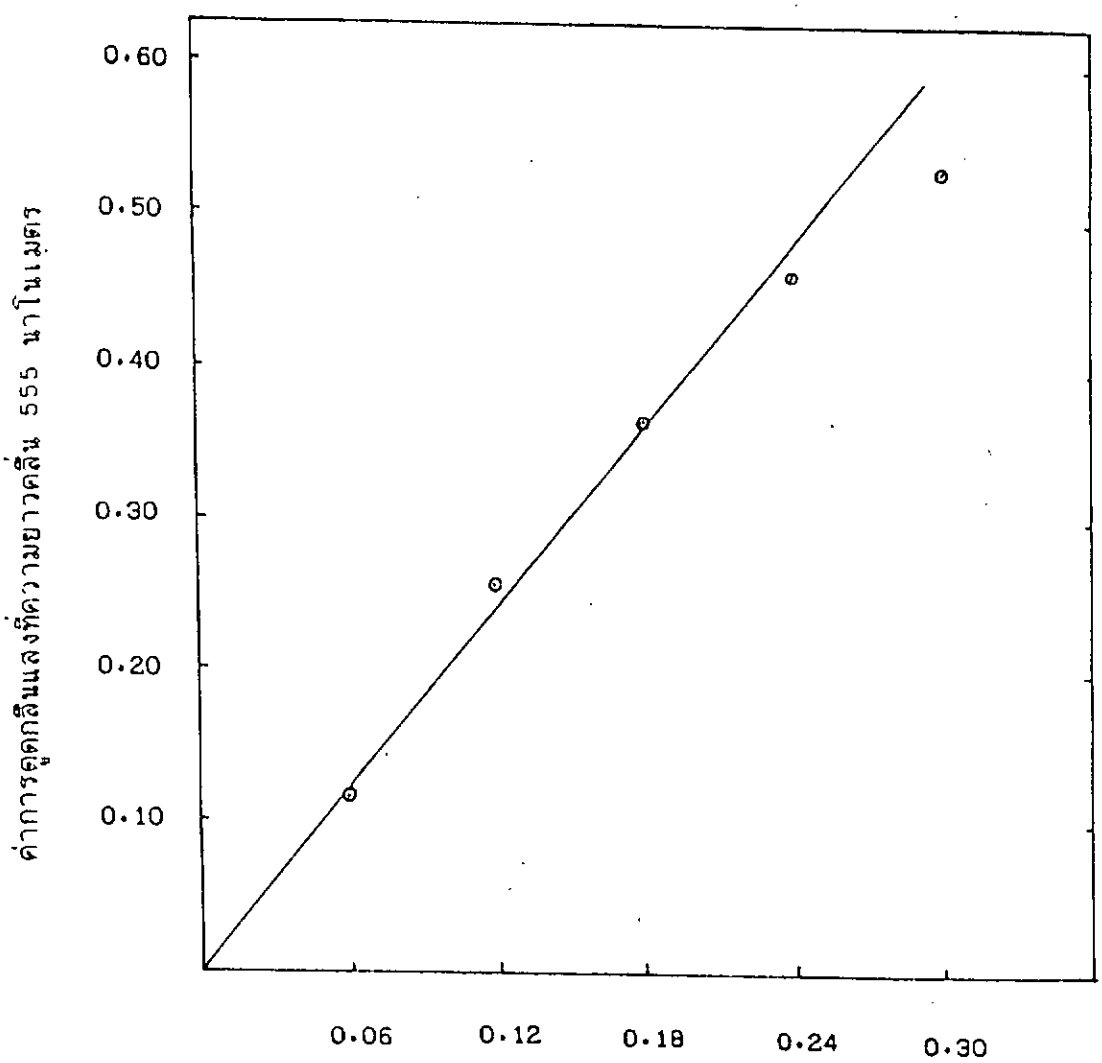
ภาพประกอบ 10 เครื่องกรองภายใต้ความดัน

ภาพประกอบ 11 เครื่องวัดความแข็งของเจล

ภาพประกอบ 12 เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้ในการหาค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิส



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายซัลเฟตมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายฟรุกโตสมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 555 นาโนเมตร

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวเสาวนีย์ ชื่อสกุล เสาวภาพโสภา

เกิดวันที่ 14 เดือน มกราคม พุทธศักราช 2508

สถานที่เกิด จังหวัดกรุงเทพฯ

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 15/103 หมู่ 9 ตรงข้ามโรงพยาบาลสยาม
ซอยโชคชัย 4 ลาดพร้าว เขตบางกะปิ
จังหวัดกรุงเทพฯ 10230

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2525 มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเซนต์จอห์น

พ.ศ.2529 กศ.บ. (เคมี) (เกียรตินิยม อันดับ 2)
จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปทุมวัน

พ.ศ.2533 กศ.ม. (เคมี) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร

การศึกษาวิธีการแยกและสมบัติของอากาโรสจากสาหร่ายสกุลกราซิลาเรียในประเทศไทย

บทคัดย่อ

ของ

เสาวนีย์ เสาวภาพโสภา

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต วิชาเอกเคมี
มีนาคม 2533

บทคัดย่อ

อากาโรสเป็นไบโอพอลิเมอร์ที่เป็นองค์ประกอบของวุ้นซึ่งสกัดจากสาหร่ายทะเลสีแดงบางชนิด เช่น กราซิลาเรียและเจลลิเดียม เนื่องจากอากาโรสมีประจุไฟฟ้าเป็นกลาง จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นตัวกลางค้ำจุนในงานทางด้านการเคลื่อนย้ายสู่ขั้วไฟฟ้า อิมมูโนดิฟฟิวชัน และเจลฟิวเตรชัน ในการทดลองสกัดอากาโรสจากวุ้นที่ได้จากสาหร่ายทะเลสกุลกราซิลาเรีย จังหวัดสงขลา โดยวิธีต่าง ๆ 4 วิธีคือ การใช้เบนโซโทเนียมคลอไรด์ พอลิเอทิลีนไกลคอล ไดเตนหรือไดโตแซน และไอโซโปรปานอล พบว่าอากาโรสที่สกัดจากวุ้นที่ได้ทำปฏิกิริยากับเบสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยใช้สารละลายเบนโซโทเนียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะเป็นอากาโรสที่มีคุณภาพดีที่สุด นั่นคือ มีค่าความแข็งของเจลสูงถึง 1070 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ปริมาณซัลเฟตร้อยละ 0.14 และค่าอิเล็กโทรเอนโดสโมซิสเท่ากับ 0.21

A STUDY OF THE SEPARATION METHODS AND PROPERTIES OF AGAROSE FROM *GRACILARIA SPP.* IN THAILAND

AN ABSTRACT

BY

SOUWANEE SOUVAPHAPSOPHA

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree in Chemistry
at Srinakarinwirot University
March 1990

ABSTRACT

Agar , extracted from red seaweeds, are comprised of neutral "agarose" and ionic "agaropectin". The nonionic, gelling character of agarose offers advantages for many uses in biotechnology. Most processes for isolating agarose from agar are based on differences in solubility and/or chemical reactivity associated with the anionic character of the agaropectin. The present report compared four different agarose separation procedures from Gracilaria spp. of Songkhla province. Among the methods using polyethylene glycol, chitin/chitosan, isopropanol and benzothonium chloride, the latter gave the best quality of agarose as judged by the highest gel strength (1070 g/cm^2), the lowest sulfate content (0.14%) and, rather low electroendosmosis value (0.21).