

589.3
W544n

8.3

การศึกษาการพัฒนาอากาศไร้ค่าอิเล็กทรอนิกส์โมซิส

เพื่อใช้ในงานด้านไอซีอิเล็กทรอนิกส์กำลัง



๕๘ พ.ศ. 2540

ปริญญานิพนธ์

ของ

พานี จักรแสงชัยโชติ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

มีนาคม 2540

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

๖๗๗๐๐

การศึกษาการพัฒนาอากาศไรสที่ไม่มีกำอิล็กโทรเอ็นคอสโมซิส
เพื่อใช้ในการงานด้านไอโซอิล็กทริกโพกัสซิง

บทคัดย่อ
ของ
พานิ จักรแสงชัยโชติ

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ

มีนาคม 2540

จากการใช้ DEAE cellulose เพื่อลดประจุลบ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ agarose/LE พบว่าอากาโรส (agarose/DE) ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง และค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสลดลงจาก 0.078 เป็นศูนย์ และผลผลิตที่ได้คิดเป็นร้อยละ 78.44 พบว่า ไม่สามารถนำ agarose/LE มาใช้ในงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงได้

จากนั้น ได้ทดลองนำ neutral polymer บางชนิด เช่น guar gum ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นกาแลคโตแมนแนน มาผสมกับ agarose/DE ในอัตราส่วนของอากาโรสต่อกัวกัม เท่ากับ 8:2 , 7:3 และ 6:4 พบว่าค่าของอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสของอากาโรสที่ผสมกัวกัมมีค่าเท่ากับศูนย์ และค่าของ gel strength ที่ได้ลดลงจาก 1,284 เป็น 736 , 583 , และ 473 กรัม/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับของอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นของ guar gum ในขณะที่ค่าของความหนืดจะเพิ่มขึ้นเป็น 10.6 , 15.2 และ 19.2 cps. ตามลำดับ

เมื่อนำสารผสมระหว่างอากาโรส และกัวกัม ในอัตราส่วนต่าง ๆ มาทดสอบการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ในช่วง pH 3-10 และ pH 5-8 พบว่าอัตราส่วนระหว่างอากาโรสและ guar gum ที่เหมาะสมที่สุดคือ 7:3 เพราะสามารถแยกโปรตีนมาตรฐานได้ครบทุกตัว นอกจากนี้ เมื่อนำค่าระยะทางของโปรตีนที่แยกได้มา plot เป็นเส้นกราฟเทียบกับค่า pI พบว่ากราฟที่ได้มีลักษณะเกือบจะเป็นเส้นตรง

อย่างไรก็ตาม ระยะห่างระหว่างตำแหน่งของโปรตีนจะไม่ตรงกับตำแหน่งของโปรตีนที่ได้จาก Isogel/FMC ทั้งนี้ เนื่องจากวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตอากาโรสต่างชนิดกัน อีกทั้งชนิดของ neutral polymer ที่นำมาผสม ล้วนมีผลทำให้ ลักษณะของเจล และรูปแบบของโปรตีนมาตรฐานแตกต่างกันไป

THE STUDY OF ELECTROENDOSMOSIS-FREE AGAROSE DEVELOPMENT
FOR ISOELECTRIC FOCUSING

AN ABSTRACT
BY
PANEE CHAKSANGCHAICHOT

Presented in partial fulfillment of the requirements for the
Master of Science degree in Biological Chemistry
at Srinakarinwirot University
March 1997

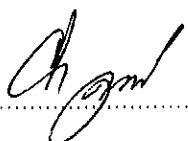
From the development of agarose production by using DEAE-cellulose (DE52) to remove the negative charges in agarose/LE, it was found that the highly purified agarose (agarose/DE) with zero electroendosmosis value was obtained with the percent yield of 78.44. This agarose/DE was not suitable for the supporting medium in isoelectric focusing.

Neutral polymer, guar gum, was blent in agarose/DE at the ratio of 8:2 , 7:3 and 6:4. The electroendosmosis value of the blended agaroses were zero and the viscosity was increased from 8.01 to 10.5 , 14.6 and 19.2 cps. respectively while tthe gel strength decreased from 1,284 to 736 , 583 and 473 g/cm³ respectively.

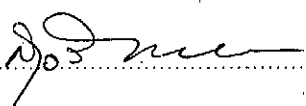
It was found that the blended agarose/DE at the ratio of 7:3 is the most suitable for using as the supporting medium in isoelectric focusing both at pH 3-10 and pH 5-8 because all of the standard proteins marker can be separated and a standard curve is nearly to be a linear. However, the distance and the position of standard pI markers were different from those of the agarose/FMC. This may be due to the difference of agar sources and types of neutral polymer mixed in the agarose. Both of these factors significantly affect froms of the gel and the pattern of standard protein

คณะกรรมการควบคุมและคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอก
เคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการควบคุม

.....ประธาน

(รศ.ดร. อารารัตน์ ศุภศิริ)

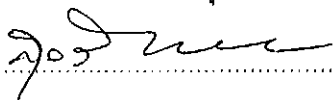
.....กรรมการ

(ผศ. สุวดี จันทร์กระจ่าง)

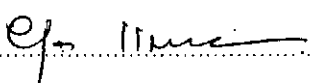
คณะกรรมการสอบ

.....ประธาน

(รศ.ดร. อารารัตน์ ศุภศิริ)

.....กรรมการ

(ผศ. สุวดี จันทร์กระจ่าง)

.....กรรมการที่แต่งตั้งเพิ่มเติม

(ผศ. ยุวาท แท่งเที่ยง)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต วิชาเอกเคมีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ดร. ศิริยุภา พูลสุวรรณ)

วันที่ 13 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2540

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจาก รศ.ดร. ชารารัตน์ ศุภศิริ และผศ. สุวลี จันทรกระจ่าง รวมทั้ง ผศ. ยุกา แดงเที่ยงที่ได้ให้ความช่วยเหลือตลอดการทำปริญญานิพนธ์ และกรุณาร่วมเป็นกรรมการในการสอบผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ภาณี วัฒนโฆฬาร และอาจารย์อนัญญา ไตรบำรุงสุข ที่ให้ความช่วยเหลืออุปกรณ์ และคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดการทำปริญญานิพนธ์

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องบดละเอียด (Mortar Grinder)

ขอขอบคุณ รศ.ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์การถ่ายภาพ

ความดีของปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขออุทิศแด่ คุณสุภาพร จิตต์โกศลวิทย์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดที่มีชีวิตอยู่

ขอโน้มรำลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนในด้านการศึกษาและขอโน้มรำลึกถึงพระคุณของท่านอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณศิวาพร ลงยันต์ คุณวันเพ็ญ สาหร่ายทองคำ คุณสมปอง ใจดีเฉย คุณคงศักดิ์ ตั้งปนิธานดี รวมทั้งเพื่อน ๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

ภาณี จักรแสงชัยโชติ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำและเอกสารอ้างอิง	1
สาหร่ายทะเล	2
สาหร่ายสกุล Gracilaria	5
อากาศและอากาศไรเฟคติน	12
ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง	15
การผลิตอากาศไรส.....	20
คุณสมบัติของอากาศไรส.....	25
กัวกัม	27
ความมุ่งหมาย	31
ความสำคัญ	31
ขอบเขตของการศึกษา	31
2 วิธีการวิจัย	32
อุปกรณ์การทดลอง	32
สารเคมี	32
วิธีดำเนินการทดลอง	33
การเตรียมอากาศไรสให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น	34
การเตรียมกัวกัม	34
การเตรียมอากาศไรสเพื่อใช้ในงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง.....	35
การนำอากาศไรสไปใช้งานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง	35
การวิเคราะห์คุณภาพของอากาศไรส	36
3 ผลการวิจัย	43

4 สรุปและอภิปรายผล	64
บรรณานุกรม	70
ภาคผนวก	76
ประวัติย่อของผู้วิจัย	83

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

- 1 การใช้ผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายทะเล และมูลค่าการ
ตลาดของผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากสาหร่ายทะเล 4
- 2 ค่ามาตรฐานของอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสของ
อากาศโรสเจลซึ่งจำหน่ายทางการค้า 26
- 3 องค์ประกอบต่าง ๆ ของแก้วกัม..... 29
- 4 สมบัติต่าง ๆ ของ agarose, agarose/DE, agarose 8/2,
agarose 7/3 และ agarose 6/4 49

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 แสดงแผนภูมิการจัดจำแนกสาหร่ายทะเล	3
2 วงจรชีวิตของสาหร่าย Gracilaria	10
3 โครงสร้างของอากาโรส	12
4 โครงสร้างของอากาโรเพคติน	13
5 ขั้นตอนปฏิกิริยาในการกำจัดเซลล์ออกจากวุ้นด้วยเบส	13
6 แสดงการจัดเรียงตัวของแอมโฟไลต์ภายใต้สนามไฟฟ้า	16
7 โครงสร้างของสารแอมโฟไลต์	17
8 ภาพแสดงคอลัมน์ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง	18
9 ตัวอย่างของไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงโดยใช้เจล	19
10 แสดงแถบของ human plasma ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ electroendosmosis-free อากาโรสเจล	23
11 แสดงแถบของ human plasma ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อากาโรสที่ได้จากการจำหน่ายทางการค้า.....	23
12 แสดงแถบของ human blood haemolysates ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง	24
13 แสดงตัวอย่างของเมล็ดและฝักของถั่วลิสง	29
14 โครงสร้างของถั่วลิสง	30
15 โครงสร้างทางเคมีของ polymannan และ galactomannan	30
16 แสดงตำแหน่งการเจาะวุ้นให้เป็นหลุมบนแผ่นสไลด์	38
17 รูปแบบต่าง ๆ ของก้านหมุน	39
18 ขั้นตอนการเตรียมอากาโรสให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ DE52	40
19 ขั้นตอนการเตรียมผงถั่วลิสง	41

20	ขั้นตอนในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง	42
21	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ HE agarose	50
22	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ LE agarose	50
23	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose/DE	51
24	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose 8/2	51
25	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose 7/3	52
26	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose 6/4	52
27	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose/FMC และ agarose 7/3	53
28	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose/DE	53
29	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose 8/2	54
30	แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose 7/3	54

31 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose 6/4	55
32 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose/FMC	55
33 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 3-10 โดยใช้ Isogel/FMC เป็น supporting medium	56
34 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 3-10 โดยใช้ agarose 8/2 เป็น supporting medium	57
35 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 3-10 โดยใช้ agarose 7/3 เป็น supporting medium	58
36 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 3-10 โดยใช้ agarose 6/4 เป็น supporting medium	59
37 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 5-8 โดยใช้ Isogel/FMC เป็น supporting medium	60
38 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 5-8 โดยใช้ agarose 8/2 เป็น supporting medium	61
39 กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 5-8 โดยใช้ agarose 7/3 เป็น supporting medium	62

40	กราฟมาตรฐานของโปรตีน ที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก- โฟกัสซิง pH 5-8 โดยใช้ agarose 6/4 เป็น supporting medium	63
41	โครงสร้างของ DEAE cellulose	64
42	แสดงแถบของสารโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยใช้ agarose/DE ละลายในสารละลายกัวกัม เปรียบเทียบกับการใช้ agarose/FMC	66
43	รูปแบบของสารโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการทำ ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยใช้อากาศ และ แอมโฟไลต์ของบริษัท Pharmacia เปรียบเทียบ กับอากาศ และแอมโฟไลต์ของบริษัท FMC	69

บทที่ 1

บทนำและเอกสารอ้างอิง

บทนำ

สาหร่ายทะเลเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม
มนุษย์รู้จักใช้ประโยชน์จากสาหร่ายทะเลมาเป็นเวลานานแล้ว จากการพัฒนาความรู้
และความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะ
ศึกษาถึงรายละเอียดต่าง ๆ เกี่ยวกับสาหร่าย ไม่ว่าจะเป็นลักษณะภายนอก หรือลักษณะ
ภายในของสาหร่าย หรือศึกษาละเอียดลึกลงไปถึงโครงสร้างทางเคมีของสาหร่าย เพื่อ
ที่จะนำความรู้นั้นมาพัฒนาทั้งทางด้านการเพาะเลี้ยงให้ได้สาหร่ายทะเลที่มีคุณภาพ และ
ทางด้านการแปรรูปสาหร่ายทะเลให้เป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่นแปรรูปในรูปของวุ้น
(agar) คาราจีแนน (carragenan) และแอลจิน (algin) เป็นต้น

วุ้นเป็นผลิตภัณฑ์อย่างหนึ่งที่ได้มาจากสาหร่ายทะเล และมีการพัฒนาการ
ผลิตอยู่ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากการใช้ประโยชน์จากวุ้นมีมากมายไม่ว่าจะเป็น
ทางด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ จนกระทั่งการนำไปใช้ในหีองปฏิบัติการ นอกจากนี้มีการ
นำวุ้นมาพัฒนาเพื่อให้ได้วุ้นที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเรียกว่าอากาโรส (agarose)

อากาโรสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงมาก การนำอากาโรสไปใช้งานนั้นส่วน
ใหญ่จะเป็นทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากคุณสมบัติที่สำคัญของอากาโรส คือมี
ความสามารถในการเป็นตัวยัดเกาะสำหรับการแพร่ และการเคลื่อนที่ของสารโดยอาศัย
กระแสไฟฟ้า นอกจากนี้อากาโรสเป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุ และสามารถอยู่ในสภาพ
เจลได้ดีแม้จะมีความเข้มข้นต่ำ

การใช้ประโยชน์จากอากาโรสในอีกด้านหนึ่งก็คือ การวิเคราะห์ทางด้าน
ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Isoelectric focusing) ซึ่งเป็นเทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิส
(electrophoresis) อีกชนิดหนึ่ง จำเป็นต้องใช้อากาโรสที่มีความบริสุทธิ์สูงมากหมายถึง
เป็นอากาโรสชนิดที่ไม่มีประจุ หรือมีน้อยมากจนไม่สามารถวัดได้ จึงจะสามารถนำมา
ใช้กับงานด้านนี้ได้

ปัจจุบันประเทศไทยต้องสั่งซื้ออาหารโรส เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยและเนื่อง จาก เป็นสารที่มีราคาแพง จึงทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ในห้วงปฏิบัติการชีวเคมีพื้นฐาน ได้อย่างสะดวก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการวิจัยและพัฒนาในการผลิตอาหาร- โรสชนิดที่ไม่มีประจุหรือมีอยู่น้อยมาก ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางให้สถาบันการศึกษา สามารถมีสารชนิดนี้ไว้ใช้ในการเรียนการสอนในห้วงปฏิบัติการเพื่อเรียนรู้เทคนิค เบื้องต้นของการแยกสารทางชีวเคมี และเพื่อให้นักศึกษาเป็นแนวทางในการผลิต อาหารโรสในระดับโรงงานนำร่อง (pilot scale) ในอนาคต

1. สาหร่ายทะเล

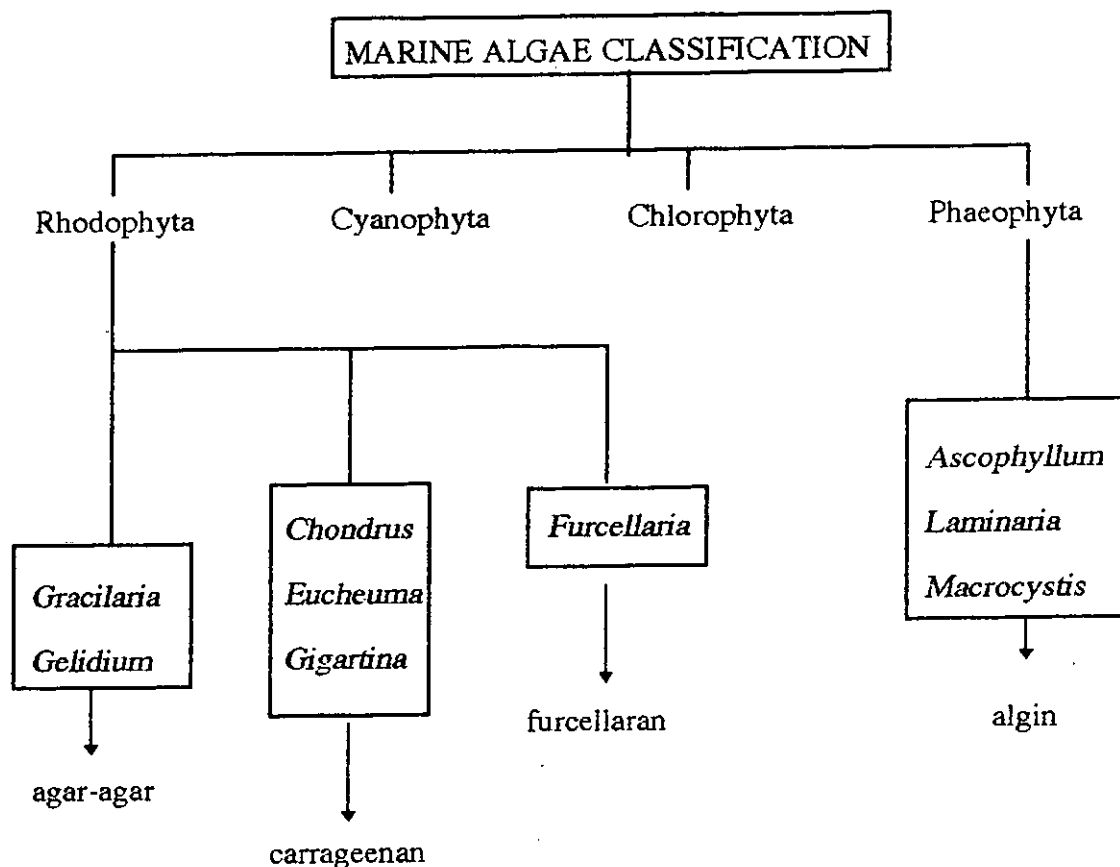
สาหร่ายทะเลเป็นพืชที่อาศัยอยู่ในทะเล และสามารถสังเคราะห์แสงเองได้ โครงสร้างของสาหร่ายทะเลที่พบในธรรมชาติจะมีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดี่ยว จนถึง โครงสร้างที่มีหลายเซลล์และซับซ้อน ดังนั้นการนำสาหร่ายทะเลมาใช้ให้เป็นประโยชน์นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดและองค์ประกอบต่าง ๆ ที่พบในสาหร่ายทะเล โดยทั่วไปการใช้ ประโยชน์จากสาหร่ายทะเลอาจแบ่งได้เป็น 2 แบบได้แก่

1. การบริโภคสาหร่ายทะเลเป็นอาหารโดยตรงสำหรับมนุษย์
2. การใช้ผลิตภัณฑ์สารไฟโคคอลลอยด์ (Phycocolloids) จากสาหร่ายทะเล ในทางอุตสาหกรรมด้านผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และเครื่องสำอางค์ เป็นต้น

สาหร่ายทะเลสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก คือ (Guiseley and Renn, 1982)

1. กลุ่มสาหร่ายทะเลสีแดง หรือ Rhodophyta (red algae)
2. กลุ่มสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล หรือ Phaeophyta (brown algae)
3. กลุ่มสาหร่ายทะเลสีเขียว หรือ Chlorophyta (green algae)
4. กลุ่มสาหร่ายทะเลสีน้ำเงินแกมเขียว หรือ Cyanophyta (blue-green algae)

(ภาพประกอบ 1)



ภาพประกอบ 1 แสดงแผนภูมิการจัดจำแนกสาหร่ายทะเล

สาหร่ายสีแดง จัดว่าเป็นสาหร่ายที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงที่สุด เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสาหร่ายสีแดง สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางการค้าสูงรองลงมาคือแอลจินจากสาหร่ายสีน้ำตาล โดยมูลค่าตลาดรวมของผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายทะเลทั้ง 4 ชนิดนี้มีมากกว่า 500 ล้าน ดอลลาร์ (Radmer, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตาราง 1 แสดงการใช้ผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายทะเลและมูลค่าการตลาดของผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากสาหร่ายทะเล (Radmer. 1996)

Product	Use	Market value (million \$US)
Nori	Food	1800
Wakame	Food	600
Kombu	Food	600
Alginates	Food products	230
	Paper products	
	Biomedical applications	
Carrageenans	Food products	100
	Cosmetics	
	Pharmaceutical products	
Agars	Food products	160
	Biomedical applications	
Agaroses	Biotechnology applications	more than 50
Seaweed meal	Animal feed	5

จากภาพประกอบ 1 สาหร่ายทะเล กลุ่มที่เป็นสาหร่ายให้วุ้น คือกลุ่มของสาหร่ายสีแดง ซึ่งได้แก่สกุล *Gracilaria* และ *Gelidium* สาหร่ายให้วุ้นมักเรียกว่า อากาโรไฟต์ (agarophyte) สาหร่ายให้วุ้นที่พบในประเทศไทยโดยส่วนใหญ่ได้แก่สาหร่ายในสกุล *Gracilaria*

2. สาหร่ายสกุล *Gracilaria*

สาหร่ายในสกุล *Gracilaria* มีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน (taxonomy) ดังต่อไปนี้

Division	Rhodophyta
Class	Rhodophyceae
Subclass	Florideophycidae
Order	Gigartina
Family	Gracilariaceae
Genus	<i>Gracilaria</i>

2.1 สภาพนิเวศน์และการกระจายของสาหร่ายสกุล *Gracilaria*

สาหร่ายสกุล *Gracilaria* มีกระจายอยู่ทั่วโลกทั้งในเขตร้อน และเขตอบอุ่น ซึ่งประมาณกันว่ามีถึง 160 ชนิด (Patwary and Van der meer. 1983, Santelices and Doty. 1989) ในธรรมชาติสาหร่ายสกุล *Gracilaria* จะปรากฏอยู่บริเวณน้ำขึ้น-น้ำลง (intertidal zone) และบริเวณที่อยู่ใต้น้ำตลอดเวลา (subtidal zone) โดยจะพบเกาะอยู่กับวัตถุใต้น้ำ เช่น กรวด หินขนาดเล็ก เชือก ปะการัง หินโสโครก หรืออาจจะลอยตามผิวน้ำ สาหร่าย *Gracilaria* บางชนิดอาศัยอยู่บริเวณป่าชายเลน มักพบเกาะกับรากไม้ หรืออาจมีบางส่วนจมอยู่ในโคลน สาหร่ายทะเลที่อยู่บริเวณน้ำขึ้น-น้ำลงจะต้องทนต่อสภาพแห้งและอุณหภูมิสูงได้ในช่วงที่น้ำทะเลลง และสาหร่ายที่อยู่ในน้ำลึก เช่น *Gracilaria cylindrica* สามารถอยู่ในน้ำลึกได้ถึง 110 เมตร จะต้องสามารถสังเคราะห์แสงได้ดีในสภาพที่มีแสงน้อย (Taylor. 1979)

สำหรับในประเทศไทย สภาพนิเวศน์ของสาหร่ายสกุล *Gracilaria* มักพบได้ที่บริเวณน้ำตื้น หรือชายหาดที่มีลมพัดไม่แรงมากนัก หรือยึดเกาะกับก้อนกรวด หิน หรือเปลือกหอย นอกจากนี้ยังพบได้ตามป่าชายเลนโดยจะอยู่บริเวณน้ำตื้นความลึกไม่เกิน 1 ถึง 2 เมตร สำหรับการแพร่กระจายตัวของสาหร่าย *Gracilaria* มักพบตามชายฝั่งอ่าวไทย และฝั่งมหาสมุทรอินเดีย เช่น ตราด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ประจวบ-คีรีขันธ์ ชุมพร สงขลา สุราษฎร์ธานี ระนอง ปัตตานี และนราธิวาส

2.2 ปัจจัยของสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของสาหร่าย

ปัจจัยของสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของสาหร่าย ได้แก่ อุณหภูมิ ความเค็ม และปริมาณธาตุอาหาร เป็นต้น

อุณหภูมิ

สาหร่ายทะเลสามารถเจริญได้ในที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมตามแต่ละชนิดของสาหร่าย ในเขต subtropical โดยเฉพาะบริเวณชายฝั่งที่มีน้ำขึ้น-น้ำลง จะมีสาหร่ายอยู่จำนวนน้อยในฤดูร้อน เนื่องจากอุณหภูมิโดยเฉลี่ยสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสาหร่ายโดยส่วนใหญ่มักจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส แต่ถ้าเลี้ยงสาหร่ายในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส สาหร่ายจะเจริญเติบโตได้น้อย เพราะสาหร่ายจะมีการพักตัวเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิต่ำ (Lapointe and others. 1984)

Lapointe และคณะ ได้อธิบายว่า การที่อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ควบคุมความสามารถในการดูดซับไนโตรเจนและสะสมในรูปของสารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆ เช่น รงควัตถุและโปรตีน เป็นต้น แต่ที่อุณหภูมิต่ำความสามารถในการดูดซับไนโตรเจนต่ำลง สารประกอบไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ จะถูกเก็บสะสมไว้ในเซลล์ (Lapointe and others. 1984)

นอกจากนี้อุณหภูมิมีผลต่อคุณภาพของวุ้น โดยจากการเก็บตัวอย่างสาหร่าย *Gracilaria verrucosa* HBOI Strain G-16 จากธรรมชาติ ในแต่ละช่วงของฤดูกาล เป็นเวลา 4 ปี นำมาสกัดวุ้นและวัดความแข็งของวุ้น พบว่าสาหร่ายที่เก็บในช่วงของฤดูร้อนจะมีค่าความแข็งของวุ้นประมาณ 700 ถึง 1,000 กรัมต่อตารางเซนติเมตร แต่ถ้าเก็บในช่วงของฤดูหนาวพบวุ้นค่าความแข็งของวุ้นที่ได้จากการสกัดจะมีค่าประมาณ 400 ถึง 500 กรัมต่อตารางเซนติเมตร แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละช่วงของฤดูกาลจะมีผลต่อคุณภาพของวุ้น (Bird and others. 1989)

ความเค็ม

จากการศึกษาสาหร่ายให้วุ้นจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย ระยะเวลากว่า 1 ปี พบว่าสาหร่ายมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกัน โดยสาหร่ายจะมีปริมาณ

น้อยมากในช่วงฤดูฝน แต่จะมีปริมาณมากขึ้นในช่วงฤดูหนาวและฤดูร้อน จึงเป็นที่คาดกันว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของสาหร่าย และสิ่งหนึ่งที่คาดว่าจะมีผลต่อสภาวะแวดล้อมนั้นน่าจะมาจากความเค็มของน้ำทะเล (ประมุข เพ็ญสุต. 2525) จากการศึกษาถึงผลของความเค็มของน้ำทะเลต่อการเจริญของสาหร่ายสกุล *Gracilaria* พบว่าสาหร่ายส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในน้ำทะเลที่มีความเค็มอยู่ในช่วง 15 ถึง 60 ส่วนในพันส่วน (ppt) อย่างไรก็ตาม ช่วงของความเค็มที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของสาหร่ายจะอยู่ในช่วง 15 ถึง 38 ส่วนในพันส่วน (Bird and McLachlan. 1986)

ปริมาณธาตุอาหาร

ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และคุณภาพของสาหร่ายมีหลายชนิด ได้แก่ C, H, O, N, P, K, Ca, Mg เป็นต้น โดยธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของสาหร่ายคือ ธาตุไนโตรเจนและฟอสฟอรัส ในน้ำทะเลธาตุไนโตรเจนจะอยู่ในรูปของสารประกอบในเตรท ไนไตรท์ และแอมโมเนีย ส่วนธาตุฟอสฟอรัสจะอยู่ในรูปของสารประกอบฟอสเฟต เช่น HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} และ H_2PO_4^- ปริมาณสารอาหารในน้ำทะเลจะมีผลต่อการเจริญเติบโต การควบคุมทางชีวเคมี การสืบพันธุ์ การพัฒนารูปร่าง และการกระจายของสาหร่ายทะเล (สนม วันเพ็ญ. 2530)

จากการศึกษาปัจจัยของสภาวะแวดล้อม นอกจากจะมีผลต่อการเจริญเติบโต และคุณภาพของสาหร่ายแล้ว ยังมีผลต่อปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายที่มีอยู่ในธรรมชาติซึ่งจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด รูปร่างของสาหร่าย และฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลง (Prasad. 1986)

จากการศึกษาปริมาณวัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตของสาหร่าย *Gracilaria blodgettii* จากจังหวัดสงขลา และสาหร่าย *Gracilaria confervoides* พบว่าสาหร่าย *G. blodgettii* มีปริมาณวันร้อยละ 19.21 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 60.34 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 10.80 ค่อน้ำหนักแห้งของสาหร่าย ส่วนสาหร่าย *G. confervoides* มีปริมาณวันร้อยละ 35.16 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 69.03 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 7.37 (วลัย วราโห. 2525)

2.3 วงชีวิตของสาหร่ายสกุล Gracilaria

วงชีวิต (life cycle) ของสาหร่ายสกุล Gracilaria ประกอบด้วย 3 ระยะ ได้แก่

1. ระยะแกมีโตไฟท์ (gametophyte phase)
2. ระยะคาร์โปสปอร์โรไฟต์ (carposporophyte phase)
3. ระยะเททระสปอร์โรไฟต์ (tetrasporophyte phase)

การสืบพันธุ์ของสาหร่ายสกุลนี้ มีทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual) แบบไม่อาศัยเพศเป็นการสร้าง tetraspore บนทลลัส (thallus) ส่วนแบบอาศัยเพศ จะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

1. ระยะแกมีโตไฟท์ โดยที่ gametophyte เพศผู้จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เรียกว่า สเปิร์มาเทียม (spermatium) ขึ้นภายในแอนเทอริเดียลพิท (antheridial pits) ส่วนแกมีโตไฟท์เพศเมียจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เรียกว่า คาร์โปโกเนียม (carpogonium) อยู่บนคาร์โปโกเนียลฟิลาเมนต์ (carpogonial filament) ในช่วงของการผสมพันธุ์ สเปิร์มาเทียมจะหลุดลอยตามน้ำมาผสมกับคาร์โปโกเนียมบนทลลัสเพศเมีย เกิดเป็นไซโกต (zygote)

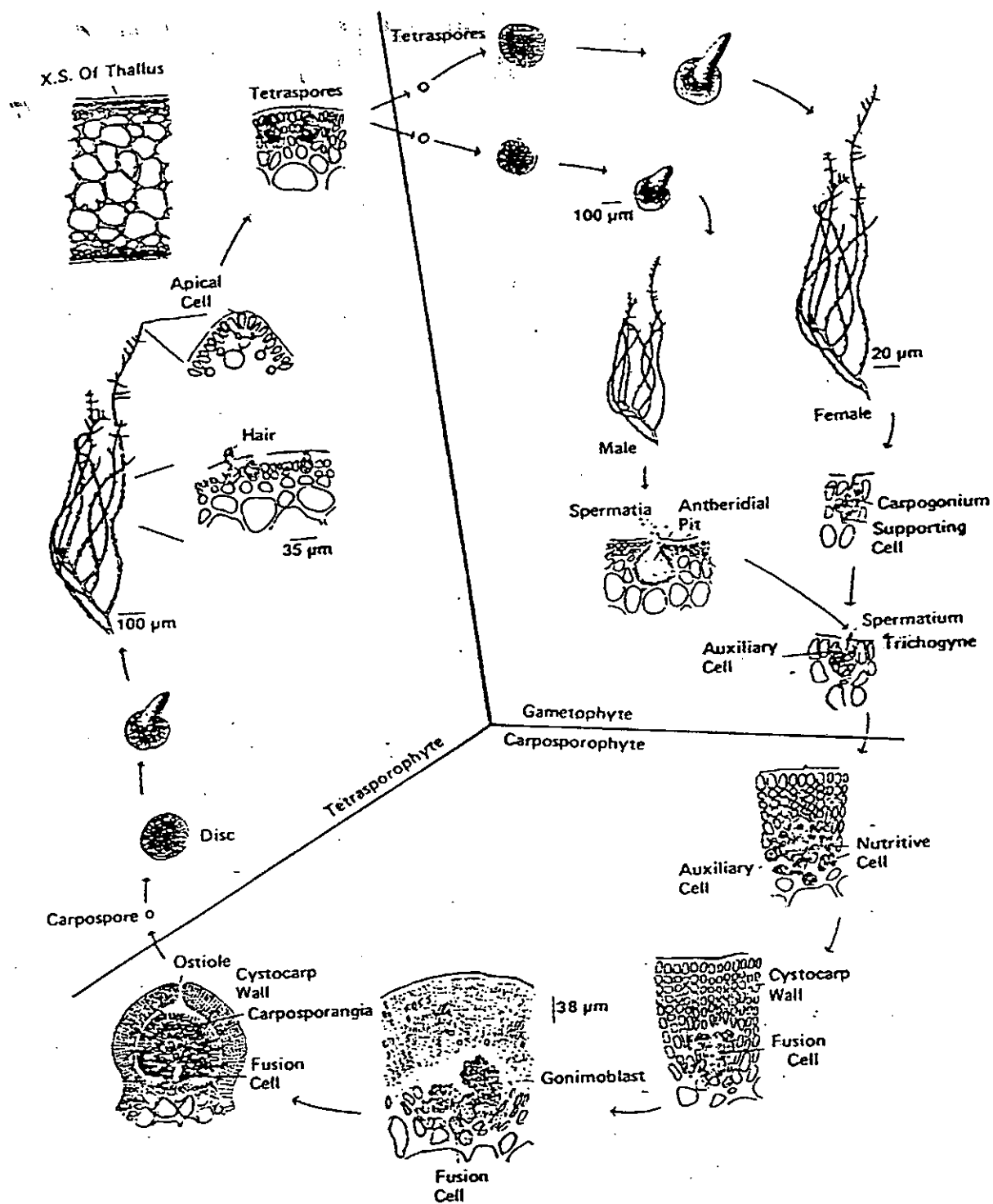
2. ระยะคาร์โปสปอร์โรไฟต์ หลังจากนั้น zygote เริ่มแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) ได้คาร์โปสปอร์ ซึ่งอยู่ในคาร์โปสปอร์เรนเจีย (carposporangia) และมีเซลล์ป้องกันอยู่รอบ ๆ เรียกว่า เพริคาร์พ (pericarp) เจริญอยู่บนทลลัสเพศเมีย เมื่อทลลัสคาร์โปสปอร์โรไฟต์เจริญเต็มที่จะมีลักษณะเป็นตุ่มกลม ๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร อยู่ตามผิวทลลัสเรียกว่า ซิสโตคาร์พ (cystocarp) คาร์โปสปอร์ที่แก่จะหลุดออกจากซิสโตคาร์พตรงช่องที่เรียกว่าออสติโอล (ostiole)

3. ระยะเททระสปอร์โรไฟต์ เมื่อคาร์โปสปอร์หลุดออกไป ก็จะเจริญไปเป็นทลลัสใหม่ มีรูปร่างลักษณะคล้ายกับทลลัสแกมีโตไฟท์และมีขนาดใกล้เคียงกับทลลัสแกมีโตไฟท์เพศเมีย เมื่อทลลัสเททระสปอร์โรไฟต์โตเต็มที่ จะสร้างเททระสปอร์ขึ้นภายในเททระสปอร์เรนเจียม (tetrasporangium) โดยมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) ได้เททระสปอร์ที่มีโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ (haploid) ซึ่งออกเป็นทลลัส

แกมีโตไฟท์เพศผู้และเพศเมียอย่างละเท่า ๆ กัน และจากนี้จึงเข้าสู่ระยะที่ 1 อีกครั้ง (Lee. 1980, Santelices and Doty. 1989) (ภาพประกอบ 2)

2.4 รงควัตถุที่พบในสาหร่าย

รงควัตถุ (pigment) ของสาหร่ายสกุล *Gracilaria* ประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอ และดี (chlorophyll A and chlorophyll D) คาโรทีนอยด์ (carotenoids) ได้แก่ แอลฟา-คาโรทีน (alpha-carotene) และ เบตา-คาโรทีน (beta-carotene) แซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ได้แก่ ทาราแซนทีน (taraxanthin) ซีแซนทีน (zeaxanthin) และ ลูทีน (lutein) ไฟโคบิลิน (phycobilins) ได้แก่ ไฟโคไซยานิน (phycocyanin) มีสีน้ำเงิน ไฟโคอีริทริน (phycoerythrin) มีสีส้มแดง และแอลโลไฟโคไซยานิน (allophycocyanin) มีสีน้ำเงินเมื่อสารไฟโคบิลินรวมตัวกับโปรตีนอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน เรียกว่า บิลิโปรตีน (biliprotein) (Bogorad. 1962)



ภาพประกอบ 2 วงจรชีวิตของสาหร่าย *Gracilaria* sp. (Lee, 1980)

2.5 วุ้น

วุ้นเป็นสารประกอบประเภทโพลีแซคคาไรด์ ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีแดง โดยเฉพาะสกุล *Gracilaria* และ *Gelidium* โครงสร้างของวุ้นนั้นประกอบด้วยน้ำตาล D-galactose ต่อสลับกับ L-galactose ซึ่งบางโมเลกุลของ L-galactose จะมีหมู่ซัลเฟตเกาะอยู่ด้วย องค์ประกอบของวุ้นจึงประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์สองชนิด ได้แก่ อากาโรส และอากาโรเพคติน (agarpectin)

ความสำคัญของวุ้นในด้านต่าง ๆ

เนื่องจากวุ้นเป็นสารที่มีความสามารถในการเกิดเป็นเจลที่คงรูปได้ ดังนั้นวุ้นจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย เช่น ใช้ในการบริโภคน้ำ ใช้ในอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ ใช้ผสมในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น แยม และเยลลี่ รวมทั้งในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา เป็นต้น (Meer. 1980)

อาหาร คุณสมบัติที่สำคัญของวุ้นคือ การอยู่ในรูปของเจลได้ในความเข้มข้นต่ำ และมีความสามารถในการเกิดเจลได้กับน้ำได้โดยตรงโดยไม่ต้องเติมสารอื่นลงไปเพื่อช่วยให้เกิดเจล นอกจากนี้วุ้นเป็นสารไม่มีกลิ่น จึงไม่ก่อให้เกิดปัญหากับอาหารทุกชนิด วุ้นจึงถูกนำมาใช้เป็น emulsifier และ stabilizer โดยใช้ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 0.2 ถึง 0.5 และสามารถใช้อวุ้นในรูปของ thickening และ gelling agent สำหรับอาหารประเภทเนื้อต่าง ๆ ในกระป๋อง เช่น เนื้อปลา เนื้อไก่ เนื้อหมู โดยวุ้นจะเป็นตัวช่วยให้เนื้อต่าง ๆ สามารถคงสภาพอยู่ได้ในกระป๋อง ซึ่งความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้อยู่ในช่วงร้อยละ 0.5 ถึง 2.0

ห้องปฏิบัติการทางชีววิทยา ได้มีการใช้อวุ้นผสมกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เพื่อใช้เป็นวัสดุรองรับในการทำอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อสามารถเจริญอยู่บนแผ่นวุ้นได้ นอกจากนี้ยังใช้กับงานทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยวุ้นจะถูกนำมาผสมกับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อุตสาหกรรมทางด้านเวชภัณฑ์ วุ้นถูกนำมาใช้เป็นยาระบาย หรือเป็นส่วนผสมของแคปซูลที่ใช้บรรจุยา หรือใช้เคลือบกับยาเหน็บ หรือใช้เคลือบกับยาเม็ด

3. อากาโรส (AGAROSE) และ อากาโรเพคติน (AGAROPECTIN)

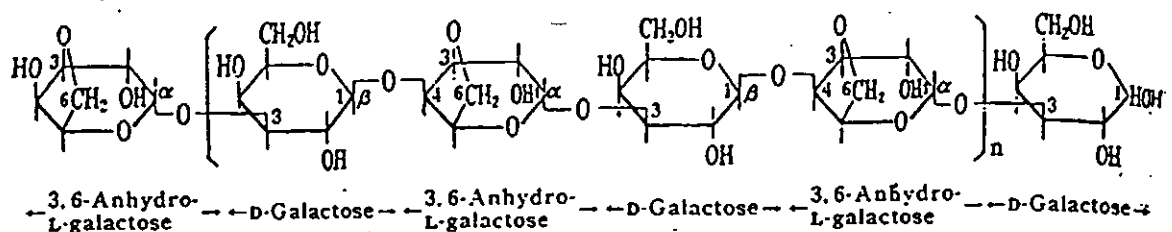
3.1 อากาโรส

อากาโรสเป็นโพลิเมอร์สายยาว ซึ่งโครงสร้างในโมเลกุล จะต่อสลับกัน ด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic linkage) ระหว่างตำแหน่ง $\alpha 1 \rightarrow 3$ และ $\beta 1 \rightarrow 4$ ระหว่างน้ำตาล D-galactose กับ 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose ดังนั้นจึงทำให้อากาโรสมีสถานะเป็นกลางทางไฟฟ้า หรือมีประจุน้อยมาก จึงเรียกอากาโรสอีกอย่างหนึ่งว่า Neutral agarose (ภาพประกอบ 3)

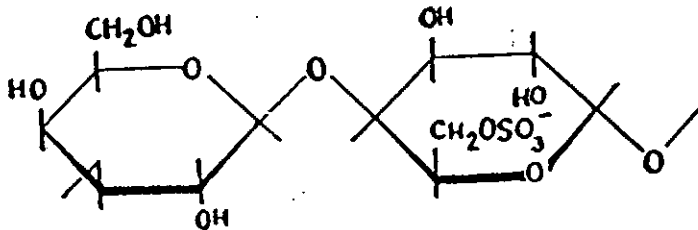
3.2 อากาโรเพคติน

อากาโรเพคตินเป็นโพลิแซคคาไรด์อีกชนิดหนึ่งซึ่งเชื่อว่ามีโครงสร้างคล้ายกับอากาโรส ยกเว้นบางโมเลกุลของน้ำตาล D-galactose ถูกแทนที่ด้วย D-galactose sulfate หรือด้วย 4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactopyranose จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้อากาโรเพคตินมีประจุลบ ดังนั้นจึงเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า Charged agarose (Yaphe and Duckworth. 1971) (ภาพประกอบ 4)

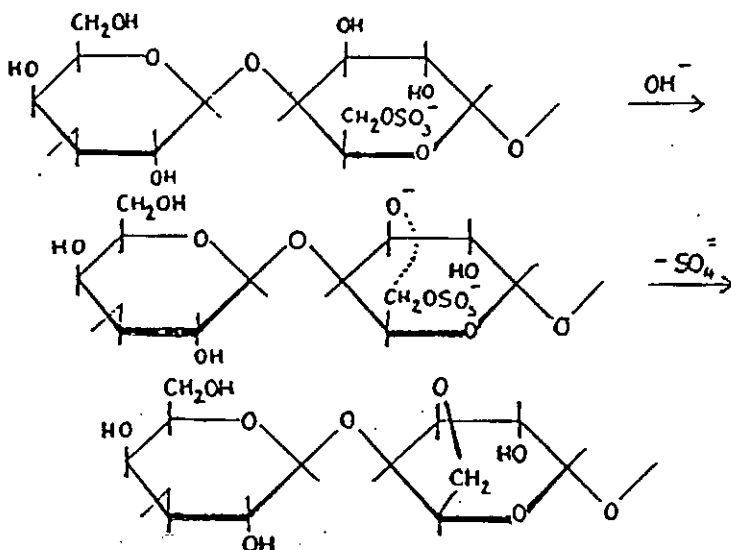
จากผลการศึกษาทางด้านคุณภาพของวุ้น พบว่าวุ้นที่มีส่วนประกอบของอากาโรเพคตินซึ่งมีประจุนี้นักเท่าใด จะทำให้ความแข็งของเจล (gel strength) ต่ำลง ดังนั้นในกระบวนการสกัดวุ้นจึงต้องกำจัดอนุโมลซัลเฟตออก โดยการทำปฏิกิริยากับเบส ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจาก L-galactose 6-sulfate ไปเป็น 3,6-anhydro-L-galactose ซึ่งมีผลทำให้ความแข็งของเจลเพิ่มขึ้น (Yaphe and Ducworth. 1971) (ภาพประกอบ 5) ดังนั้นวุ้นที่มีส่วนประกอบของอากาโรสเป็นส่วนใหญ่จึงเป็นวุ้นที่มีความแข็งของเจลสูง ย่อมเป็นวุ้นที่ดี



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างของอากาโรส



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างของอากาโรเพคติน



ภาพประกอบ 5 ขั้นตอนปฏิกิริยาในการกำจัดซัลเฟตออกจากวุ้นด้วยเบส

3.3 ความสำคัญของอากาโรส

ปัจจุบันอากาโรสมีความสำคัญมากโดยเฉพาะงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ทั้งนี้เพราะคุณสมบัติที่สำคัญของอากาโรส คือมีความสามารถในการเป็นตัวยึดเกาะ (gel matrix) สำหรับการแพร่ และการเคลื่อนที่ของสารโดยอาศัยกระแสไฟฟ้า อีกทั้งอากาโรสเป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุและสามารถอยู่ในสภาพเจลได้ดีทั้งที่มีความเข้มข้นต่ำ จากความสำคัญดังกล่าวจึงได้มีการนำอากาโรสมาใช้งานด้านอิเล็กโตรโฟรีซิส โครมาโทกราฟี (chromatography) อิมมูโนโลยี (immunology) และการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture and cloning) (Guiseley and Renn. 1975)

อิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นเทคนิคอย่างหนึ่งซึ่งใช้สำหรับแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์โดยอาศัยกระแสไฟฟ้า เช่น โปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก การแยกสารนี้อาศัยพื้นฐานจากการแยกโดยประจุ หรือโดยมวล

ปัจจุบันอากาโรสถูกนำไปใช้ในงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะงานวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม ซึ่งในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อวิเคราะห์ ดีเอ็นเอ (DNA) หรือยีน (gene) จากแบคทีเรีย หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่กำลังศึกษาอยู่ จะใช้อากาโรสเป็นตัวกลางค้ำจุณ นอกจากนี้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงเป็นอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ต้องอาศัยตัวกลางค้ำจุณคืออากาโรสที่มีคุณสมบัติเฉพาะ และจากการแยกสารด้วยเทคนิคนี้เป็นการแยกโดยอาศัยความแตกต่างของ จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point, pI) ของโปรตีน ดังนั้นจึงไม่มีผลของ molecular sieving เข้ามาเกี่ยวข้อง

โครมาโตกราฟี เป็นการแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์ โดยสารที่ทำการแยกจะนำผ่านคอลัมน์ ซึ่งบรรจุตัวค้ำจุณที่มีลักษณะเป็นเม็ดทรงกลม และมีรูพรุน เพื่อให้สารที่จะแยกออกจากคอลัมน์ได้ เมื่อใช้สารละลาย (eluent) เป็นตัวชะสาร สารจะแยกตามน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน เทคนิคนี้เรียกว่า เทคนิคเจล ฟิลเทรชัน (gel filtration) ตัวค้ำจุณที่นิยมใช้สำหรับเทคนิคนี้คืออากาโรส ซึ่งจะใช้ในรูปของเม็ดกลม เรียกว่า agarose bead สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ารูพรุนจะไม่สามารถลอดผ่านได้ จึงออกมาจากคอลัมน์เร็วกว่า ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะออกมาจากคอลัมน์ช้ากว่า เพราะสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของตัวกลางค้ำจุณก่อน เทคนิคนี้กล่าวได้ว่าสามารถใช้เป็นวิธีหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสารได้ โดยที่สารไม่มีการเสียสภาพธรรมชาติใด ๆ ทั้งสิ้น ถ้านำเอา agarose bead ไปติดกับสารบางอย่าง เช่น เอนไซม์ สับแตรท แอนติเจน หรือแอนติบอดี ก่อนแล้วบรรจุลงคอลัมน์ จะทำให้สามารถแยกสารที่มีความจำเพาะได้ เพราะสารที่ต้องการแยกจะมีการจับอย่างจำเพาะเจาะจง เรียกวิธีการแยกสารแบบนี้ว่า Affinity chromatography

อิมมูโนโบลอตติง เป็นเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เกิดเป็นเส้นตะกอน (immunoprecipitin line) ของแอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพล็กซ์ โดยอากาโรสที่ใช้เป็นตัวยึดเกาะ จะมีความเป็นกลาง และมีรูพรุน

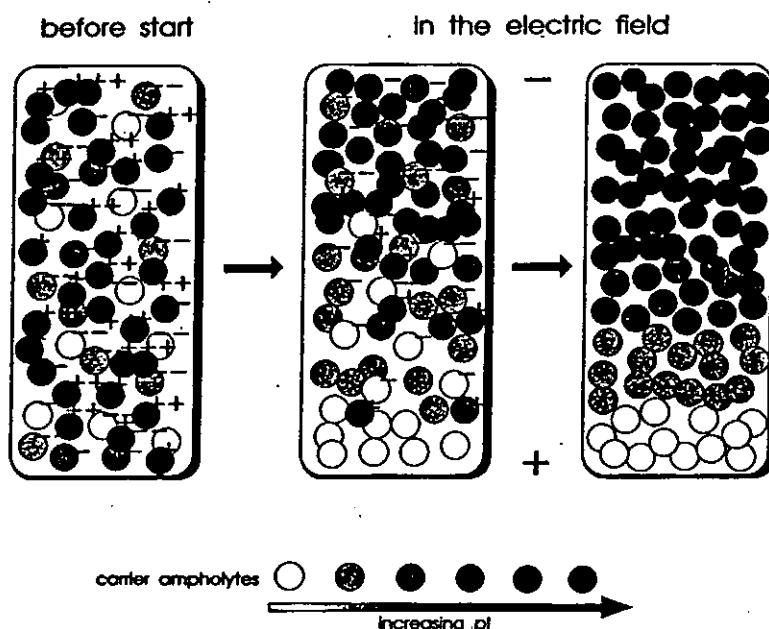
พอที่จะไม่ยับยั้งการแพร่ของแอนติเจน หรือแอนติบอดี และยังมีความใสทำให้เห็นเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นได้ชัดเจน

การเพาะเลี้ยงเซลล์ วัณได้ถูกนำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาเป็นเวลานานแล้ว อย่างไรก็ตามได้มีการพบว่าวัณอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้การเจริญช้าลงหรืออาจไม่เจริญ ดังนั้นจึงได้มีการนำอากาศโรสมาใช้เป็นสารยึดเกาะสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จำเป็นอย่างยิ่งในการหาสารที่จะนำมาใช้เป็นสารยึดเกาะ หรือเป็นวัสดุรองรับสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ของพืช ซึ่งจะต้องเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนต่อไป โดยเฉพาะเทคนิคของการเลี้ยงเซลล์โปรโตพลาส เพราะสารที่จะนำมาใช้เป็นสารยึดเกาะนั้นจะต้องไม่มีผลต่อเซลล์เนื้อเยื่อของพืชที่เพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าอากาศโรสมหาสมต่อการนำมาใช้ในงานด้านนี้ เพราะอากาศโรสเป็นสารที่มีความบริสุทธิ์ อีกทั้งไม่มีผลต่อเนื้อเยื่อทุกชนิดที่ได้นำมาเลี้ยงบนอากาศโรส

4. ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง จัดเป็นอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกชนิดหนึ่งที่ใช้แยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนแต่ละชนิด ในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง จะมีการเติมสารแอมโฟไลต์(ampholyte ในช่วง pH ต่าง ๆ ลงไปด้วย เมื่อให้สนามไฟฟ้าแก่เจลแล้วแอมโฟไลต์จะจัดเรียงตัวแบบ pH gradient (ภาพประกอบ 6) โดยสารแอมโฟไลต์ที่มีความเป็นกรด (acid carrier ampholyte) จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก ในขณะที่สารแอมโฟไลต์ที่มีความเป็นด่าง (basic carrier ampholyte) จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ หลังจากทีสารแอมโฟไลต์ได้มีการจัดเรียงอยู่ในรูปของ pH gradient อย่างสมบูรณ์แล้ว จะเกิดการเคลื่อนที่ของโปรตีนไปยังตำแหน่ง pH ที่ตรงกับค่า pI ของตัวเอง ซึ่ง ณ ตำแหน่ง pH ที่ตรงกับค่า pI ของโปรตีนจะมีผลทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ และที่จุดนี้โปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่ทำให้เกิดตะกอนของโปรตีน โดยตะกอนนี้จะมีลักษณะเป็นแถบตามตำแหน่ง pH ที่ตรงกับค่าของ pI ดังนั้นการแยกโปรตีนที่อาศัยเทคนิคทางไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงชนิดนี้

จะไม่มีผลของขนาดโมเลกุล หรือ molecular sieving เข้ามาเกี่ยวข้องในระหว่างการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าผ่านตัวกลางค้ำจุน (Andrew. 1986)



ภาพประกอบ 6 แสดงการจัดเรียงตัวของแอมโฟไลต์ภายใต้สนามไฟฟ้า

(Westermeyer. 1993)

4.1 แอมโฟไลต์

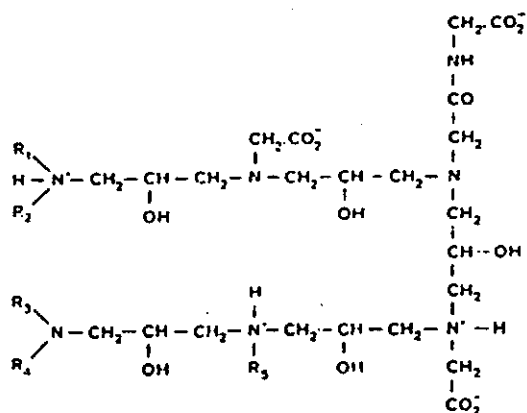
แอมโฟไลต์เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่มีช่วงกว้างของจุดไอโซอิเล็กทริก ประกอบด้วยสารผสมของพอลิเมอร์ของหมู่อะมิโนและพอลิเมอร์ของหมู่คาร์บอกซิลิก (ภาพประกอบ 7) แอมโฟไลต์ที่สังเคราะห์เพื่อการจำแนกมีช่วงของ pH ให้เลือกตาม ความต้องการของผู้ใช้ว่าต้องการใช้ในช่วงใด (Boyer. 1993) เช่น pH 3-10, pH 4-7 pH 5-8, และ pH 6-9 เป็นต้น

คุณสมบัติของแอมโฟไลต์ที่จะนำมาใช้ ควรมีดังนี้ (Westermeyer. 1993)

1. ควรมี buffering capacity และการละลายที่ดี เพื่อให้สามารถกำหนดค่า pH ได้
2. ต้องมีการนำไฟฟ้าที่ดีและสม่ำเสมอ

3. ปราศจากการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุล

4. ควรมีน้ำหนักโมเลกุลน้อย



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของสารแอมโฟไลต์ (Pharmacia. 1982)

4.2 ชนิดของไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

4.2.1 คอลัมน์ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

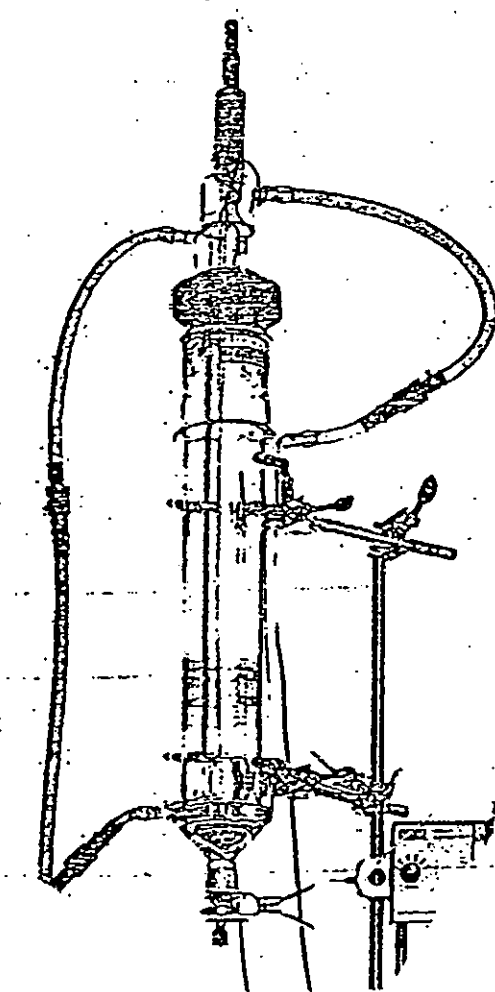
ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงชนิดนี้เหมาะสำหรับการแยกโปรตีนในปริมาณมาก ประกอบด้วยคอลัมน์แก้วที่บรรจุแอมโฟไลต์ที่ต้องการไว้โดยมีกลีเซอรอลหรือซูโครสเป็นตัวรักษาเกรเดียนต์ โดยจัดให้กลีเซอรอลหรือซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงไว้ที่ด้านล่างของคอลัมน์ และที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดอยู่ทางด้านบนของคอลัมน์ ตัวกลางที่มีความหนืดนี้จะช่วยรักษา pH gradient และชั้นของโปรตีนที่แยกไว้ให้อยู่ในระดับเดิมเมื่อหยุดจ่ายกระแสไฟฟ้า การเก็บโปรตีนแต่ละแถบสามารถทำได้โดยการเปิดคอลัมน์ด้านล่างเพื่อเก็บสารเป็นส่วน ๆ เมื่อนำไปวัดหาค่า pH ก็จะทำให้ทราบค่า pI ของโปรตีนในชั้นต่าง ๆ ได้ กระบวนการนี้ต้องใช้ความต่างศักย์ที่สูงและมีความร้อนเกิดขึ้น ดังนั้นจึงต้องหล่อด้วยน้ำเย็นด้านนอกของคอลัมน์ตลอดเวลา (ภาพประกอบ 8)

4.2.2 ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงโดยใช้เจลเป็นตัวกลาง

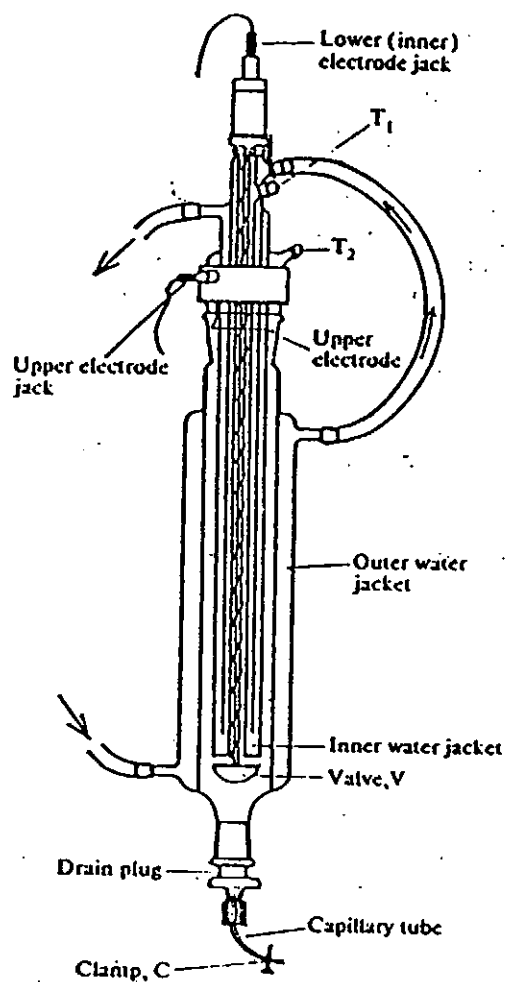
โดยทั่วไปเจลที่ใช้ได้แก่โพลีอะคริลลาไมด์ และอะกาโรส ในการเตรียมเจลนั้นจะต้องใส่แอมโฟไลต์ลงไปพร้อมกัน เมื่อแกะแผ่นเจลและวางลงในถาดจะต้อง

ทำการจ่ายกระแสไฟฟ้าเสียก่อนเพื่อให้เกิด pH gradient ขึ้น แล้วจึงใส่สารตัวอย่างที่ต้องการแยกลงบนเจล ในการใส่อาจทำได้โดยการหยดเป็นแนวยาวบนเจล หรือหยดลงบนกระดาษกรองชิ้นเล็ก ๆ ที่วางไว้บนเจล ในการหาค่า pH บนเจลนั้นอาจจะทำได้โดยใช้อิเล็กโตรดของเครื่องวัด pH และที่ผิวเจลหรือโดยการใช้ Protein marker เป็นตัวทำเครื่องหมาย (Internal standardization) (ธนิต พิวนิม. 2528)

(ภาพประกอบ 9)

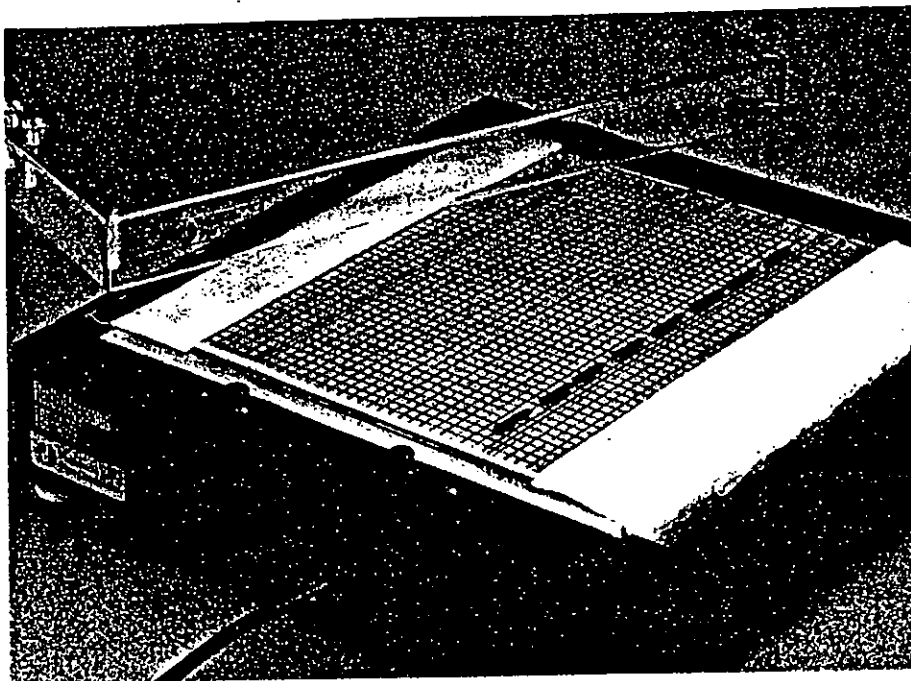


(ก)



(ข)

ภาพประกอบ 8 (ก) ภาพแสดงคอลัมน์ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (ข) ภาพแสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของคอลัมน์ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Andrew. 1986)



ภาพประกอบ 9 ตัวอย่างของไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงโดยใช้เจล (Pharmacia. 1982)

4.3 ตัวกลางค้ำจุน (supporting medium)

ตัวกลางค้ำจุนที่นิยมใช้ในงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงมีอยู่ 2 ชนิด คือ โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) และอากาโรสเจล (agarose gel)

โพลีอะคริลาไมด์เจล เป็นสารที่มีความเป็นกลางทางไฟฟ้า ทำให้ไม่มีผลกระทบในระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โพลีอะคริลาไมด์สามารถเตรียมได้โดยการให้โมโนเมอร์ของอะคริลาไมด์ต่อกันเป็นโพลีเมอร์ ซึ่งมีบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-methylenebisacrylamide) เป็นตัวเชื่อมในโพลีเมอร์ ในปฏิกิริยานี้จะมี TEMED (N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine) เป็นตัวเริ่ม และมีตัวเร่งปฏิกิริยาคือ แอมโมเนียมเพอซัลเฟต รูพรุนของเจล (porous) ขึ้นอยู่กับสัดส่วนระหว่างโมโนเมอร์กับสารที่เป็นตัวเชื่อม (cross linking agent) (Finlayson. 1971, Pharmacia. 1982)

อากาโรสเจล อากาโรสเจลสำหรับงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงได้มีการจำหน่ายในปี 1975 เมื่อได้ค้นพบถึงความเป็นไปได้ในการกำจัดประจุหรือกำจัดหมู่อากาโรเพคตินออกจากอากาโรส ทำให้อากาโรสเป็นสารที่มีความเป็นกลางทางไฟฟ้า และเป็นตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมสำหรับงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เพราะผลจากความบริสุทธิ์มากของอากาโรส และการปราศจากผลของ

อิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสนอกจากนี้สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ตั้งแต่ 500 กิโลดาลตันขึ้นไปสามารถที่จะแยกได้บนแผ่นอากาโรสเจล เนื่องจากขนาดรูพรุนของอากาโรสใหญ่กว่าโพลีอะคริลาไมด์เจล (Westermeier, 1993) ถ้าเปรียบเทียบตัวกลางทั้งสองชนิด ได้แก่อากาโรสและโพลีอะคริลาไมด์แล้วจะพบว่าอากาโรสมิชอบดีหรือชอบได้เปรียบดังต่อไปนี้

1. อากาโรสเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ ในขณะที่อะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์เป็นสารที่เป็นพิษ
2. ในการเตรียมอากาโรสเจลจะไม่มีการเติมสาร catalyst เพื่อช่วยในการเป็นเจล แต่โพลีอะคริลาไมด์เจลจะมีปฏิกิริยา radicals เกิดขึ้นเนื่องจากการเติมสาร catalyst เพื่อช่วยในการเป็นเจล
3. ในการเตรียมเจลนั้นมีความสะดวกและไม่ยุ่งยาก
4. สามารถที่จะแยกสารโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ได้ เนื่องจากขนาดของรูพรุนมีขนาดใหญ่
5. มีความเหมาะสมต่องานที่มีความจำเพาะ เช่น immunoblotting, crossed electrophoretic techniques, immunofixation, immunoprinting เป็นต้น
6. ในการย้อมสีและล้างสีย้อมออกจากเจลใช้เวลาไม่นาน อีกทั้งมีความง่ายต่อการทำเจลให้แห้งเพื่อที่จะบันทึกและเก็บแบบถาวร (Laas, 1989, Righetti, 1980)

5. การผลิตอากาโรส

จากการศึกษาและวิจัยถึงคุณภาพของวุ้น ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าวุ้นมีส่วนประกอบของอากาโรเพคตินปะปนอยู่ โดยที่อากาโรเพคตินนี้มีหมู่ซัลเฟตเกาะอยู่ จะมีผลทำให้วุ้นมีคุณภาพต่ำลง ดังนั้นกรรมวิธีในการผลิตอากาโรส จึงต้องกำจัดเอาหมู่ซัลเฟตออกให้มากที่สุด เพราะฉะนั้นการลดปริมาณของอากาโรเพคตินลงจึงเป็นการเพิ่มอากาโรสได้มากขึ้น และทำให้วุ้นที่มีคุณภาพดี และมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จากหลักการดังกล่าวจึงได้มีผู้ที่คิดค้นวิธีการต่าง ๆ เพื่อลดปริมาณอากาโรเพคตินลง เพื่อผลิตอากาโรส ดังนั้นวิธีการเหล่านี้จึงพอสรุปได้ดังนี้

1. วิธี Acetylation เสนอโดย Araki (1937) วิธีนี้ใช้หลักการของความแตกต่างในการละลายในคลอโรฟอร์ม ของอนุพันธ์ acetate ของอากาโรสและอากาโรเพคตินในการแยก

2. วิธี Quaternary ammonium precipitation เสนอโดย Hjerten (1962) โดยให้อากาโรเพคตินทำปฏิกิริยากับ quaternary ammonium salt ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายแล้วแยกออกมาได้

3. วิธีใช้โพลีเอริลลินไกลคอล เสนอโดย Russell and others. (1964) อาศัยหลักการลดการละลายของอากาโรสจาก สารละลายที่มีโพลีเอริลลินไกลคอลเป็นตัวถูกละลาย

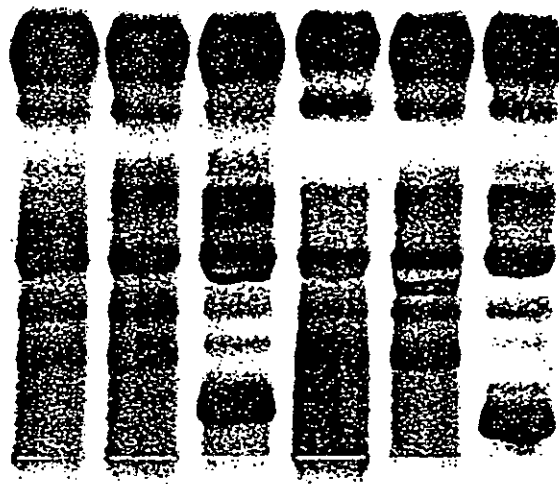
4. วิธี Ion exchange โดยการใช้ ion exchanger เช่น DEAE cellulose เป็นตัวจับอากาโรเพคตินออกจากสารละลายอื่น ส่วนอากาโรสจะคงอยู่ในสารละลาย

ในศตวรรษที่ 17 การสกัดวุ้นในเชิงพาณิชย์ได้เริ่มขึ้นในประเทศญี่ปุ่นเป็นประเทศแรก ต่อมาในกลางศตวรรษที่ 19 ประเทศจีนเป็นประเทศที่เริ่มผลิตวุ้น แล้วจึงเริ่มกระจายเข้าสู่ประเทศในแถบยุโรป และอเมริกา (Percical and Mc Dowell. 1967) จากนั้นได้มีการเริ่มต้นศึกษาทางด้านองค์ประกอบทางเคมีของวุ้น และในปี 1938 ซึ่งเป็นปีแรกที่ค้นพบองค์ประกอบของวุ้นว่าประกอบด้วย 3,6-anhydro-L-galactose (Guisseley and Renn. 1975) จากจุดเริ่มต้นการศึกษาโครงสร้างของวุ้นจึงทำให้มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเตรียมอากาโรสโดยการสกัดจากวุ้นและได้มีการศึกษาหาวิธีการผลิตอากาโรสในระยะเวลาต่อมา

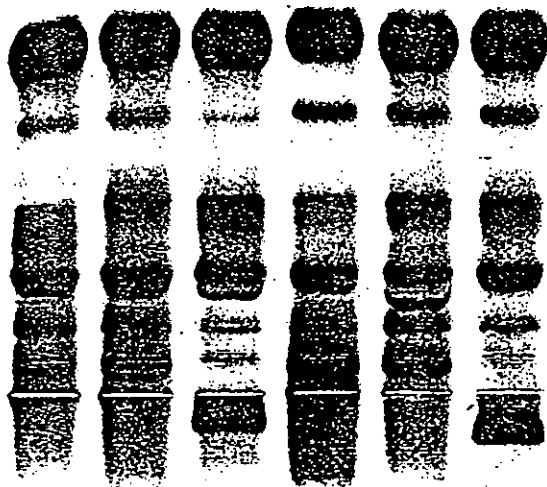
ความสำเร็จในการแยกอากาโรสเป็นครั้งแรกโดย Araki ในปี 1937 เป็นอากาโรสที่แยกได้โดยใช้วิธี acetylation ในคลอโรฟอร์ม ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็น soluble agarose acetate และ insoluble agaropectin acetate จากนั้นทำการ deacetylation ด้วย alcoholic alkali วิธีการนี้ไม่เหมาะสม และไม่สะดวกที่จะใช้ในการผลิตอากาโรสในระดับสเกลขนาดใหญ่ (Araki. 1937) ต่อมาในปี 1962 Hjerten ได้ทำการแยกอากาโรสจากวุ้น Difco bacto agar ด้วยการตกตะกอนอากาโรเพคตินด้วย cetylpyridinium chloride และตะกอนอากาโรเพคตินถูกกำจัดออกด้วยการปั่น (centrifuge)

และนำสารละลายอากาศที่ได้นี้นำมาตกตะกอนในแอลกอฮอล์ ข้อเสียของวิธีนี้คือ การขาดความสะดวกในการทำและการปั่นและการล้างเอา cetylpyridinium chloride ออก อีกทั้ง cetylpyridinium chloride มีราคาแพง (Hjerten. 1962) ต่อมา Russell และคณะได้ทำการแยกอากาศจากวุ้น Ionagar No. 2 วิธีการนี้อาศัยความสามารถในการละลายที่แตกต่างกันระหว่างอากาศและอากาศโรเพคตินในโพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) แต่วิธีการนี้มีข้อเสียคือได้ผลผลิตน้อย (Russell and others. 1964) จากนั้นปี 1969 Zabin ได้ทำการแยกอากาศออกจากอากาศโรเพคติน โดยสารตั้งต้นที่ใช้เป็นวุ้น และใช้ DEAE cellulose ผสมลงไปในสารละลายวุ้น เพื่อเป็นตัวจับกับอากาศโรเพคติน จากนั้นนำสารละลายอากาศที่ได้ออกมากรองนี้ไปตกตะกอนในแอลกอฮอล์ และนำตะกอนอากาศไปทำให้แห้ง ซึ่งอากาศที่ได้เท่ากับ 12 กรัม (Zabin. 1969) ปี 1971 Hjerten ได้ทำการแยกอากาศจาก Difco bacto agar โดยการดูดซับอากาศโรเพคตินด้วย DEAE-ion exchanger ซึ่งจำนวนที่ใช้เป็น 0.25 กรัม ของ DEAE-ion exchanger ต่อกรัมของวุ้นที่จะสกัด พบว่าอากาศที่ได้มีค่าของซัลเฟตต่ำมาก (Hjerten. 1971) และในปีเดียวกันนี้ Duckworth และ Yaphe ได้ทำการแยกอากาศจาก Difco bacto agar โดยการตกตะกอนอากาศด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลในขั้นแรก จากนั้นนำอากาศที่ได้นี้ไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephadex A-50 ได้อากาศที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือได้ผลผลิตน้อยมาก ถึงแม้ว่าผลผลิตจะมีปริมาณซัลเฟตต่ำ (Duckworth and Yaphe. 1971) ต่อมา Quast ได้นำอากาศจากหลาย ๆ ยี่ห้อมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ Anion Exchange resin เพื่อที่จะศึกษาถึงความเป็นไปได้ของการลดลงของ electroosmotic flow ซึ่งผลปรากฏว่าตัวอย่างของอากาศทั้ง 12 ตัวอย่างมีการลดลงของ electroosmotic flow แต่ทั้ง 12 ตัวอย่างนี้จะมีค่าของ electroosmotic flow แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของอากาศนั้น ๆ (Quast. 1971) ในปี 1973 Grubb ได้ทำการศึกษาถึงการเตรียม electroendosmosis-free อากาศเจล และได้นำอากาศเจลที่เตรียมได้นี้ไปใช้งานด้านอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยสารตั้งต้นที่ใช้คืออากาศ (A-45, Indubiose) วิธีการนี้เป็นการกำหนด cyanogen bromid คงที่ และเติม (2-aminoethyl)trimethylammonium bromide ความเข้มข้นเท่ากับ 0.15 M เมื่อนำอากาศไปหาค่าอิเล็กโทรเอ็นโดสมิซิส จะได้ค่าที่ใกล้เคียงศูนย์ จากการ

ทดลองนี้พบว่า 2-aminoethyl(trimethyl-ammonium) เป็น covalent bond กับอากาศไรส แต่ปฏิกิริยาจะเกี่ยวข้องกับหมู่อะมิโนของสารที่เติม ในการดัดแปลงทางเคมีของอากาศไรสจากการทดลองนี้ อากาศไรสที่ผลิตได้มีค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสน้อย เมื่อนำไปใช้ในงานทำอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ารูปแบบของการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะแตกต่างจากอากาศไรสที่จำหน่ายในทางการค้า ดังภาพประกอบที่ 10 และ 11

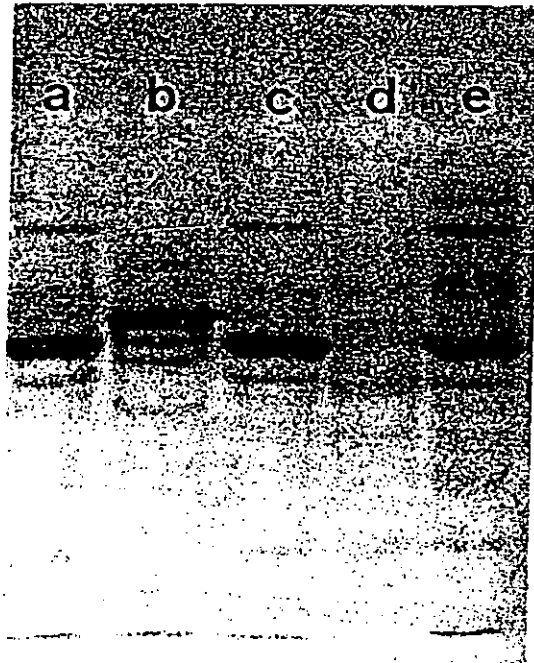


- ภาพประกอบ 10 แสดงแถบของ human plasma ที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ electroendosmosis-free อากาศไรสเจล (Grubb. 1973)



- ภาพประกอบ 11 แสดงแถบของ human plasma ที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อากาศไรสที่ได้จากการจำหน่ายทางการค้า (Grubb. 1973)

แต่อากาโรสที่ได้จากการทดลองนี้ไม่สามารถจะกล่าวได้ว่าเป็น charged-free อากาโรส เนื่องจากอากาโรสนี้ยังคงมีหมู่ที่มีประจุอยู่ ซึ่งจะเป็นสาเหตุทำให้เกิดการ ดูดซับของโปรตีนที่มีความเป็นด่างมากหรือโปรตีนที่มีความเป็นกรดมาก อีกประการ หนึ่งคือ การมี ionizable groups อยู่ในเจลซึ่งทำให้เจลชนิดนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัว กลาง (medium) สำหรับการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Grubb. 1973) ต่อมาในปี 1974 Johansson and Hjerten ได้ทำการเตรียมอากาโรสที่มีความบริสุทธิ์สูง โดยใช้ สารตั้งต้นคืออากาโรสที่จำหน่ายทางการค้า อากาโรสที่เป็นสารตั้งต้นจะถูกนำมาผ่าน ion exchange โครมาโตกราฟี ซึ่งการทำโครมาโตกราฟีนี้จะนำอากาโรสมาผ่านคอลัมน์ 3 ครั้ง ผลการทดลองพบว่า อากาโรสที่ได้จากวิธีการนี้มีค่าอิเล็กโตรเอ็นคอสโมซิส ประมาณ 0.007 และมีปริมาณซัลเฟตน้อยมาก จากนั้นนำอากาโรสที่ได้นี้ไปทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าผลที่ได้ไม่เป็นที่น่าพอใจซึ่งอาจเป็นผลจากอิเล็กโตรเอ็นคอสโมซิส (ภาพประกอบ 12) (Johansson and Hjerten. 1974)



ภาพประกอบ 12 แสดงแถบของ human blood haemolysates ที่ได้จากการทำ

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยใช้ purified agarose ที่ผสมกับ 1% non-crosslinked acrylamide pH ช่วง 6-10 (Johansson and Hjerten. 1974)

ในปี 1981 Cook และคณะ ได้ทำการเตรียมอากาศจากวุ้นที่จำหน่ายทางการค้า โดยเตรียมตามวิธีของ Blethen และคณะ จากนั้นนำมาผ่าน cation exchange resin เมื่อได้อากาศที่ผ่าน resin นี้แล้ว อากาศนี้จะนำไปตกตะกอนใน isopropanol และทำให้แห้ง อากาศที่ผลิตได้นี้มีค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิส ไม่เกิน 0.10 ในขั้นตอนต่อไปจะเป็นการเตรียมสารซึ่งเป็น neutral polymer นั่นคือ locust bean gum โดยการนำกัมนี้มาต้มและนำมากรอง สุดท้ายจึงนำไปตกตะกอนใน isopropanol และทำให้แห้ง เมื่อได้ทั้งอากาศและกัมก็จะนำมาผสมกันโดยใช้ อากาศในปริมาณ 70 ส่วนและกัม ในปริมาณ 30 ส่วน และสารผสมนี้มีความเหมาะสมต่อการใช้งานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

จากที่ได้กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นได้ว่าอากาศที่ผลิตได้จะมีคุณภาพเป็นอย่างไรนั้นจะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่ 2 ประการ ได้แก่

1. ชนิดของสาหร่าย สถานที่ปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยว และระยะเวลาการเจริญเติบโตของสาหร่ายเพื่อให้ได้วุ้นที่มีคุณภาพดี
2. ความบริสุทธิ์ของอากาศที่ผลิตนั้นจะมีมากน้อยเท่าใดขึ้นอยู่กับคุณภาพของวุ้นที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต รวมทั้งกรรมวิธีและขั้นตอนในการผลิต ดังนั้นการควบคุมคุณภาพของอากาศที่ผลิตได้นั้น จำเป็นจะต้องทราบถึงคุณสมบัติของอากาศเสียก่อน

6. คุณสมบัติของอากาศ

1. อิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิส เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากประจุของตัวกลางค้ำจุน เช่นหมู่คาร์บอกซิล หรือหมู่ซัลเฟตที่มีอยู่ในวุ้น เมื่ออยู่ในสถานะที่เป็นเบสหรือเป็นกลาง ประจุลบเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก แต่เนื่องจากหมู่ประจุลบเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างกระดาษหรือวุ้นจึงไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้ แต่จะดูดซับโมเลกุลของน้ำจากบัฟเฟอร์ไว้ที่ผิวหน้าได้ จึงทำให้เกิดไฮโดรเนียมไอออน (H_3O^+) ล้อมรอบประจุลบเมื่อผ่านกระแสไฟฟ้า

ลงไป ไอออนบวกเหล่านี้จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ ในการนี้จะทำให้สารที่เป็นกลางเคลื่อนที่ไปด้วยเนื่องจาก solvent flow ของสารละลายในตัวกลางก้ำจุน

อากาศโรสที่มีการจำหน่ายทางการค้า ได้มีการกำหนดช่วงค่าของอิเล็กโทร-เอ็นคอสโมซิส และเพื่อเป็นการแบ่งเกรดตามคุณภาพของอากาศโรส ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงค่ามาตรฐานของอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสของอากาศโรสเจล ซึ่งจำหน่ายทางการค้า

AGAROSE TYPE	$-m_r$
extremely low EEO	≤ 0.05
low EEO	0.10-0.15
medium EEO	0.16-0.19
high EEO	0.23-0.26
highest EEO	≥ 0.30

2. ความแข็งของเจล (gel strength) หมายถึงแรงที่กดลงบนผิวหน้าเจลที่มีความเข้มข้น 1.5 % และทำให้ผิวหน้าเจลแตก แรงที่กดทับนี้มีหน่วยเป็นกรัมต่อตารางเซนติเมตร โดยทั่วไปสำหรับวันจะมีค่าความแข็งของเจลอยู่ในช่วง 200-400 กรัมต่อตารางเซนติเมตร แต่สำหรับอากาศโรสจะมีค่าความแข็งของเจลอยู่ในช่วง 600-1,000 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ส่วนอากาศโรสเจลที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่าความแข็งมากกว่า 1,000 กรัมต่อตารางเซนติเมตร ขึ้นไป ความแข็งของเจลเป็นสมบัติทางกายภาพที่สำคัญในการประเมินคุณภาพของเจลได้

3. ความชื้น (moisture) ความชื้นของวันผง หมายถึง ปริมาณน้ำในวันผงตัวอย่างที่ได้จากการนำวันผงตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 7 ชั่วโมง และชั่งหาน้ำหนักวันผงที่หายไป

4. ปริมาณซัลเฟต (sulfate content) อากาโรสที่มีคุณภาพดี ควรมีปริมาณซัลเฟตน้อย โดยทั่วไปกำหนดให้ไม่น้อยกว่า 0.3 % เนื่องจากตัวซัลเฟตเป็นอนุพลที่มีประจุ ดังนั้นจึงอาจมีผลต่อการแยกสารที่มีประจุ

5. ความหนืด (viscosity) โดยทั่วไปความหนืดของสารละลายอากาโรสที่บริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 60-90 องศาเซลเซียส มีค่าประมาณ 10-15 centipoise ความแตกต่างของความหนืดจะขึ้นอยู่กับชนิดของวุ้นและพันธุ์ของสาหร่ายที่นำมาสกัดวุ้น

วิธีการผลิตอากาโรสที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนั้น ไม่ว่าจะเป็นวิธีใดก็ตามไม่สามารถที่จะกำจัดประจุลบออกไปให้ได้หมด ถึงแม้ว่าจะมีอยู่น้อยมากจนไม่สามารถวัดได้ก็ตาม ซึ่งอากาโรสที่ได้จากวิธีการเหล่านั้น หากนำมาใช้เป็นสารตัวกลางในงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง จะพบว่ายังไม่มี ความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสารที่มีความเป็นกลางไม่มีประจุใด ๆ หรือโพลีเมอร์บางชนิดเติมลงไป เช่น สารประเภท gum เพื่อช่วยในการเจือจางประจุลบให้น้อยลง ดังเช่นจากการศึกษาของ Cook และคณะที่ได้กล่าวมาในข้างต้น

7. กวักัม (GUAR GUM)

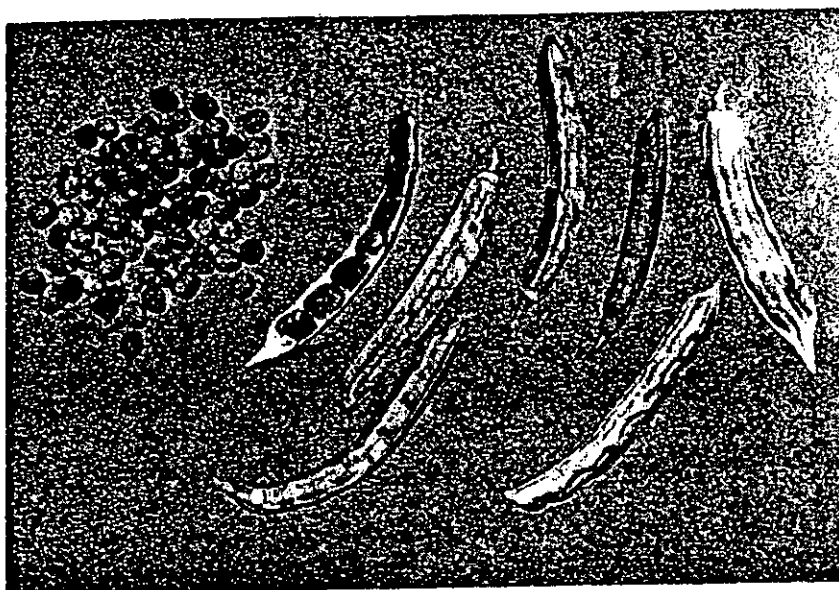
7.1ความเป็นมา

กวักัมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว ซึ่งอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cyamopsis tetragonolobus* ต้นพืชชนิดนี้ในหนึ่งฝักจะมีเมล็ดอยู่ภายในฝักประมาณ 6-9 เมล็ด (ภาพประกอบ 13) ซึ่งแต่ละเมล็ดจะประกอบด้วย hull, germ และ endosperm โดยมีอยู่ประมาณ 15%, 45% และ 40% ตามลำดับ นอกจากนี้กวักัมที่จำหน่ายในทางการค้าในระดับ food grade มีองค์ประกอบต่างๆ อีกดังแสดงในตาราง 3 (Dea and Morrison. 1975, Maier and others. 1993) พืชชนิดนี้เป็นพืชพื้นเมืองทางด้านตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย และปากีสถาน ซึ่งในอดีตนั้นใช้เป็นอาหารสำหรับคน และเป็นอาหารสัตว์ ความสำคัญของกวักัมในการใช้เป็นอาหารเสริมได้เริ่มขึ้นในสมัยช่วงระหว่างสงครามและหลังสงครามโลก

ครั้งที่ 2 เนื่องจาก ได้เกิดการลดลงของ locust bean อย่างมากทำให้เกิดภาวะวิกฤตขาดแคลน ทำให้มีการค้นหาตัวที่มีความเหมาะสมซึ่งสามารถแทน locust bean ได้ (Dea and Morrison. 1975, Imeson. 1992, Maier and others. 1993)

ต่อมา กวักัมเริ่มเข้าสู่อเมริกาเป็นครั้งแรกในต้นปี 1900 แต่มิได้ใช้ในอุตสาหกรรม จนกระทั่งในปี 1943 จำนวนของ locust bean gum ที่ได้จากต้น locust ซึ่งขึ้นรอบ ๆ ทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ได้เกิดการลดลงอย่างเห็นได้ชัด สถาบัน Paper Chemistry ใน Appleton เมือง Wisconsin พบว่ากวักัมมีประสิทธิภาพและสามารถทดแทน locust bean gum ได้ในการใช้เป็นสารเพิ่มความแข็งแรงให้กับกระดาษ ต่อมาบริษัท General Mill Inc. ได้พัฒนาเทคโนโลยีในการบดให้ดีขึ้น ซึ่งทำให้การใช้กวักัมมีความเป็นไปได้ในระดับอุตสาหกรรม ทำให้การใช้กวักัม ในอุตสาหกรรมกระดาษเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการที่มีความต้องการสูงมากทำให้กวักัมมีราคาสูงขึ้นในระหว่างปี 1980-1982 โดยจะมีราคาตั้งแต่ \$0.50 ถึง \$1.50 ต่อน้ำหนักหนึ่งปอนด์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของกวักัมและระดับของขั้นตอนและรูปแบบของการทดแทน (Maier and other. 1993) เกรดของกวักัมมีระดับต่างๆ กันซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของ hull และ germ เพราะจัดได้ว่าเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์ (impurity) กวักัมสามารถละลายได้ในน้ำเย็นและน้ำร้อน อัตราของการละลาย (rate of hydration) ขึ้นอยู่กับขนาด (particle size) อุณหภูมิของน้ำ และอัตราการกวน (rate of agitation) สารกวักัมจะไม่ละลายในตัวทำละลายประเภทสารอินทรีย์ (organic solvent)

ปัจจุบันได้มีการนำกวักัมมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่นทางด้านการแพทย์ ทางเภสัช และทางเครื่องสำอาง โดยกวักัมถูกนำมาผสมในโลชั่น หรือครีม หรือนำมาผสมในการทำยาเม็ด นอกจากนี้นำมาใช้ทางด้านการอาหาร เช่นใช้ในรูปของ thickener, stabilizer ในอาหารประเภทไอศกรีม และอาหารประเภทนม และเนย รวมทั้งเครื่องดื่มประเภทที่ไม่มีแอลกอฮอล์ เช่น น้ำผลไม้ (Leung and Foster. 1996)



ภาพประกอบ 13 แสดงตัวอย่างของเมล็ดและฝักของกัวกัม (Imeson. 1992)

ตาราง 3 องค์ประกอบต่าง ๆ ของกัวกัม (Maier and others. 1993)

composition	amount
Galactomannan	75-85%
Moisture	8-14%
Protein	5-6%
Fiber	2-3%
Ash	0.5-1%

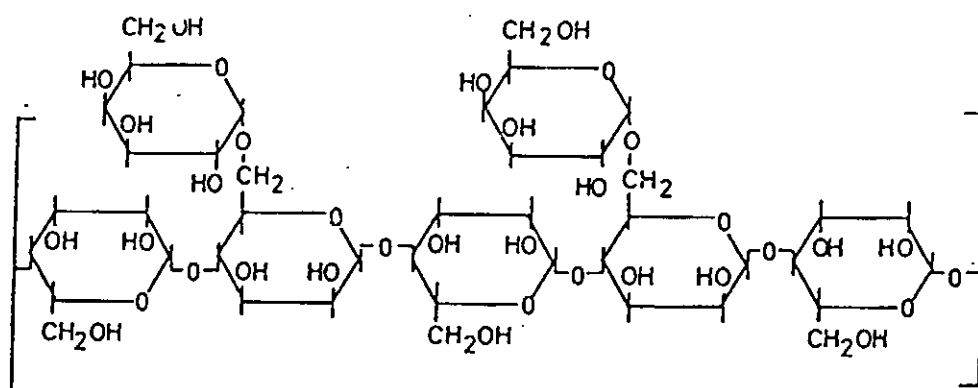
7.2 GALACTOMANNAN

Galactomannan โดยส่วนใหญ่จะพบในส่วนของ endosperm ของเมล็ดจากพืชตระกูลถั่ว เมล็ดมี galactomannan ไว้เพื่อทำหน้าที่ทางสรีรวิทยา สิ่งแรกคือช่วยเก็บรักษาน้ำไว้และยังช่วยป้องกันการแห้งของเมล็ดซึ่งเป็นสาเหตุทำให้โปรตีนเสียสภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสียสภาพของเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการงอกของเมล็ด

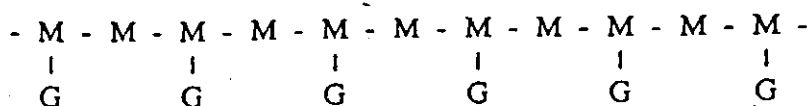
อย่างที่สองคือ galactomannan เปรียบเสมือนเป็นแหล่งสะสมอาหารให้กับเมล็ดที่กำลังงอก

โครงสร้างทางเคมี

Galactomannan หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Guarán เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย โมโนแซคคาไรด์ของน้ำตาล mannose และ galactose โครงสร้างของ mannose จะต่อกันแบบ (1 → 4)-β-D-manopyranosyl-residue และต่อกับ side chain โดยต่อกันแบบ (1 → 6) linked α-D-galactopyranosyl-residues (ภาพประกอบ 14 และ 15) น้ำหนักโมเลกุลของ Guarán ประมาณ 220,000 ดาลตัน (Maier and others. 1993)



ภาพประกอบ 14 แสดงโครงสร้างของกัวกัม



ภาพประกอบ 15 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ polymannan และ galactomannans

๔ ความมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษาเทคนิคและวิธีการในการผลิตและพัฒนาอากาศให้ป็นอากาศที่มีความบริสุทธิ์สูง และมีค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสเข้าใกล้ศูนย์
2. เพื่อศึกษาดังเทคนิคอื่น ๆ ซึ่งจะช่วยในการผลิตอากาศให้มีความเหมาะสมสำหรับงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

๕ ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อใช้เป็นแนวทาง และทราบวิธีการและขั้นตอนในการผลิตอากาศให้มีความบริสุทธิ์สูง
2. ทราบวิธีการในการทำให้อากาศมีความเหมาะสมต่องานทางไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง
3. เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการผลิตอากาศในระดับโรงงานนำร่อง
4. เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศให้มีคุณค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น
5. เป็นแนวทางในการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์เพื่อก่อให้เกิดการพึ่งตนเอง

๖ ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

1. ทำการผลิตอากาศ ให้มีความบริสุทธิ์สูง
2. พัฒนาอากาศเพื่อให้มีความเหมาะสมในการใช้งานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. เครื่องกรองอัดความดัน
2. เครื่องกวนแบบมอเตอร์ (Motor driven stirrer, Janke&Kunkel)
3. เครื่องบดละเอียด (Mortar Grinder, type RMO, Retsch GmbH)
4. เครื่องวัดความแข็งของเจล (Gel Tester, Marine Colloids)
5. บีกเกอร์ (สำหรับวัดความแข็งของเจล) ขนาดความลึก 5 เซนติเมตร, เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร
6. บีกเกอร์ (สำหรับวัดความหนืดของเจล) ขนาดความลึก 11 เซนติเมตร, เส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7 เซนติเมตร
7. อิเล็กโทรโฟรีซิสแชมเบอร์ (Electrophoresis Chamber, GNA-100, Pharmacia)
8. ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงแชมเบอร์ (Mini IEF Cell Chamber model 111, Bio-Rad)
9. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power Supply, LKB Bromma)
10. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power Supply, model 1000/500, Bio-Rad)
11. เครื่องวัดความหนืด (Viscometer, model DV-II, Brookfield)
12. เข็มฉีดยา ขนาด 10 ไมโครลิตร (Microsyringe, Hamilton)

สารเคมี

1. LE agarose (FMC Bioproduct)
2. Isogel / FMC (FMC Bioproduct)
3. Diethylaminoethyl cellulose (DE52, Whatman)

4. guar gum powder (Sigma)
5. ampholyte pH 3-10 และ pH 5-8 (FMC Bioproduct)
6. โปรตีนมาตรฐาน (pI makers, FMC Bioproduct)
7. dextran fixative agent (70% ethanol - 10% acetic acid)
8. albumin staining solution (1% Coomassie blue R250 - 25% methanol - 5% acetic acid)
9. fixative solution (4% sulfosalicylic acid - 12.5% trichloroacetic acid - 30% methanol)
10. protein Staining solution (28% ethanol - 14% acetic acid - 0.2% Coomassie blue R250)
11. destaining solution (25% methanol - 5% acetic acid)
12. sorbitol
13. glycerol
14. isopropanol

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การเตรียมอากาโรสให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (purified agarose)
2. การเตรียมสารกั้วกัม
3. การเตรียมอากาโรสเพื่อใช้ในงานทางไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง
4. การนำอากาโรสไปใช้งานทางไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง
5. การวิเคราะห์คุณภาพของอากาโรส 

1. การเตรียมอากาศให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

การเตรียมอากาศที่มีความบริสุทธิ์มาก เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับเตรียมอากาศที่มีคุณภาพเหมาะแก่การใช้งานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เป็นการเตรียมที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของซาบิน และเจอร์เทน (Zabin. 1969 and Hjerten. 1971) โดยการผสม LE agarose 105 กรัม ในน้ำกลั่น 10.5 ลิตร แช่ในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส คนให้ทั่วจนกระทั่งอากาศโรสละลายหมด จากนั้นเติม DE 52 ลงในสารละลายอากาศโรสในอัตราส่วนอากาศโรส:DE 52 เท่ากับ 1: 3 กวนด้วยเครื่องกวนเป็นเวลาประมาณ 15 นาที จากนั้นนำไปกรองโดยใช้เครื่องกรองอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 20 psi. เติมโซเดียมคลอไรด์ลงในสารละลายอากาศโรสที่ได้จากการกรอง และนำสารละลายอากาศโรสนี้ไปตกตะกอนใน isopropanol แยกเอาส่วนตะกอนของอากาศโรสออกโดยกรองผ่านผ้าขาวบาง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นและตามด้วย isopropanol อีกครั้ง นำตะกอนของอากาศโรสนี้ไปอบแห้งในตู้อบ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่ออากาศโรสแห้งแล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Mortar grinder) จะเรียกอากาศโรสที่ได้จากขั้นนี้ว่า agarose/DE

2. การเตรียมผงแก้ว

แก้วที่ซื้อจากบริษัท Sigma ไม่สามารถจะนำมาใช้ได้ทันที เนื่องจากมีบางส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการแยกเอาส่วนที่สามารถละลายในน้ำได้มาใช้ในงานวิจัย ในการเตรียมสารแก้ว เพื่อใช้ในงานวิจัย ได้ดัดแปลงจากวิธีของคุกและวิท (Cook and Witt. 1981)

ชั่งแก้ว 20 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 20 ลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารช่วยกรอง (filter aid) 10 กรัม กวนให้ทั่ว แล้วนำไปกรองโดยใช้มือกรองอัดความดัน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 20 psi. จะได้สารละลายแก้ว นำสารละลายนี้ไปตกตะกอนใน isopropanol จากนั้นทำการกรองโดยใช้ผ้าขาวบาง นำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่ตู้อบ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Mortar grinder)

3. การเตรียมอากาโรสเพื่อใช้ในงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

นำผง agarose/DE(ที่เตรียมได้จากข้อ 1) และ ผงกัวกัม(ที่เตรียมได้จากข้อ 2) มาผสมรวมกัน ในอัตราส่วนของ อากาโรส ต่อผงกัวกัม เท่ากับ 8:2 7:3 และ 6:4 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) จะเรียกอากาโรสผสมที่เตรียมชุดนี้ว่า agarose 8/2, agarose 7/3, และ agarose 6/4 ตามลำดับ และจะนำไปใช้ในงานอิเล็กโตรโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 และ pH 5-8

4. การนำอากาโรสไปใช้งานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

ขั้นตอนนี้เป็นการนำอากาโรสที่ผสมกับกัวกัมที่ได้เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3 ทั้ง 3 อัตราส่วนและอากาโรสอีก 4 ชนิดได้แก่ HE agarose , LE agarose, agarose/DE และ Isogel/ FMC มาใช้เป็นตัวกลางค้ำจุน (supporting medium) ในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง วิธีการในขั้นตอนนี้ใช้วิธีของ Bio-Rad (Bio-Rad's manual. 1990)

สารละลายอากาโรสที่ใช้ในการเตรียมเจลสำหรับงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ประกอบด้วย 1% อากาโรส , 5% sorbitol , 10% glycerol และ 2% ampholyte ในการเตรียมสารละลายอากาโรสนี้จะเริ่มต้นด้วยการนำอากาโรส, sorbitol และ glycerol มาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส และทิ้งให้เย็นลง จนมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส จึงค่อยเติมสารละลายแอมโฟไลต์ลงไป เมื่อผสมแอมโฟไลต์ลงไปเรียบร้อยแล้ว จึงนำมาเทลงบน casting tray ที่ได้ทำให้ร้อนไว้ก่อนแล้ว และปิดทับหน้าเจลด้วยแผ่น gel support film ที่ประกบกับแผ่นกระจก (ในการประกบแผ่น gel support film กับกระจก ให้นำด้านที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic side) ของแผ่นฟิล์มประกบติดกับแผ่นกระจก และด้านที่ชอบน้ำ (hydrophilic side) อยู่ติดกับอากาโรสเจล จากนั้นรอให้เจลแข็งตัวแล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้

นำเจลออกจาก casting tray โดยใช้วัสดุที่มีปลายแบนเรียบสอดเข้ามุมใดมุมหนึ่งของแผ่นกระจกแล้วยกออกมา ขั้นตอนต่อไปนำ template มาวางบนผิวหน้าเจล และใช้เข็มฉีดยา ขนาด 10 ไมโครลิตรดูดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 1 ไมโครลิตร หยดลงบน template ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายโปรตีนแพร่กระจายลงไปบนเนื้อเจล

จึงนำ template ออกจากผิวหน้าเจล นำแผ่นเจลไปคว่ำบนแท่งกราไฟต์อิเล็กโทรด (graphite electrode) ที่ทำให้เปียกก่อนด้วยน้ำกลั่น เมื่อวางแผ่นเจลเรียบรื้อยแล้วจึงผ่าน กระแสไฟฟ้าลงไป โดยเปลี่ยนความต่างศักย์และระยะเวลาเป็นช่วง ๆ ดังนี้ 100 โวลต์ 15 นาที, 200 โวลต์ 15 นาทีและ 450 โวลต์ 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตามที่ กำหนดแล้ว นำแผ่นเจลไปแช่ใน fixative solution เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาล้าง ด้วยเอธานอล และแช่ใน staining solution ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลมาแช่ ใน destaining solution เพื่อทำการล้างสีที่ไม่ต้องการออก แล้วจึงทำให้แห้งโดยการตาก แผ่นเจลไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะได้แผ่นเจลที่เคลือบอยู่บนแผ่นพลาสติก

5. การวิเคราะห์คุณภาพของอากาโรส

อากาโรสที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ จะผ่านการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้ คือ ความแข็งของเจล ความชื้น ค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิส และความหนืด สารตัวอย่าง ที่นำมาวิเคราะห์ได้แก่ LE agarose (สารตั้งต้นของการผลิตอากาโรสที่มีความบริสุทธิ์) agarose/DE, agarose 8/2, agarose 7/3 และ agarose 6/4

5.1 การวัดความแข็งของเจล

ในการวัดความแข็งของเจล จะทำการวัดโดยใช้เครื่องมือวัดความแข็งของ เจล ที่นิยมใช้กันมีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ เครื่องวัดความแข็งของเจลของ Nikansui และของ Marine Colloid สำหรับงานวิจัยนี้ใช้แบบของ Marine Colloid Gel Tester (Marine Colloid's manual. 1979)

เทสารละลายอากาโรส 1.5% ลงในแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร จนกระทั่งเต็มแก้วพอดี จากนั้นทิ้งไว้ให้แข็งตัว แล้วจึง นำไปตั้งไว้ในห้องที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 12 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเจลที่ได้นี้มากลับทิศ โดยใช้ช้อนตักสารด้านปลายแบนแทงเข้าไปทางด้านข้างของ เจลเพื่อเอาเจลออกมา แล้วนำเอาด้านล่างของเจลกลับขึ้นมายู่ด้านบน ต่อจากนั้นนำ ไปวางบนเครื่องวัด และปรับน้ำหนักให้เป็นศูนย์ กดปุ่มเพื่อให้ตัว plunger กดน้ำหนัก

ลงบนตรงกลางผิวของหน้าเจลจนกระทั่งผิวหน้าของเจลแตก บันทึกน้ำหนักที่ทำให้หน้าเจลแตก ซึ่งมีหน่วยเป็นกรัมต่อตารางเซนติเมตร

5.2 การหาค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิส

ในการหาค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสนี้จะใช้วิธีการของ Wieme (Wieme. 1965) โดยเป็นการวัดระยะทางของ dextran และ albumin จากจุดเริ่มต้น ด้วยการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ submarine

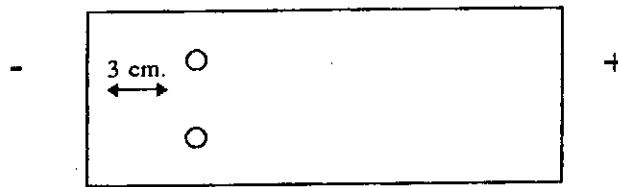
เตรียมวุ้น 1% ใน TPE buffer ปิเปตต์สารละลายวุ้นมา 3 มิลลิลิตรหยดลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้เย็นจนวุ้นแข็งตัว จากนั้นนำสไลด์ที่มีวุ้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ เจาะวุ้นให้เป็นหลุมกลม 2 หลุมต่อ 1 แผ่นสไลด์ (ภาพประกอบ 16) โดยห่างจากขั้วลบ 3 เซนติเมตร ใส่สารละลายของสารผสม dextran และ albumin ลงในหลุม ๆ ละ 1 ไมโครลิตร ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์คงที่เท่ากับ 45 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปสุดขอบเจล จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ใน dextran fixative (สารละลายที่ใช้ตกตะกอน dextran) จนกระทั่งเห็นจุดสีขาวของ dextran บนแผ่นเจล ทำการวัดระยะทางจากจุดศูนย์กลางของหลุมเริ่มต้นไปจนถึงจุดศูนย์กลางของจุดสีขาวของ dextran (OD) จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ในสีย้อม Coomassie blue และนำมาล้างสีส่วนที่เกินออก วัดระยะทางจากจุดศูนย์กลางของหลุมเริ่มต้นจนถึงจุดศูนย์กลางของ albumin (OA) และนำมาคำนวณหาค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิส โดยใช้สูตรดังนี้

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

OD = ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงตำแหน่งของ dextran (cm.)

OA = ระยะทางจากจุดเริ่มต้นจนถึงตำแหน่งของ albumin (cm.)

$-m_r$ = ค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิส



ภาพประกอบ 16 แสดงตำแหน่งการเจาะรูให้เป็นหลุมบนแผ่นสไลด์

5.3 การหาค่าความชื้น

ในการหาค่าความชื้นนี้จะทำตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (AOAC, 1984) เริ่มจากการอบบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นใน desicator แล้วนำไปชั่ง ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ของบีกเกอร์ ซึ่งสารตัวอย่างร่วนประมาณ 0.1 กรัมลงในบีกเกอร์ (ใช้เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน desicator แล้วนำไปชั่ง ทำซ้ำจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่ เมื่อได้ค่าตัวเลขของน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำมาคำนวณหาค่าความชื้นตามสูตรดังนี้

$$\text{Moisture content (\%)} = 100(W1 - W2) / (W1 - W)$$

W = น้ำหนักบีกเกอร์

W1 = น้ำหนักบีกเกอร์และน้ำหนักร่วน ก่อนอบ

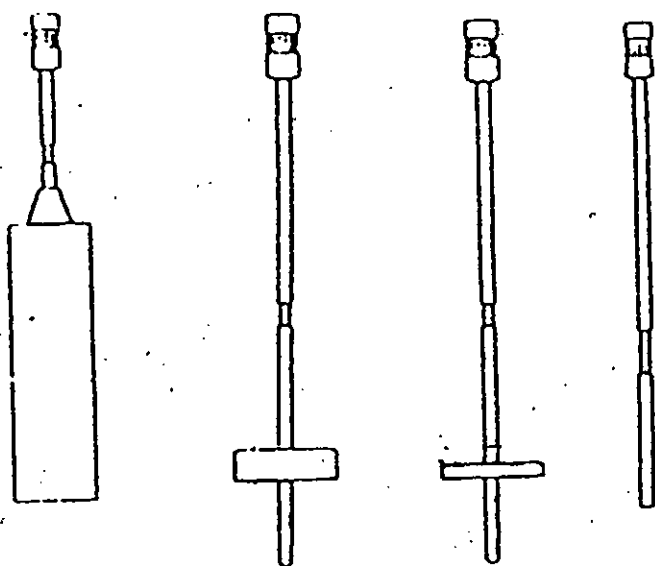
W2 = น้ำหนักบีกเกอร์และน้ำหนักร่วน หลังอบ

5.4 การหาค่าความหนืด

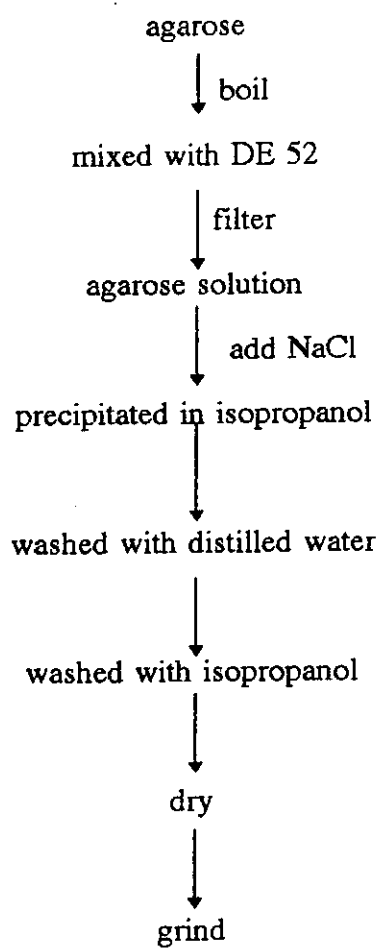
ในการหาค่าความหนืดของสารตัวอย่าง ใช้วิธีการ และเครื่องมือของ

Brookfield viscometer DV-II LV Series

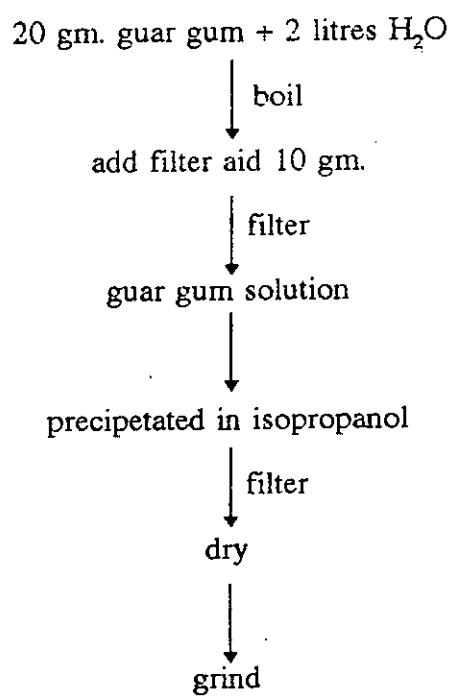
เตรียมสารละลายอากาศ 1.5% ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาดความลึก 11 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7 เซนติเมตร นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จากนั้นเริ่มต้นเปิดเครื่องวัดความหนืด โดยเริ่มจากเปิดสวิตช์มอเตอร์และทำการ set ความเร็วให้เท่ากับ 12 รอบต่อนาที จากนั้นปิดสวิตช์ไว้ชั่วคราว ทำการเลือก ก้านหมุน (spindle) (ภาพประกอบ 17) ให้เหมาะกับสารตัวอย่าง และนำไปหมุนติดกับเครื่องวัด การนำไปหมุนติดกับเครื่องนี้จะต้องใช้ความระมัดระวังเป็นพิเศษ เมื่อติดตั้งเรียบร้อยแล้วนำก้านหมุนไปจุ่มลงในสารละลายอากาศให้ระดับของสารละลายอยู่ตรงกับร่องของก้านหมุน จากนั้นกดปุ่ม SPDL เลือกตัวเลขให้ตรงกับขนาดของก้านหมุนที่ใช้ ปรับความเร็วรอบไปที่ 60 รอบต่อนาที และทำการเปิดสวิตช์มอเตอร์ ก้านหมุนจะเริ่มหมุนตามความเร็วที่กำหนด อ่านค่า % บนหน้าปัทม์ ต่อจากนั้นเลือกปุ่มการอ่านค่าความหนืดเป็นเซนติพอยส์ (centipoises, cps.) และอ่านค่าที่วัดได้จากหน้าปัทม์



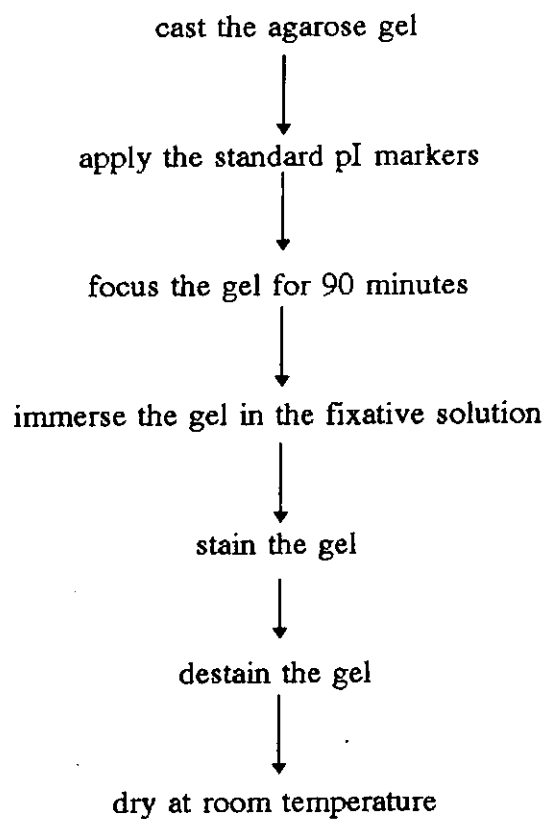
ภาพประกอบ 17 แสดงรูปแบบต่าง ๆ ของก้านหมุน



ภาพประกอบ 18 ขั้นตอนการเตรียมอะกาโรสให้มีความบริสุทธิ์ โดยการใช้ DE52



ภาพประกอบ 19 ขั้นตอนการเตรียมผงกัวกัม



ภาพประกอบ 20 ขั้นตอนในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การเตรียมอากาศบริสุทธิ์โดยใช้ DE 52

จากการใช้ DE 52 ในการกำจัดสารที่มีประจุลบ ที่เป็นองค์ประกอบที่พบใน LE อากาศ โดยใช้อากาศต่อ DE 52 อัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าของ EEO ลดลงจาก 0.078 ไปเป็นศูนย์ (ตาราง 4) และผลผลิตที่ได้คิดเป็นร้อยละ 78.44 เมื่อนำอากาศที่บริสุทธิ์แล้วไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด (motar grinder) จะนำไปใช้ในการผสมกับกัวกัม เพื่อใช้ในงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

2. การเตรียมกัวกัมเพื่อสกัดแยกเอาส่วนที่ละลายน้ำได้

จากการต้มกัวกัม 20 กรัม ในน้ำ 2 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที พบว่าได้ส่วนที่ละลายได้ในน้ำปริมาณ 11.64 กรัม ซึ่งหมายถึงองค์ประกอบของกัวกัมที่สามารถละลายน้ำได้ในการทดลองนี้มี 58.2 %

3. การเตรียมอากาศเพื่อใช้ในงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

อากาศ/DE ที่นำมาผสมกับกัวกัมจะมีคุณสมบัติที่ต่างไปจากอากาศที่ไม่ผสมกับกัวกัมโดยพบว่าความแข็งของเจลจะมีค่าลดลง จาก 1,024 เป็น 473 กรัมต่อตารางเซนติเมตร แต่ความหนืดจะมีค่าเพิ่มขึ้น และ 8.01 เป็น 19.2 cps. เมื่อมีกัมเป็นส่วนผสมมากขึ้น (ตารางที่ 4) สำหรับค่าอิเล็กโตรเอ็นคอสโมซิสของอากาศที่ผสมกัม จะมีค่าเท่ากับศูนย์เหมือนกับ agarose/DE

4. ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้อากาโรสชนิดต่าง ๆ มาทดสอบในงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ซึ่งได้แก่ HE agarose, LE agarose, agarose/DE, agarose 8/2, agarose 7/3 และ agarose 6/4 สำหรับสารมาตรฐานที่ใช้เป็นสารตัวอย่าง คือ โปรตีนมาตรฐาน (pI marker) จากบริษัท FMC ช่วงของ pH ที่ใช้ทดสอบจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วง pH 3-10 และช่วง pH 5-8

4.1 ผลการทดสอบการใช้อากาโรสชนิดต่าง ๆ ในช่วง pH 3-10

จากการนำ HE agarose และ LE agarose มาทดสอบการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าไม่สามารถแยกสารโปรตีนมาตรฐานได้ (ภาพประกอบ 21 และ 22) ทั้งนี้เนื่องจากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เมื่อเพิ่มความต่างศักย์มีค่าถึง 450 โวลต์ และใช้เวลาในการทำงานนาน 1 ชั่วโมง จะพบว่าการละลายของเนื้อวุ้นออกมาค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงทำให้สารโปรตีนมาตรฐาน และสารแอมโฟไลต์ถูกละลายออกมาจากเนื้อเจลด้วย ทำให้ไม่สามารถแยกโปรตีนได้

เมื่อนำอากาโรสที่ผ่านการกำจัดประจุลบออกโดยใช้ DE 52 ซึ่งเป็นอากาโรสที่มีความบริสุทธิ์สูงและมีค่าอิเล็กโตรเนกติวิตีต่ำกับศูนย์ มาทดสอบการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าไม่สามารถแยกโปรตีนมาตรฐานได้เช่นกัน (ภาพประกอบ 23) และยังคงมีการละลายของเนื้อวุ้นอีกด้วยในระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

ผลจากการนำ agarose/DE ที่ผสมกับกัวกัม ในอัตราส่วนต่าง ๆ มาทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าที่อัตราส่วน 8:2 ลักษณะตำแหน่งของแถบโปรตีนบริเวณหัวบวกละห่างกันมาก และตำแหน่งของโปรตีน horse myoglobin, major band ตรงบริเวณหัวบวกละหายไป เนื่องจาก agarose 8/2 มีการละลายของเนื้อวุ้นตรงด้านหัวบวกละขณะทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ทำให้ทั้งสารโปรตีนมาตรฐานและเนื้อวุ้นถูกละลายออกไปพร้อมกัน มีผลทำให้แถบโปรตีนมาตรฐานด้านบริเวณหัวบวกละมีระยะห่างกันมาก เพราะผลจากการละลายของเนื้อวุ้นตรงด้านหัวบวกละ ดังนั้นโปรตีนมาตรฐานที่อยู่ทางด้านหัวบวกละจึงถูกดึงและไหลไปพร้อมกัน (ภาพประกอบ 24)

ที่อัตราส่วน 7:3 และ 6:4 พบว่าลักษณะแถบของโปรตีนมาตรฐานที่แยกได้ คล้ายคลึงกันมากที่บริเวณของแถบ Carbonic anhydrase (pH 6) จนถึงแถบ Amyloglucosidase (pH 3) แต่ในส่วนที่แตกต่างกันคือบริเวณข้างลบบจะพบว่าที่อัตราส่วน 7:3 แถบของ cytochrome C (pH 10) และ horse myoglobin (pH 7) มีช่วงห่างกันพอสมควร อีกทั้งตำแหน่งของโปรตีนที่ pH 7 จะพบว่า แถบ major และ minor ของ horse myoglobin แยกออกจากกันเด่นชัด (ภาพประกอบ 25) ในขณะที่ อัตราส่วน 6:4 แถบโปรตีนมาตรฐานของ pH 10 มีช่วงระยะทางห่างจาก pH 7 ไม่มากนัก ซึ่งน่าจะห่างจากกันมากกว่านี้เพราะ pH 10 และ pH 7 เป็นช่วงของ pH ที่ต่างกันถึง 3 หน่วย นอกจากนี้แถบของ horse myoglobin (pH 7) ทั้ง major และ minor band แยกจากกัน น้อยมาก (ภาพประกอบ 26)

เป็นที่น่าสังเกตว่า ระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงของอัตราส่วน 7:3 และ 6:4 พบว่าอัตราส่วนของ 6:4 ก็ยังคงมีการละลายของเนื้อวุ้นเพียงแต่การละลายนี้น้อยกว่าอัตราส่วน 8:2 แต่อัตราส่วน 7:3 มีการละลายของเนื้อวุ้นน้อยมาก เมื่อเทียบกับอัตราส่วน 8:2 และ 6:4

จากการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบโปรตีนมาตรฐานทั้ง 3 อัตราส่วน ซึ่ง ได้แก่ 8:2, 7:3, และ 6:4 เทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการใช้ Isogel/FMC พบว่าอัตราส่วน 7:3 มีรูปแบบของแถบโปรตีนมาตรฐาน ใกล้เคียงกับแถบโปรตีนมาตรฐานของ Isogel/FMC มากที่สุด (ภาพประกอบ 27) อย่างไรก็ตามพบว่า มีบางส่วนที่แตกต่างกันคือ ในช่วง pH ต่ำ ๆ ตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานที่แยกได้จะมีลักษณะการแยกที่กว้างกว่าของ Isogel/FMC

4.2 ผลการทดสอบการใช้กากโรสนิคต่าง ๆ ในช่วง pH 5-8

จากการนำ agarose/DE มาทดสอบการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าไม่สามารถแยกสารโปรตีนมาตรฐานได้ เพราะว่าการละลายของเนื้อเจลเช่นเดียวกับผลของช่วง pH 3-10 (ภาพประกอบ 28) ที่อัตราส่วน 8:2 จากการนำ agarose 8/2, 7/3 และ 6/4 มาทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าพบว่าการแยกของแถบโปรตีนมาตรฐานไม่ดี โดยที่บริเวณตำแหน่งตรงข้างลบบ แถบของโปรตีนที่มีค่า pH 7 และ

pH 6 จะอยู่ใกล้กันมาก ทั้งนี้เนื่องจากระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง มีการละลายของเนื้อวุ้นเกิดขึ้น ทำให้แถบของโปรตีนมาตรฐานเคลื่อนที่ไปรวมกัน และจากสาเหตุดังกล่าวนี้ แถบของโปรตีนมาตรฐานตรงบริเวณหัวบวก็เกิดการเคลื่อนที่ตามไปด้วยเช่นกัน (ภาพประกอบ 29)

ที่อัตราส่วน 7:3 และ 6:4 ลักษณะการแยกของแถบโปรตีนมาตรฐานจะใกล้เคียงกัน แต่จะต่างกันที่ ความตรงของแถบโปรตีนมาตรฐาน นั่นคือแถบโปรตีนมาตรฐานของอัตราส่วน 7:3 จะมีแถบที่มีความตรงของแถบมากกว่าแถบโปรตีนมาตรฐานของอัตราส่วน 6:4 (ภาพประกอบ 30 และ 31) แต่ถึงกระนั้นก็ตาม การละลายของเนื้อวุ้นที่อัตราส่วน 6:4 ก็ยังคงเกิดขึ้นในระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง รวมทั้งอัตราส่วน 7:3 แต่ปริมาณของเนื้อวุ้นที่ละลายออกมาของอัตราส่วน 7:3 ก็มีน้อยกว่า 6:4 และ 8:2

จากการพิจารณารูปแบบของแถบโปรตีนมาตรฐานของอัตราส่วน 6:4, 7:3, และ 8:2 แล้วนำมาเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน Isogel /FMC พบว่าไม่มีอัตราส่วนใด ๆ เลยที่มีรูปแบบของแถบโปรตีนมาตรฐานใกล้เคียงกับรูปแบบของแถบโปรตีนมาตรฐานของ Isogel /FMC (ภาพประกอบ 32) อีกทั้งรูปแบบของการแยกของโปรตีนมาตรฐานในช่วงที่เป็นกรด จะมีระยะทางที่กว้างกว่าแถบโปรตีนมาตรฐานของ Isogel /FMC อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองที่ผ่านมา อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วน 7:3 ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง จากการใช้ Isogel /FMC ทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง จะได้รูปแบบของแถบโปรตีนมาตรฐาน

4.3 การนำผลจากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงในช่วง pH 3-10 มาแสดงในรูปของกราฟมาตรฐานของโปรตีน (standard curve)

ผลจากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ในช่วง pH 3-10 โดยใช้สารตัวอย่างซึ่งได้แก่ Isogel /FMC และสารผสมระหว่าง purified agarose และกัวกัม ในอัตราส่วน 8:2, 7:3 และ 6:4 เป็นสารตัวกลางค้ำจุน จะได้แถบของโปรตีนมาตรฐานในรูปแบบต่าง ๆ กันตามชนิดของตัวกลางค้ำจุน แถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้ในแต่ละรูปแบบนั้น จะถูกนำมาวัดระยะทางระหว่างโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัวจากหัวลบ ดังนั้นโปรตีน

มาตรฐานที่ pH 10 (cytochrome C) จะเป็นจุดเริ่มต้นตัวแรก ซึ่งมีระยะทางจากขั้วลบ เป็นศูนย์ และโปรตีนมาตรฐานตัวอื่น ๆ ก็จะมีระยะทางต่างกันไป เมื่อทำการวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐานทุกตัวแล้ว จะนำไป plot เป็นเส้นกราฟ เพื่อใช้เป็นกราฟ มาตรฐานสำหรับโปรตีนอื่น ๆ ต่อไป

จากการใช้ตัวกลางค่าจุณชนิด Isogel /FMC จะเห็นได้ว่าระยะทางของโปรตีน มาตรฐานในแต่ละตัวนั้น เมื่อนำมา plot เป็นเส้นกราฟ จะได้เส้นที่เกือบจะเป็นเส้นตรง อีกทั้งตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานบนเส้นกราฟแยกออกจากกันอย่างชัดเจน (ภาพ ประกอบ 33) เมื่อพิจารณาถึงการใช้ตัวกลางค่าจุณที่ได้จากการเตรียมสารผสมระหว่าง agarose ต่อแก้วกัมที่อัตราส่วน 8:2 จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟที่ได้จะมีลักษณะ โค้งลงต่ำ และ ตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานของ major และ minor horse myoglobin จะอยู่ในแนว ของระยะทางที่เท่ากับศูนย์ ส่วนระยะทางของโปรตีนตัวอื่น ๆ มีแนวโน้มห่างจากขั้วลบ ไม่มากนัก แสดงว่าการแยกของโปรตีนมาตรฐานบนตัวกลางค่าจุณที่เป็นสารผสม ระหว่างอากาโรสต่อแก้วกัมในอัตราส่วน 8:2 ยังไม่สามารถใช้ได้ (ภาพประกอบ 34) สำหรับตัวกลางค่าจุณที่ได้จากการเตรียมสารผสมระหว่างอากาโรสต่อ แก้วกัมที่อัตรา ส่วน 6:4 และ 7:3 พบว่าเส้นกราฟของ 6:4 จะมีลักษณะ โค้งงอมากกว่าที่จะเป็นเส้น ตรง (ภาพประกอบที่ 35 และ 36) ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานที่อยู่บน กราฟนี้มีระยะทางห่างจากขั้วลบน้อย และตำแหน่งของโปรตีนในช่วงท้ายจะมีระยะทาง ห่างกันมาก ซึ่งเป็นผลมาจากแผ่นเจลที่มีการละลายของเนื้อวุ้นถึงแม้ว่าจะมีปริมาณไม่ มากก็ตาม

สำหรับเส้นกราฟของตัวกลางค่าจุณของอัตราส่วน 7:3 พบว่าลักษณะของ เส้นกราฟค่อนข้างเกือบจะเป็นเส้นตรง และถ้าหากเปรียบเทียบกันระหว่าง Isogel /FMC ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ กับตัวกลางค่าจุณที่ได้จากการเตรียมสารผสม ระหว่าง agarose ต่อแก้วกัม พบว่าจำนวนแถบของโปรตีนมาตรฐานทั้งที่ปรากฏอยู่บน เจล และปรากฏอยู่บนเส้นกราฟมีจำนวนเท่ากัน

สรุปได้ว่าการเตรียมสารผสมระหว่างอากาโรส ต่อแก้วกัม ในอัตราส่วน 7:3 เมื่อเปรียบเทียบกับ Isogel อากาโรส สามารถที่จะแยกโปรตีนมาตรฐานได้ครบ

ทุกตัว และเมื่อวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐานแล้วนำมา plot กราฟเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับระยะทางของโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเป็นเส้นตรงซึ่งใกล้เคียงกับ Isogel /FMC หากแต่จะต่างกันเพียงตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานบางตัวเท่านั้น เพราะเป็นอากาโรสที่ต่างชนิดกัน ดังนั้นอัตราส่วนนี้จึงเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

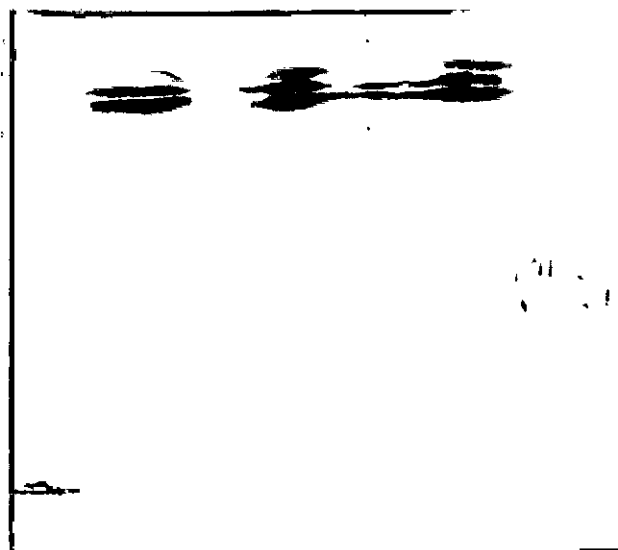
4.4 การนำผลจากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงในช่วง pH 5-8 มาแสดงในรูปของกราฟมาตรฐานของโปรตีน

ผลจากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง pH 5-8 โดยใช้สารตัวอย่างซึ่งได้แก่ Isogel /FMC และสารผสมระหว่าง purified agarose และกัวกัม ในอัตราส่วน 8:2, 7:3 และ 6:4 เป็นสารตัวกลางค้ำจุนเช่นเดียวกัน จะได้แถบของโปรตีนมาตรฐานในรูปแบบต่าง ๆ กันตามชนิดของตัวกลางค้ำจุน แถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้ในแต่ละรูปแบบนั้นจะถูกนำมาวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัว สำหรับการวัดในชุดของ pH 5-8 นี้จะต่างจากการวัดในชุดของ pH 3-10 คือ การวัดเริ่มวัดจากขั้วลบไปยังโปรตีนตัวแรก ซึ่งในที่นี้คือโปรตีนมาตรฐานที่ pH 7 (Horse Myoglobin) จะมีระยะทางห่างจากขั้วลบเท่ากับ 0.97 เซนติเมตร และโปรตีนมาตรฐานตัวอื่น ๆ ก็จะมีระยะทางเป็นลำดับต่อไป เมื่อทำการวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐานในทุก ๆ ตัวแล้ว ค่าที่วัดได้นี้จะนำไป plot เป็นเส้นกราฟ เพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐานต่อไป จากการใช้ตัวกลางค้ำจุนชนิด Isogel /FMC ซึ่งกำหนดให้เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่อเปรียบเทียบกับสารผสมระหว่างอากาโรสกับกัวกัม ทั้ง 3 อัตราส่วน พบว่าค่าของระยะทางจากขั้วลบของโปรตีนมาตรฐานทุกตัว เมื่อนำไป plot กราฟแล้ว จะได้เส้นมาตรฐานเป็นเส้นตรง และตำแหน่งของโปรตีนแต่ละตัวจะเห็นเด่นชัด (ภาพประกอบ 37) เมื่อพิจารณาจากกราฟที่ได้ของตัวกลางค้ำจุนของอัตราส่วน 8:2 พบว่า ที่ตำแหน่งของขั้วลบโปรตีนมาตรฐานที่ pH 7 จะอยู่ติดกับขั้วลบ ทั้งนี้เนื่องจากการละลายของเนื้อวุ้นซึ่งจะพาแอมไฟไลต์ และโปรตีนมาตรฐานไปรวมกัน จึงมีผลทำให้โปรตีนมาตรฐานตัวอื่น ๆ ถูกพาไปด้วยเช่นกัน เพราะฉะนั้นเมื่อวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐานแล้วนำมา plot เป็นเส้นกราฟออกมา จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟจะมีขนาดสั้นผิดไปจากที่ควรจะเป็น และ

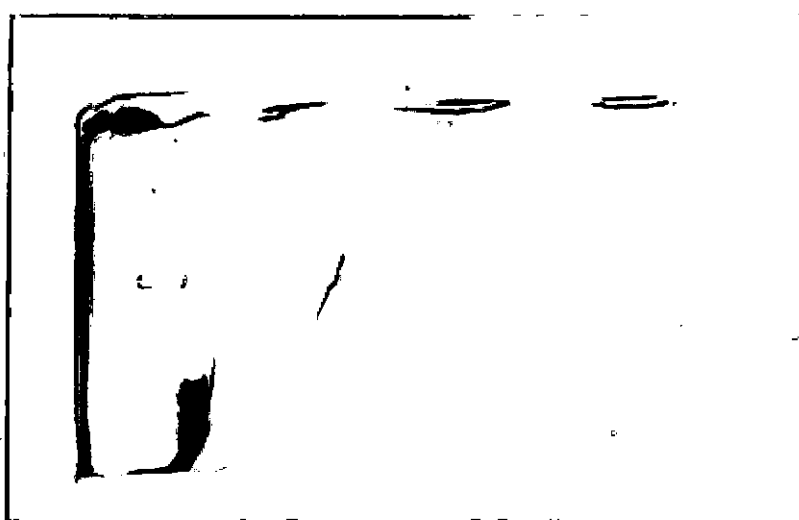
ตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานบนเส้นกราฟก็ผิดไปด้วยเช่นกัน (ภาพประกอบ 38) สำหรับตัวกลางค่าจุณของอัตราส่วน 7:3 และ 6:4 เมื่อพิจารณาที่เส้นกราฟที่ได้จากการวัดระยะทางของโปรตีนมาตรฐานทุก ๆ ตัว พบว่า ที่อัตราส่วนทั้งสองนี้มีเส้นกราฟที่ไม่แตกต่างกัน เพราะระยะทางของโปรตีนมาตรฐานใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังแยกโปรตีนได้ครบทุกตัว ที่อัตราส่วน 7:3 ความคมชัดของแถบโปรตีนจะดีกว่า อัตราส่วน 6:4 (ภาพประกอบ 39 และ 40) หากเปรียบเทียบอัตราส่วนของ 6:4 กับ Isogel /FMC พบว่าระยะทางของโปรตีนมาตรฐานของอัตราส่วน 6:4 ที่ pH 7 จะมีค่าน้อยกว่า ค่าระยะทางของ Isogel /FMC เนื่องจากตัวกลางค่าจุณของอัตราส่วน 6:4 ในขณะที่ทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ยังคงมีการละลายของวุ้นทางด้านข้างลบบ จึงมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานห่างจากข้างลบน้อย อย่างไรก็ตามที่อัตราส่วน 7:3 พบว่ามีการละลายของเนื้อวุ้นด้วยเช่นกัน แต่มีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วน 6:4 และ 8:2

ตาราง 4 แสดงสมบัติต่าง ๆ ของ agarose, agarose/DE, agarose 8/2, agarose 7/3 และ agarose 6/4

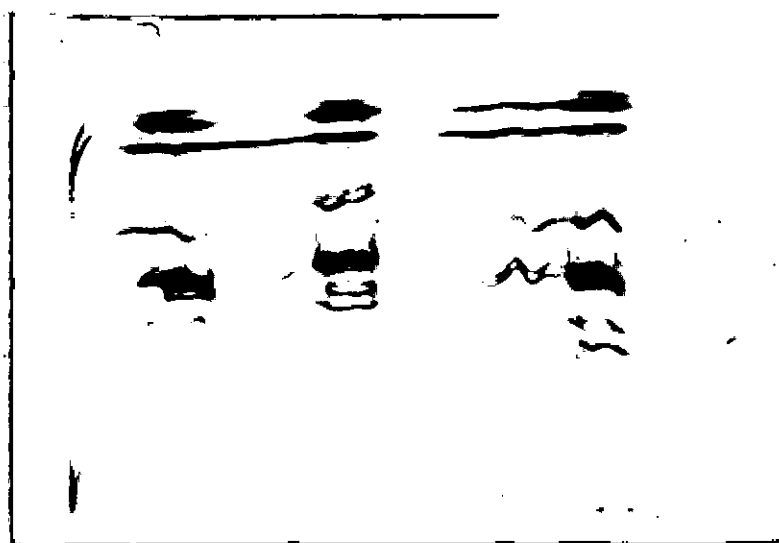
sample	viscosity (cps)	EEO (-m _r)	gel strength (g/cm ²)	moisture (%)
Isogel/FMC		0	>500	≤10
LE agarose (FMC)	7.3	0.078	1505	4.96
agarose/DE	8.01	0	1284	7.83
the blended agarose agarose : guar gum				
8:2	10.6	0	736	7.94
7:3	15.2	0	583	8.29
6:4	19.2	0	473	8.34



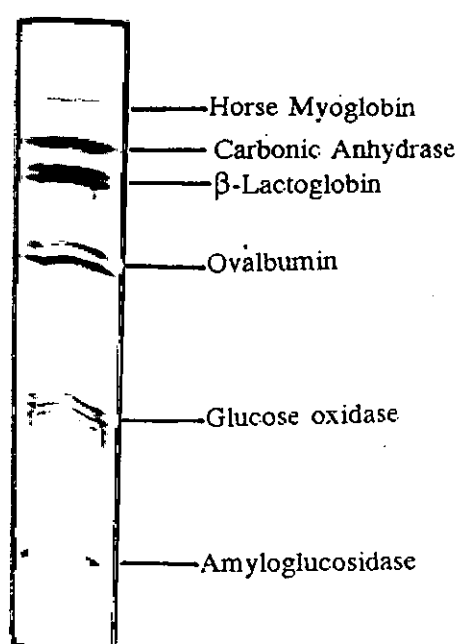
ภาพประกอบ 21 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ HE agarose



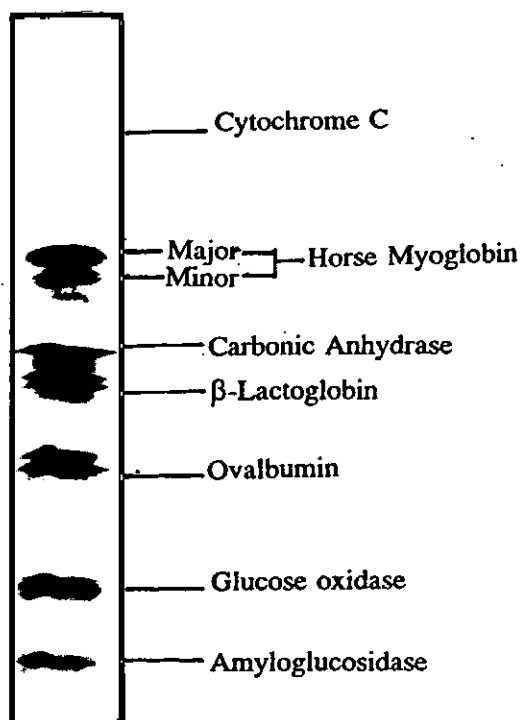
ภาพประกอบ 22 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ LE agarose



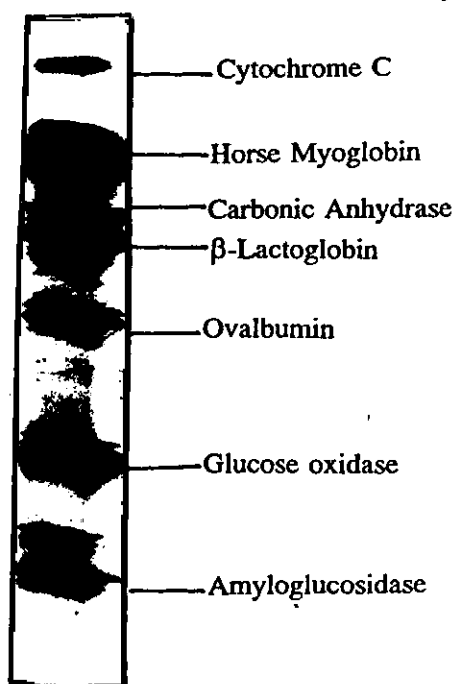
ภาพประกอบ 23 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose/DE



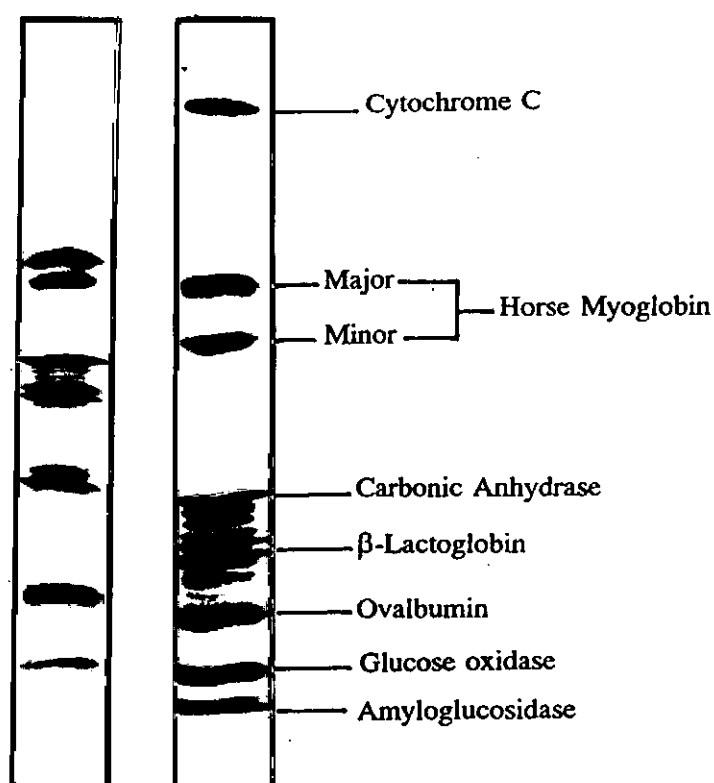
ภาพประกอบ 24 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose 8/2



ภาพประกอบ 25 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose 7/3



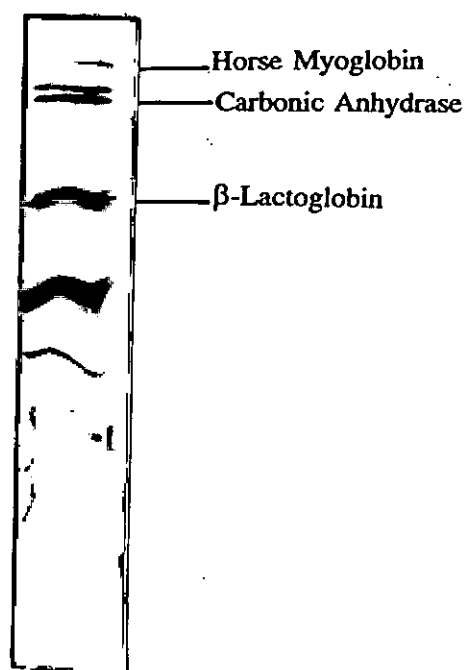
ภาพประกอบ 26 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose 6/4



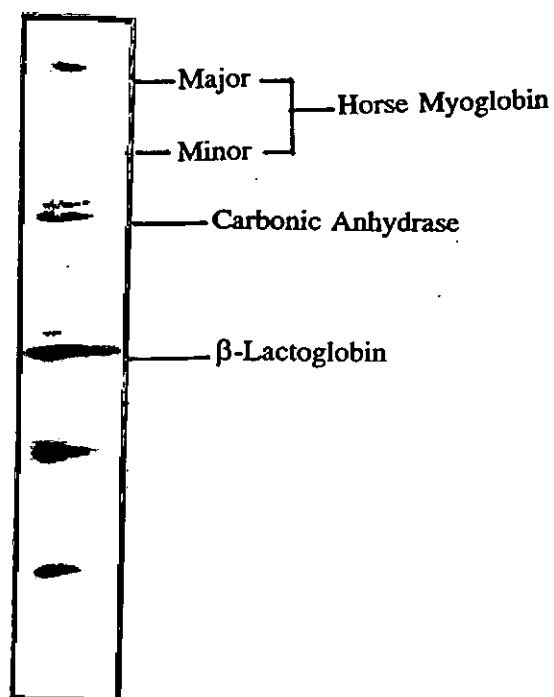
ภาพประกอบ 27 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose/FMC และ agarose 7/3



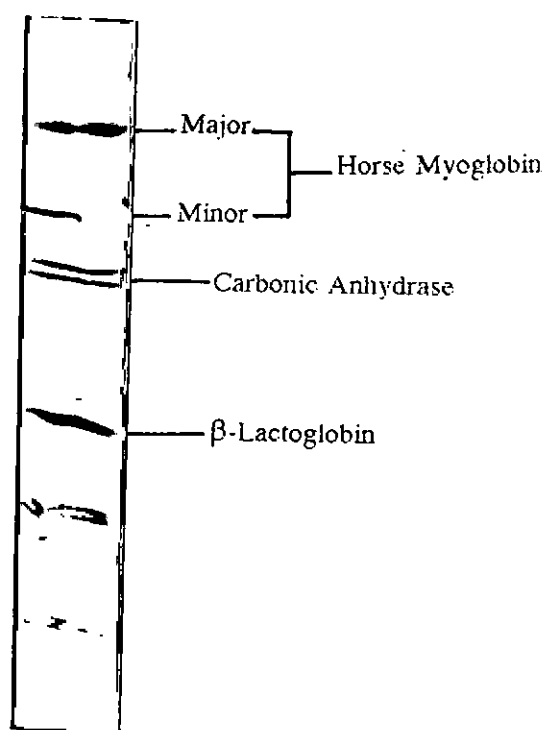
ภาพประกอบ 28 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose/DE



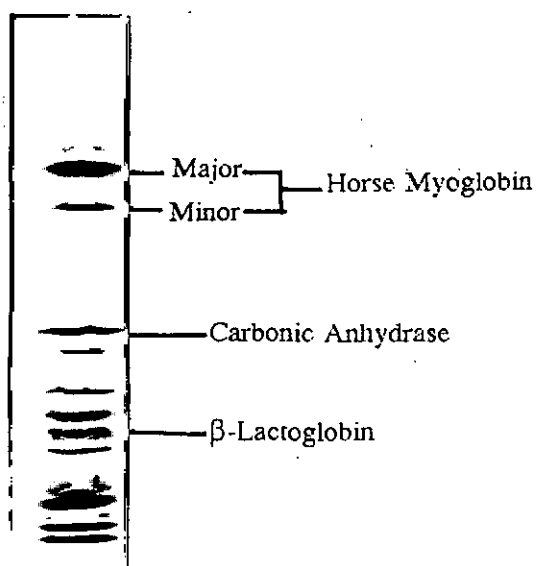
ภาพประกอบ 29 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose 8/2



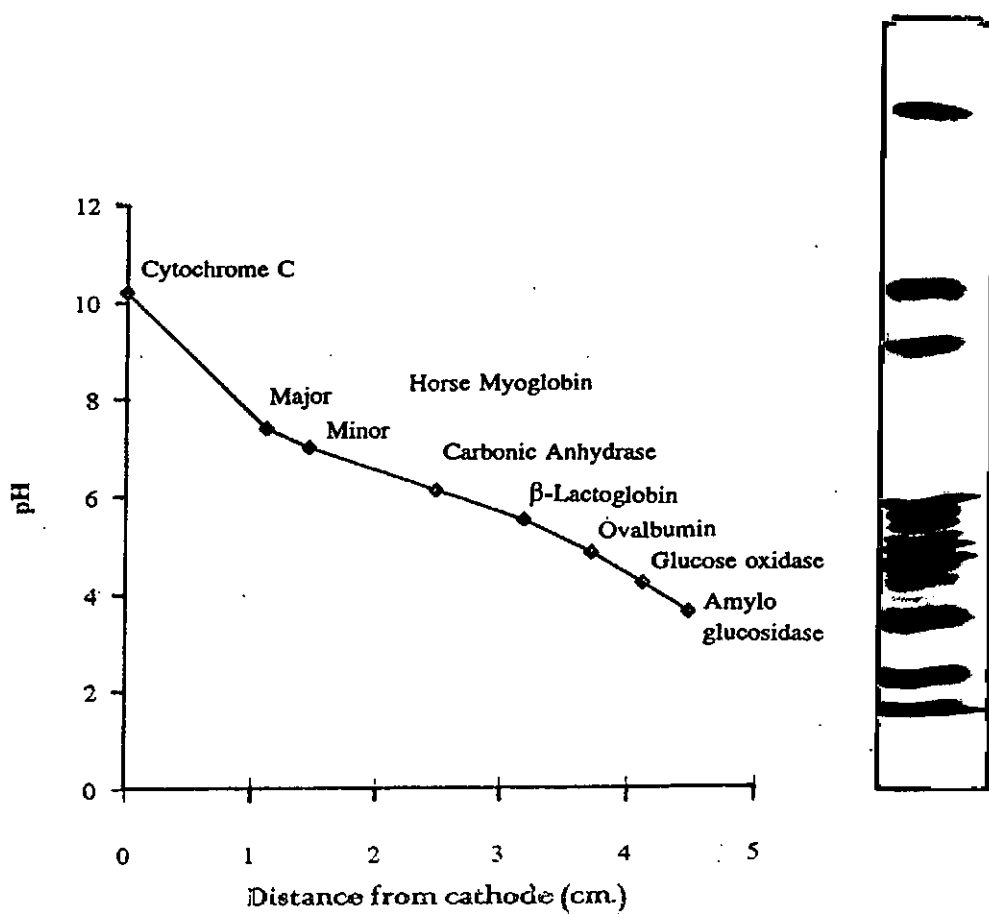
ภาพประกอบ 30 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose 7/3



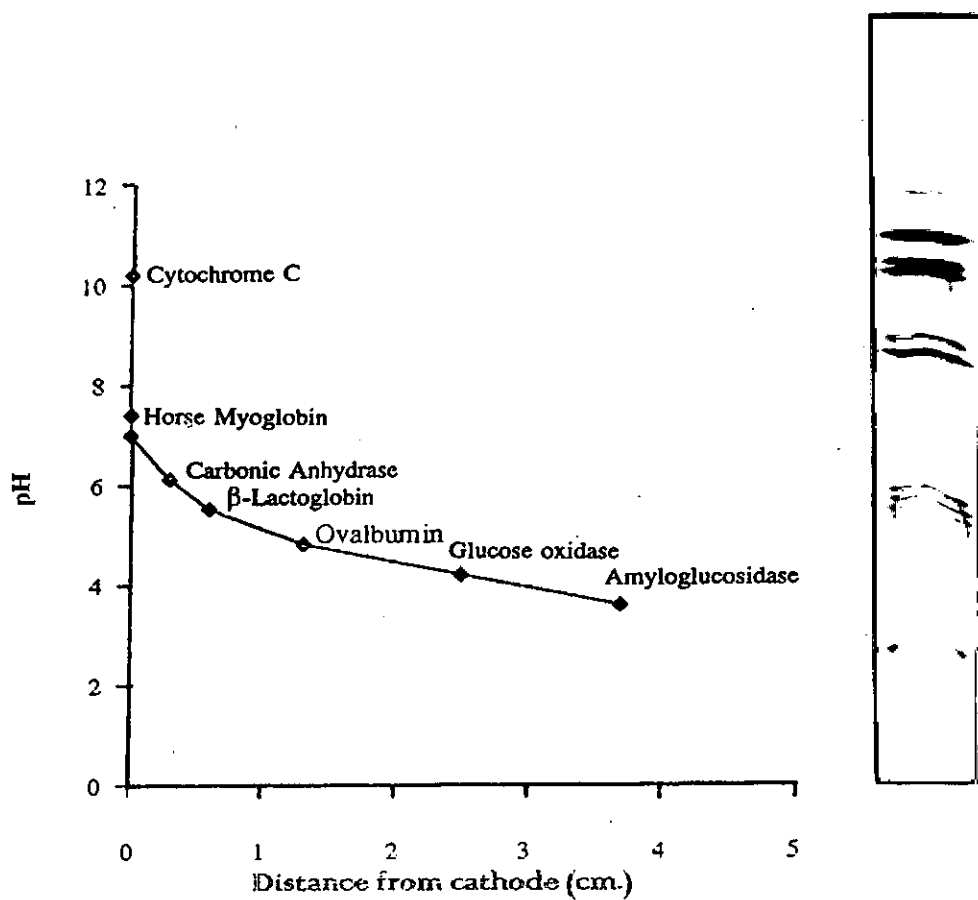
ภาพประกอบ 31 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose 6/4



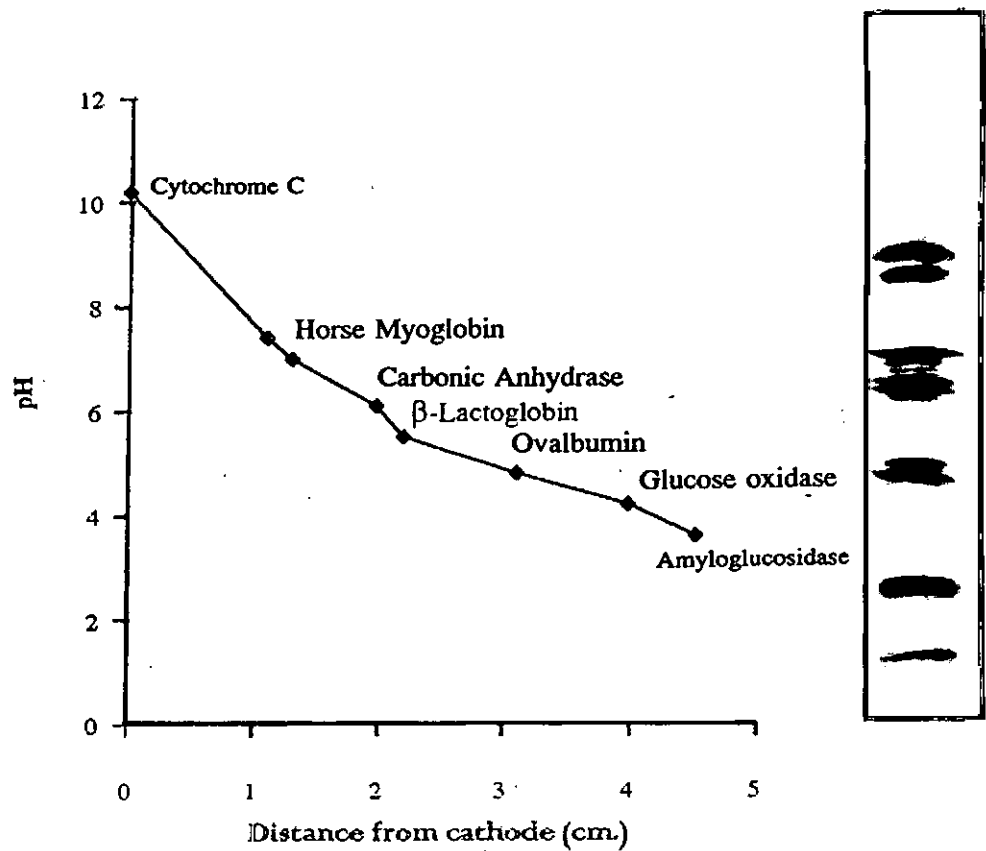
ภาพประกอบ 32 แสดงแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริก
โฟกัสซิง ที่ pH 5-8 โดยใช้ agarose/FMC



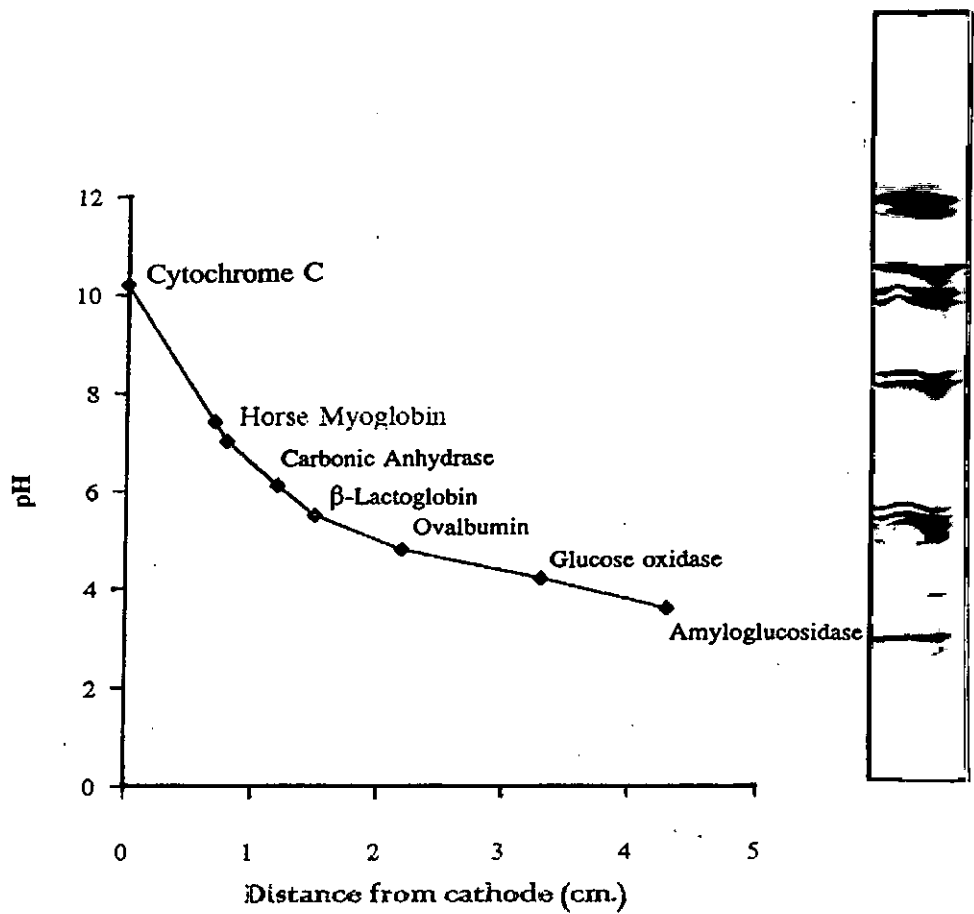
ภาพประกอบ 33 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง pH 3-10 โดยใช้ Isogel/FMC เป็น supporting medium



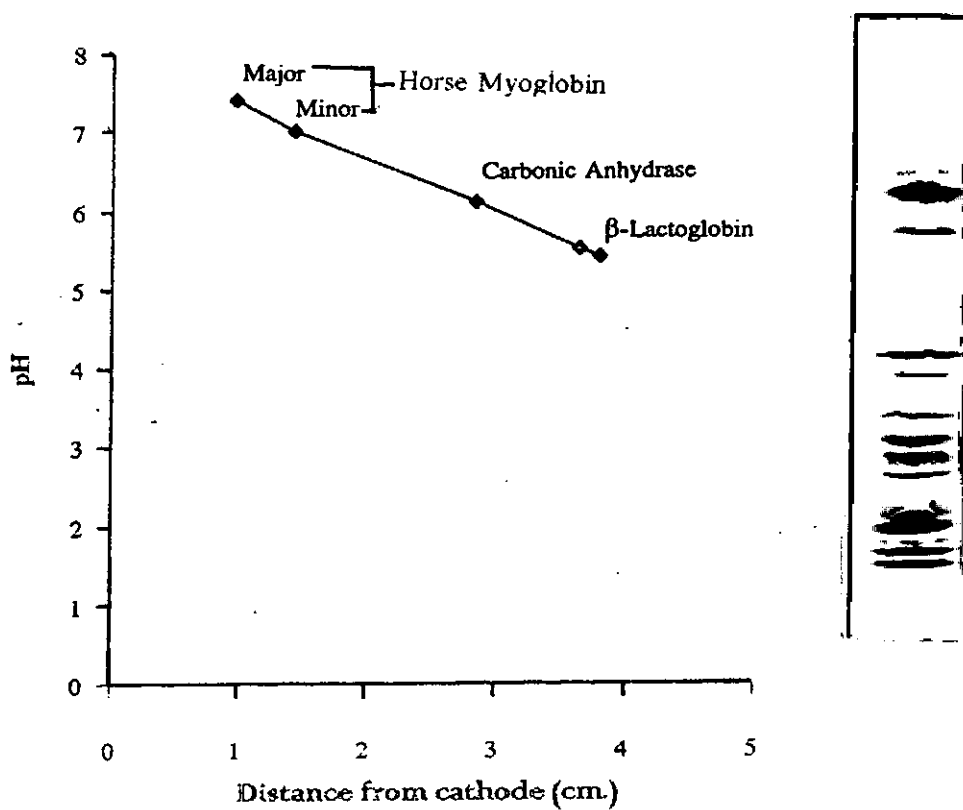
ภาพประกอบ 34 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง
ที่ pH 3-10 โดยใช้ agarose 8/2 เป็น supporting medium



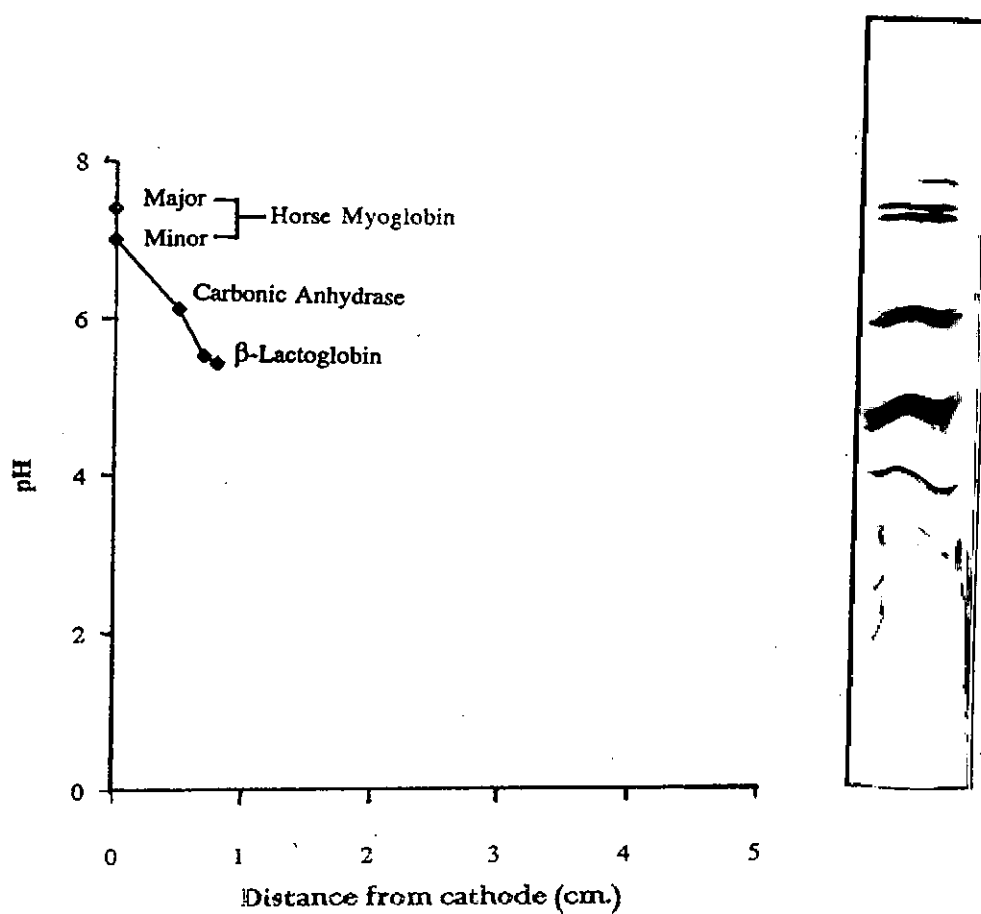
ภาพประกอบ 35 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง pH 3-10 โดยใช้ agarose 7/3 เป็น supporting medium



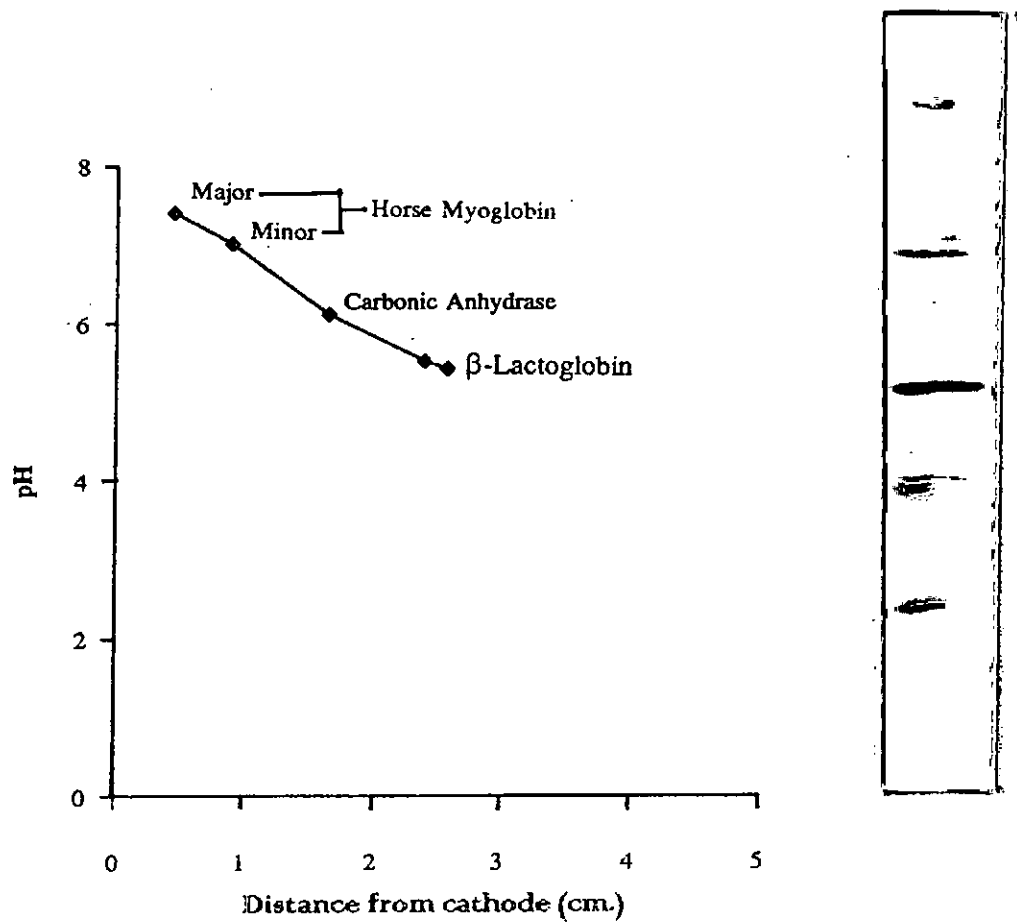
ภาพประกอบ 36 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง pH 3-10 โดยใช้ agarose 6/4 เป็น supporting medium



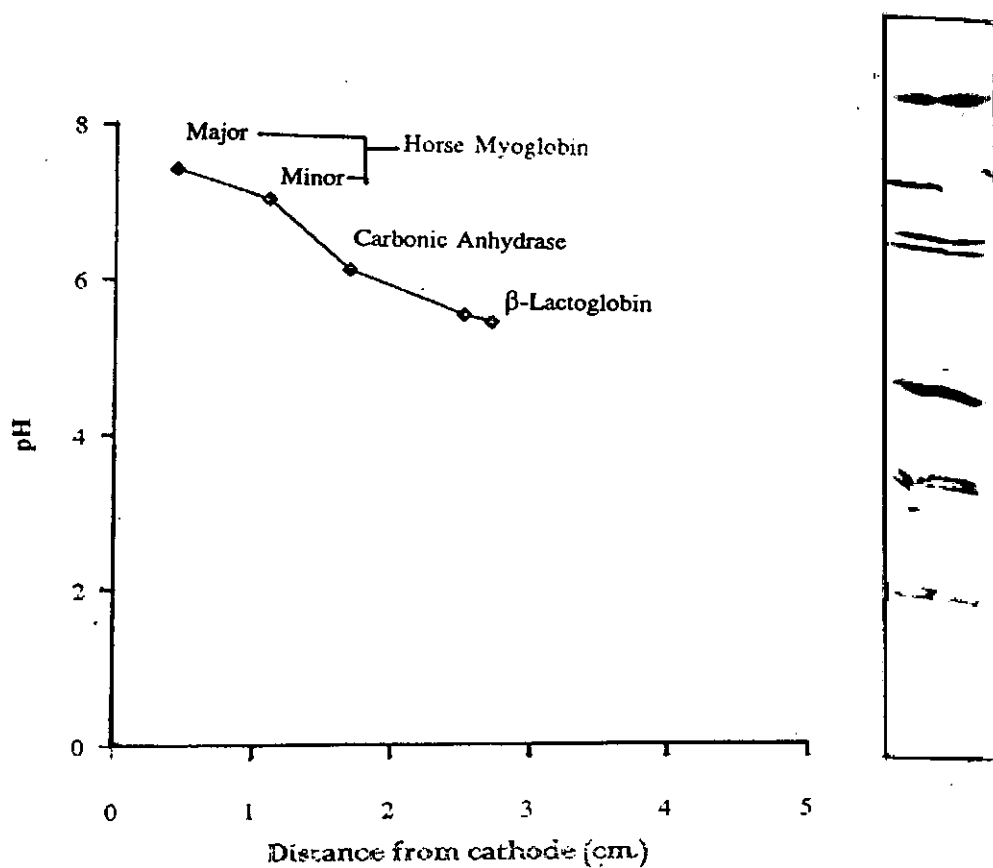
ภาพประกอบ 37 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง
pH 5-8 โดยใช้ Isogel/FMC เป็น supporting medium



ภาพประกอบ 38 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง pH 5-8 โดยใช้ agarose 8/2 เป็น supporting medium



ภาพประกอบ 39 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง pH 5-8 โดยใช้ Isogel 7/3 เป็น supporting medium



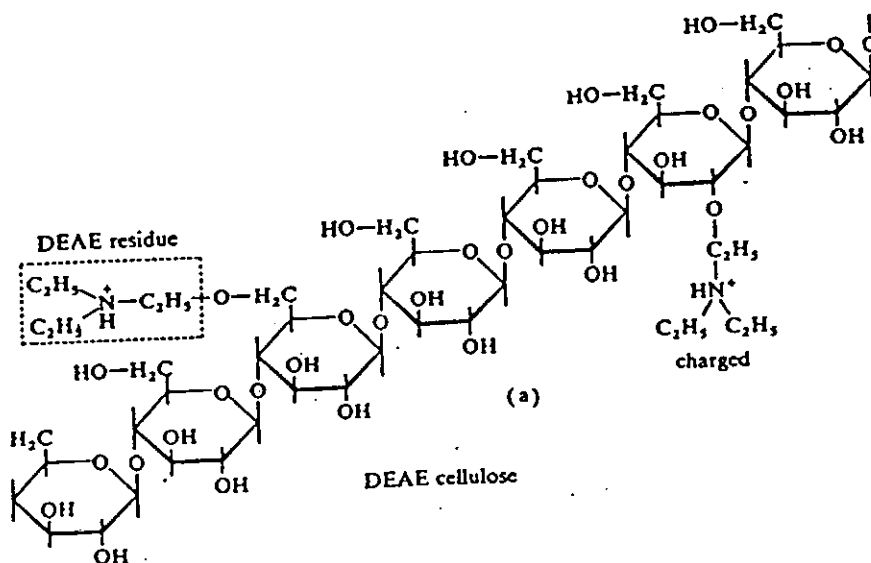
ภาพประกอบ 40 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซึ่ง
pH 5-8 โดยใช้ agarose 6/4 เป็น supporting medium :

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

ในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง จำเป็นต้องอาศัยตัวกลางที่ปราศจากประจุ เพราะเทคนิคนี้เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยค่าความแตกต่างของจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีน ดังนั้นถ้าสารตัวกลางมีประจุปนอยู่จะทำให้มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสาร สารตัวกลางที่กล่าวนี้หมายถึงอากาศไรส ในระบบการผลิตอากาศไรสจะมีการกำจัดเอาประจุลบออกจากอากาศไรสให้มากที่สุดด้วยวิธีต่าง ๆ กัน การใช้ ion-exchange จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกเลือกและนำมาใช้ในระบบการผลิตนี้

สารที่นิยมใช้เป็นตัว ion-exchanger ได้แก่ DEAE cellulose และ DEAE-Sephadex หรือใช้ผสมกับสารละลายอากาศไรสโดยตรง เนื่องจากโครงสร้างของ DEAE cellulose ประกอบด้วยหมู่อะมิโน (ภาพประกอบ 41) ดังนั้นมันจึงยึดจับเฉพาะอากาศไรสเพคตินซึ่งมีประจุลบให้ติดอยู่กับ DEAE cellulose ผลผลิตที่ได้คืออากาศไรสบริสุทธิ์



ภาพประกอบ 41 แสดงภาพโครงสร้างของ DEAE cellulose

ดังจะเห็นได้จากตาราง 1 อากาโรสที่นำมาผ่าน DEAE cellulose นั้น เมื่อนำไปหาค่าอิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสจะได้ค่าเท่ากับศูนย์ แสดงว่าอากาโรสที่ได้นี้มี ความบริสุทธิ์สูงหรือมีประจุลบน้อยมากจนไม่สามารถวัดได้ เพราะฉะนั้นจากผลที่ได้นี้จึงแสดงให้เห็นว่า DEAE cellulose สามารถช่วยกำจัดประจุลบออกไปได้มาก ซึ่ง ลักษณะเช่นนี้จะสอดคล้องกับการทดลองของ Zabin ในการผลิตอากาโรสจากวัน Zabin ได้ใช้ DEAE cellulose ช่วยในการแยกอากาโรสออกจากอากาโรเพคตินได้สำเร็จ และเมื่อทำการวัดปริมาณซัลเฟตพบว่าปริมาณซัลเฟตลดลงเหลือ 0.01%

อย่างไรก็ตามในการผลิตอากาโรสให้มีความบริสุทธิ์มากหรือน้อยเพียงใดนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของอากาโรสที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้น และขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์

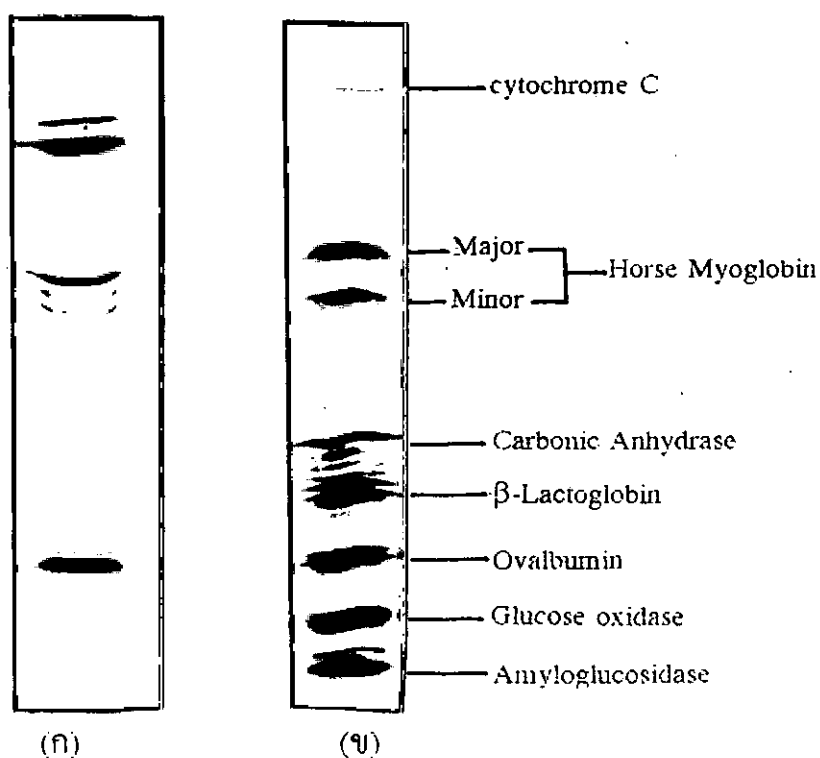
หลังจากที่ได้ agarose/DE แล้ว จึงทำการทดสอบในการ run ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าอากาโรสแม้จะมีความบริสุทธิ์มากเพียงใดก็ตาม ยังคงมีความไม่เหมาะสมกับการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เพราะสิ่งที่เกิดขึ้นในระหว่างการ run คือ มีการละลายของเนื้อเจลเป็นจำนวนมากทำให้โปรตีนถูกละลายไปพร้อมกัน

จากการศึกษาหาวิธีพัฒนาอากาโรสเพื่อให้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้งาน ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าจะต้องมีการเติมสารประเภท neutral polymer บางชนิด ที่ไม่มีประจุเพื่อเจือจางประจุที่มีให้น้อยลง เนื่องจากในการผลิตอากาโรสที่มีค่า อิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิสต่ำหรือมีค่าน้อยมากจนหาค่าไม่ได้ และนำมาทดสอบกับงาน คำนไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าไม่สามารถใช้งานได้ตามที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้น เป็นเพราะว่าในอากาโรสยังคงมีประจุเหลืออยู่บ้าง

ตัวอย่างของ neutral polymer บางชนิดที่ไม่มีประจุ เช่นกลุ่มของสารประเภทกัม เช่น locust bean gum หรือกัวกัม เป็นต้น นอกจากนี้ได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการนำกระบุก (konjac flour) มาผสมในอัตราส่วนของอากาโรสต่อกระบุกเท่ากับ 1:0.5 พบว่าสามารถลดค่า อิเล็กโทรเอ็นคอสโมซิส ลงได้จาก 0.14 เหลือเท่ากับ 0.01 (Supasiri, 1992) แต่เมื่อนำมาทดสอบกับงานคำนไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่าผล ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ

ดังนั้นจึงได้นำสาร neutral polymer อีกชนิดหนึ่งคือกัวกัมมาทำการศึกษา และทดลอง โดยจากการศึกษาในขั้นต้นของการนำกัวกัมมาผสมกับอากาโรส โดยใช้วิธีละลาย กัวกัมกับน้ำกลั่น ซึ่งพบว่ามีส่วนที่ไม่ละลายน้ำปนอยู่ด้วย ดังนั้นจึงตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ส่วนที่ไม่ละลายน้ำตกตะกอน จากนั้นจึงนำส่วนที่ละลายน้ำมาใช้ในขั้นตอนของการ

เตรียมเจลสำหรับทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยการนำมาละลายกับอากาโรส ซึ่งผลปรากฏว่า การเตรียมอากาโรสผสมกัวกัม วิธีนี้ยังไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เพราะไม่สามารถแยกโปรตีนมาตรฐานที่นำมาใช้ทดสอบได้ทุกตัว เนื่องจากในระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง พบว่ามีการละลายของเนื้อเจลตรงบริเวณขั้วลบ ซึ่งมีผลทำให้ทั้งแอมโฟไลต์ และสารโปรตีนมาตรฐานไหลออกไปจากเนื้อเจลด้วยกัน (ภาพประกอบ 42) ทั้งนี้อาจเนื่องจากกัวกัมที่ผสมลงในอากาโรสเจลบมีปริมาณน้อยเกินไป



ภาพประกอบ 42 แสดงแถบของสารโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยใช้ agarose/DE ละลายในสารละลายกัวกัม (ก) เปรียบเทียบกับแถบของสารโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโดยใช้ agarose/FMC (ข)

ต่อมาจึงได้ทำการศึกษาวิธีการเตรียมแก้วกัมเพื่อให้สามารถผสมใน อากาศได้มากขึ้น และเพื่อความสะดวกในการใช้งาน พบว่าควรเพิ่มอุณหภูมิในการ สกัดเอาส่วนที่ละลายน้ำได้ของแก้วกัมให้สูงขึ้น เพื่อจะได้ปริมาณแก้วกัมมากขึ้น จาก นั้นจึงนำส่วนที่ละลายน้ำซึ่งได้จากการกรองนำมาตกตะกอนใน isopropanol จากนั้นนำ ไปอบแห้งและบดเป็นผงละเอียด (Cook, 1981) ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงได้นำแก้วกัม ที่ได้จากวิธีเตรียมในข้อ 2 ของวิธีทดลองและนำมาผสมกับอากาศในอัตราส่วน ระหว่างอากาศกับแก้วกัม ดังนี้ 8:2, 7:3 และ 6:4 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)จากผลการ ทดลองพบว่าถ้านำแก้วกัมมาผสมในจำนวนที่น้อยเกินไปคืออัตราส่วน 8:2 สภาพความ เป็นเจลของอากาศถึงแม้จะมีค่าความแข็งของเจลที่สูง แต่เมื่อนำไปทำไอโซอิเล็ก- ทริกโฟกัสซิง ไม่สามารถแยกโปรตีนมาตรฐานได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีการละลายของ เนื้อเจลในขณะที่ทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงค่อนข้างมาก

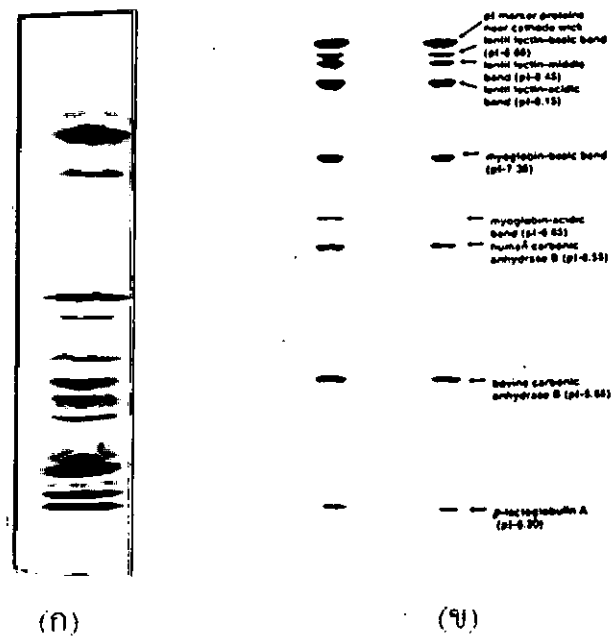
เมื่อผสมในอัตราส่วนที่มากเกินไป คือ 6:4 พบว่ายังคงมีการละลายของเนื้อ- เจลในระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงแต่มีปริมาณไม่มากนัก อีกทั้งจำนวน แถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกนี้มีครบทุกตัว เมื่อเทียบกับ โปรตีนมาตรฐานที่ปรากฏอยู่บนแผ่น Isogel/FMC ที่เป็นแผ่นเปรียบเทียบ แต่ระยะทาง ของโปรตีนมาตรฐานนี้เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วน 7:3 แล้ว โปรตีนที่อยู่บริเวณจัว ลบจะมีระยะทางของโปรตีนชิดกันมากเกินไป ในขณะที่โปรตีนที่อยู่บริเวณจัวบวกมี ระยะทางของโปรตีนห่างกันมากเกินไป ดังนั้น หากนำไปใช้ในการหา unknown ที่อยู่ ในช่วงที่เป็นค่า จะทำให้ยากแก่การแยกและตรวจดูแถบโปรตีนว่าจะตรงกับโปรตีน มาตรฐานตัวใด

สำหรับอัตราส่วน 7:3 สิ่งแรกที่จะสังเกตได้นั้นคือในระหว่างการทำไอโซ- อิเล็กทริกโฟกัสซิง การละลายของเนื้อเจลมีน้อยมากเมื่อเทียบกับอัตราส่วนของทั้งสอง ประการที่สองแถบของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงนี้เมื่อ เปรียบเทียบกับแผ่น Isogel/FMC จะพบว่าจำนวนแถบของโปรตีนมาตรฐานที่แยกได้มี จำนวนเท่ากัน แต่จะต่างกันก็คือระยะทางของโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งแผ่นเจลที่ผสมใน อัตราส่วน 7:3 ตรงบริเวณด้านจัวบวกตำแหน่งโปรตีนมาตรฐานจะมีระยะห่างจากกัน

มากกว่าโปรตีนบนแผ่น Isogel/FMC ส่วนบริเวณด้านข้างตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานจะมีระยะห่างจากกันน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแผ่น Isogel/FMC

เมื่อนำระยะทางที่ได้นี้ไป plot เป็นเส้นกราฟมาตรฐาน พบว่าเส้นที่ได้นั้นจะเป็นเส้นตรงเมื่อเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานของ Isogel/FMC จะต่างกันก็ตรงตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐานในแต่ละตัวตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งความแตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากกระแสไฟที่ใช้ในการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง และชนิดของอากาศโรสที่ใช้เป็นตัวกลางค้ำจุณ อีกทั้งชนิดของสารโพลีเมอร์ที่นำมาใช้ผสมก็จะมีผลทำให้คุณภาพ หรือชนิดของอากาศโรสที่ได้รับแตกต่างกันไปซึ่งส่งผลให้ลักษณะของแถบโปรตีนมาตรฐานบนตัวกลางค้ำจุณที่แตกต่างกันนี้ก็มีลักษณะที่แตกต่างกันไปเช่นกัน ดังนั้นผลการทดลองที่ได้นี้จึงสรุปได้ว่าการผสมกันระหว่างอากาศโรสกับกัวกัมในอัตราส่วน 7:3 น่าจะเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานทางด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง

นอกจากนี้ยังมีจุดที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งคือ หากนำอากาศโรสและใช้แอมโฟไลต์ที่ผลิตจากอีกบริษัทหนึ่งมาใช้ในการงานไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เช่นอากาศโรสจากบริษัท Pharmacia จะพบว่ารูปแบบของแถบโปรตีนมาตรฐานจะแตกต่างกันออกไป (ภาพประกอบ 43) ทั้งนี้เป็นเพราะว่าอากาศโรสที่ผลิตมานั้นมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน อีกทั้งระบบการผลิตอากาศโรสเพื่อนำมาใช้ในงานด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงก็ไม่เหมือนกัน และแอมโฟไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นก็แตกต่างกันไปตามแต่ละบริษัท



ภาพประกอบ 43 แสดงรูปแบบของสารโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยใช้ฮากาโรสและแอมโฟไลต์ของบริษัท Pharmacia (ก) เปรียบเทียบกับรูปแบบของสารโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โดยใช้ฮากาโรสและแอมโฟไลต์ของบริษัท FMC (ข)

การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาที่สำคัญเพราะทำให้ทราบถึงขั้นตอนที่ใช้ในการผลิตฮากาโรสและการทำฮากาโรสให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น นอกจากนี้การพยายามที่จะพัฒนาฮากาโรสเพื่อให้สามารถใช้งานทางไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงนั้นจะต้องผ่านการทดลองมาหลายขั้นตอน รวมทั้งการหาโพลีเมอร์ที่เหมาะสม การเตรียมโพลีเมอร์เพื่อนำมาใช้ในการผสม เพื่อให้ได้ฮากาโรสที่มีความเหมาะสมในการใช้งานทางด้านไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงเพราะงานทางด้านนี้สามารถนำไปใช้เป็นความรู้พื้นฐานทางด้านชีวเคมี นอกจากนี้งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำสาหร่ายทะเลซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศมาแปรรูปเพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้นตามที่หน่วยวิจัยไบโอโพลีเมอร์สามารถผลิตได้ในรูปของฮากาโรสผง

(Vorraruxeree, 1986, Supasiri, 1994)

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ธนิต ผิวนิม. “อิเล็กโทรโฟรีซิสและไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง,” ใน เอกสารประกอบ
การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องการแยกสารทางชีวเคมี. หน้า 65-84. กรุงเทพฯ :
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2528.
- ประมุข เพ็ญสุด. การศึกษาวันและองค์ประกอบอย่างอื่นในสาหร่ายทะเลสกุลกราซี-
ลาเรีย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525.
- วลัย วราโห. การสกัดวันจากสาหร่ายทะเลสกุลกราซีลาเรีย. วิทยานิพนธ์ วท.ม.
กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2525.
- สนม วันเพ็ญ. การศึกษาวิธีการรอร์สปอร์และวัสดุที่เหมาะสมในการเกาะ การงอก
และการเจริญเติบโตของสปอร์ในสาหร่ายสกุลกราซีลาเรีย. วิทยานิพนธ์
กศ.ม. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร, 2530.
- Andrew, A.T. “Isoelectric focusing,” *Electrophoresis*. New York : Oxford
University Press , 1986.
- AOAC Official Method of Analysis of Official Agricultural Chemists.
Washington,D.C. , 1984.
- 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 ;
1937.
- Bio-Rad's Model 111 IEF Cell Instruction manual. Bio-Rad Laboratories,
Richmond, CA ; 1990.
- Bird,C.J. and J. Mclachlan. “The Effect of Salinity on Distribution of Species of
Gracilaria Grev. (Rhodophyta, Gigartinales) : An Experimental Assessment,”
Botanica Marina. 29 : 231-238 ; 1986.
- Bird,K.T., M. Strumski and J.H. Ryther. “Environmental Factors Affecting the
Quality of Agar from *Gracilaria verrucosa*, HBOI Strain G-16,” in Abstracts
of XIII th International Seaweed Symposium. Vancouver : A-58 ; 1989.

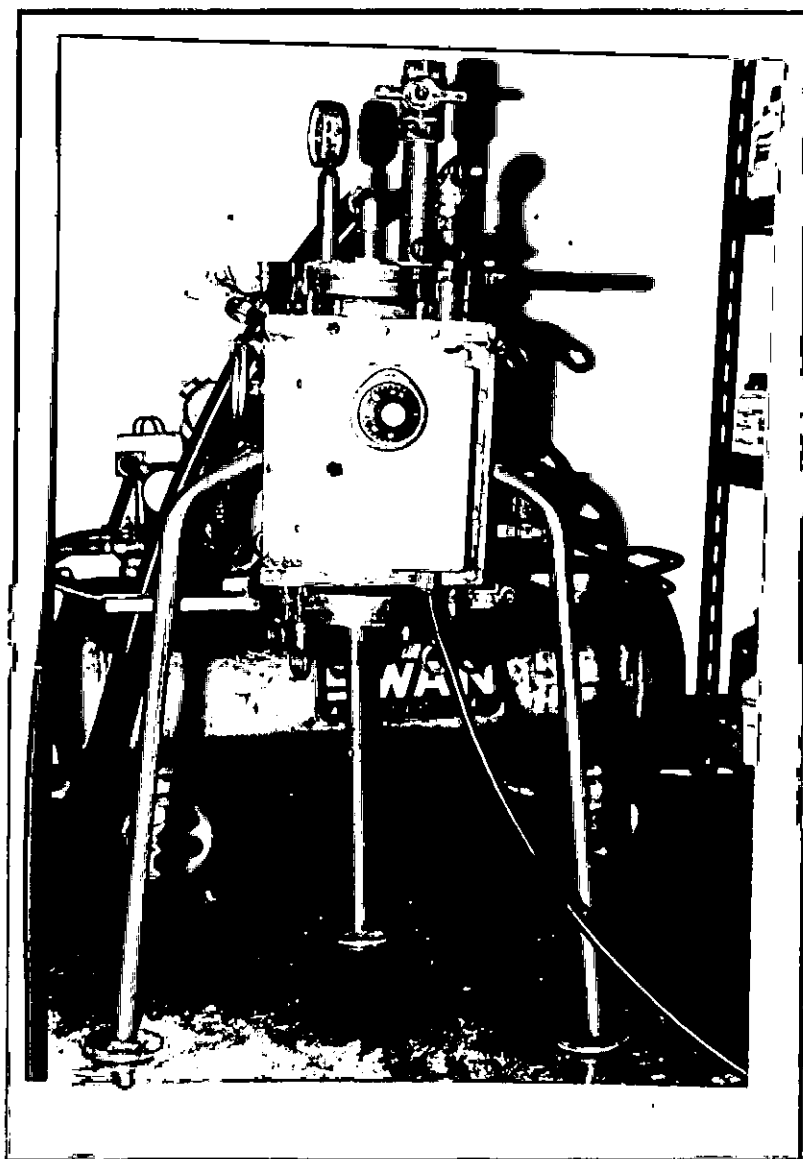
- Bogorad, L. "Chlorophylls," Physiology and Biochemistry of Algae, 385-404 ;1962.
- Boyer, R.F. "Isoelectric focusing of Proteins," Modern Experimental Biochemistry.
California ; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1993.
- Brishammar, S. and others. "Immunological Precipitates in agarose gels," Biochimica et Biophysica Acta. 53 : 518-521 ; 1961.
- Cook, R.B. and H.J. Witt. "Agarose Composition, Aqueous Gel and Method of Making Same," U.S. Patent 4,290,911 ; 1981.
- Cooper, T.G. "Gel Permeation Chromatography," The tools of Biochemistry. USA ; John Wiley & Sons Ltd., 1977.
- Dea, Iain C.M. and A. Morrison. "Chemistry and interactions of seed galactomannans," Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.
Edited. R.S. Tipson and D. Horton, New York ; Academic Press, Inc., 1975.
- Dea, Iain C.M. and A. Morrison. "Conformational Origins," Industrial Gums Polysaccharides and Their Derivatives. Edited. Roy L. Whistler and James N. BeMiller, California ; Academic Press, Inc., 1993.
- Duckworth, M., K.C. Hong. and W. Yaphe. "The Agar Polysaccharides of Gracilaria species," Carbohydrate Research. 18 : 1-9 ; 1971.
- Duckworth, M. and W. Yaphe. "Preparation of Agarose by Fractionation from the Spectrum of Polysaccharides in Agar," Analytical Biochemistry. 44 : 636-641 ;1971.
- Finlayson, G.R. "Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel and It's Preparative Application," Analytical Biochemistry. 40 : 292-311 ; 1971.
- Grubb, A. "Preparation of Electroendosmosis-Free Agarose Gel and Exemplification of Its Use in Crossed Immunoelectrophoresis," Analytical Biochemistry. 35 : 582-592 ; 1973.
- Guisseley, K.B. and D.W. Renn. "Agarose," Marine Colloids. FMC Corporation. : 1-34 ; 1975.

- Hjerten,S. "Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis," Biochim. Biophys. Acta. 53 : 514-517 ; 1961.
- Hjerten,S. "A New Method for Preparation of Agarose for Gel Electrophoresis," Biochimica et Biophysica Acta. 62(3) : 445-449 ; 1962.
- Hjerten,S. "Some New Method for the Preparation of Agarose," Journal of Chromatography. 61 : 73-80 ; 1971.
- "Isoelectric Focusing Principle and Methods," Pharmacia Fine Chemicals. Sweden : Ljungforetagen AB ; 1982.
- Imeson,A. "Seed gums" Thickening and Gelling Agents for Food. London : Blackie Academic & Professional. 1992.
- Johanşson,B.G. and S. Hjerten. "Electrophoresis, Crossed Immunoelectrophoresis and Isoelectricfocusing in Agarose gels with Reduced Electroendosmotic flow," Analytical Biochemistry. 59 : 200-213 ; 1974.
- Laas,T. "Isoelectric focusing in Gel," Protein purification. Edited J.C. Janson and L. Ryden, New York ; VCH Publishers ; 1989.
- Lee,R.E. Phycology. London : Cambridge University Press ; 1980.
- Leung,A.Y. and S. Foster. Encyclopedia of common Natural Ingredients used in food, drugs and cosmetics. 2nd ed. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- Lewmanomont,K. "distribution of some algae in Thailand," Paper Presented at the Second International Symposium on Marine Biogeography and Evolution in the Pacific, Sydney, Australia ; 1982.
- Mac Gregor,E.A. and C.T. Greenwood. Polymers in Nature. USA : John Wiley & Son Ltd. ; 1980.
- Marine Colloid MCD Gel Tester's manual. Marine Colloid Division, Rockland, Maine ; 1979.
- Meer,W. "Agar" Handbook of Water soluble Gums and resins. Edited. RL Davidson, New York ; Mc Graw Hill ; 1980.

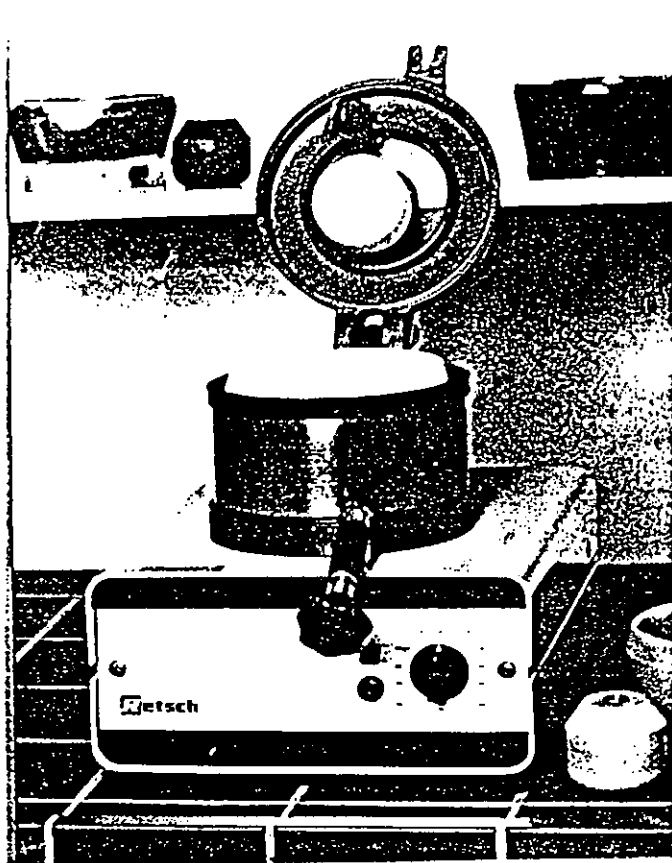
- Patwary,M.U. and J.P. Van der meer. "Improvement of Gracilaria tikvahiae (Rhodophyceae) by Genetic Modification of Thallus Morphology," Aquaculture. 33 : 207-214 ; 1983.
- Percival,E. and H.R. Mc Dowell. "Galactans of the Rhodophyceae," Chemistry and Enzymology of Marine algal Polysaccharides. New York : Academic press Inc., 1967.
- Prasad,P.V.D. "A Seasonal Study of the Red Seaweeds Solieria tenera and Three Species of Gracilaria from Jamaica," Hydrobiologia. 140 : 167-171 ; 1986.
- Quast,R. "The Electroosmotic flow in Agarose gels and The value of agarose as stabilizing agent in Gel Electrofocusing," Journal of Chromatography. 54 : 405-412 ; 1971.
- Radmer,R.J. "Algal Diversity and Commercial Algal Products," Bioscience. 46 : 263-270 ; 1996.
- Rajadurai,N.R. "Carrageenan--multipurpose gum from the sea," INFOFISH. 5 : 18-22 ; 1990.
- Renn,D.W. "Algal Polysaccharides and Their Application in Biotechnology, Food and Other Items of Commerce." Summary Report : Workshop on From Seaweed to Biotechnology. Bangkok, Thailand. 1-9 ; 1989.
- Righetti,P.G., E. Gianazza. and K. Ek. "New Developments in isoelectric focusing," Journal of Chromatography. 184 : 415-456 ; 1980.
- Russell,B. T.H. Mead. and A. Ploson. "A Method of Preparation Agarose," Biochimica et Biophysica Acta. 86(1) : 169-174 ; 1964.
- Santelices,B. and M.S. Doty. "A Review of Gracilaria Farming," Aquaculture. 78 : 95-133 ; 1989.
- Supasiri,T. and others. "Value added products derived from Seaweed Processing." Paper Report : Workshop on Value added products derived from Seaweed Processing. Bangkok : Thailand ; 1990.

- Supasiri,T. and others. "The possibility of Konjac flour in lowering the Electroendosmosis of agarose." Paper Presented at the eighteenth Congress on Science and Technology of Thailand. Bangkok : Thailand ; 1992.
- Taylor,W.R. Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the America. Michigan : The University of Michigan Press ; 1979.
- Thach,R.E. and M.R. Newburger. "DEAE cellulose Chromatography," Research Technique in Biochemistry and Molecular Biology. Philippines : W.A. Benjamin, Inc., 1972.
- The Agarose Monograph. 4th ed. Rockland, Maine : FMC Corporation, 1988.
- Vorraruxeree,P. and others. "The suitable conditions for extraction of the agar from Gracilaria spp. from the east coast of Thailand," Proceeding Conference Science and Technology in Thailand. 12 : 434-435 ; 1986.
- Wieme,R.J. Agar gel electrophoresis. Amsterdam : Elsevier Biomedical Press ; 1965.
- Yaphe,W. and H.W. Duckworth. "the relationship between structure and biological properties of agar," Proceeding at the Seventh International Symposium. : 5-22 ; 1971.
- Zabin,B.A. "Method of Making Agarose," U.S. Patent 3,423,396 ; 1969.

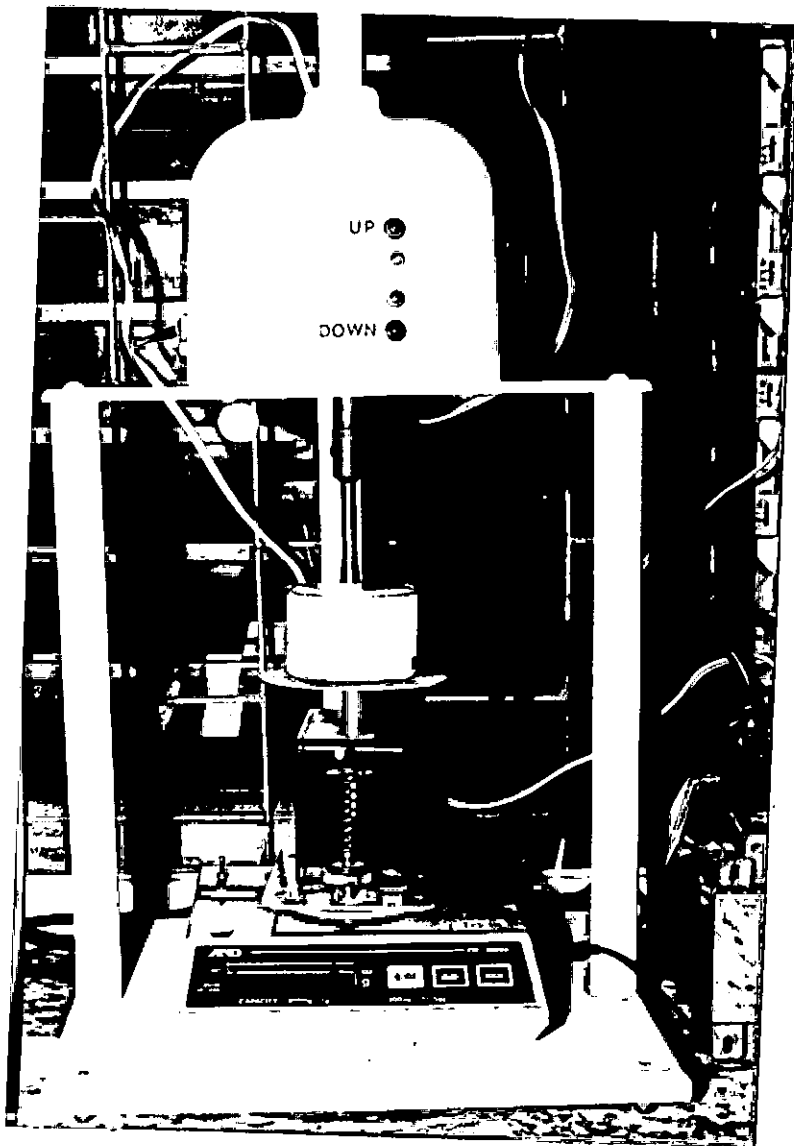
ภาคผนวก



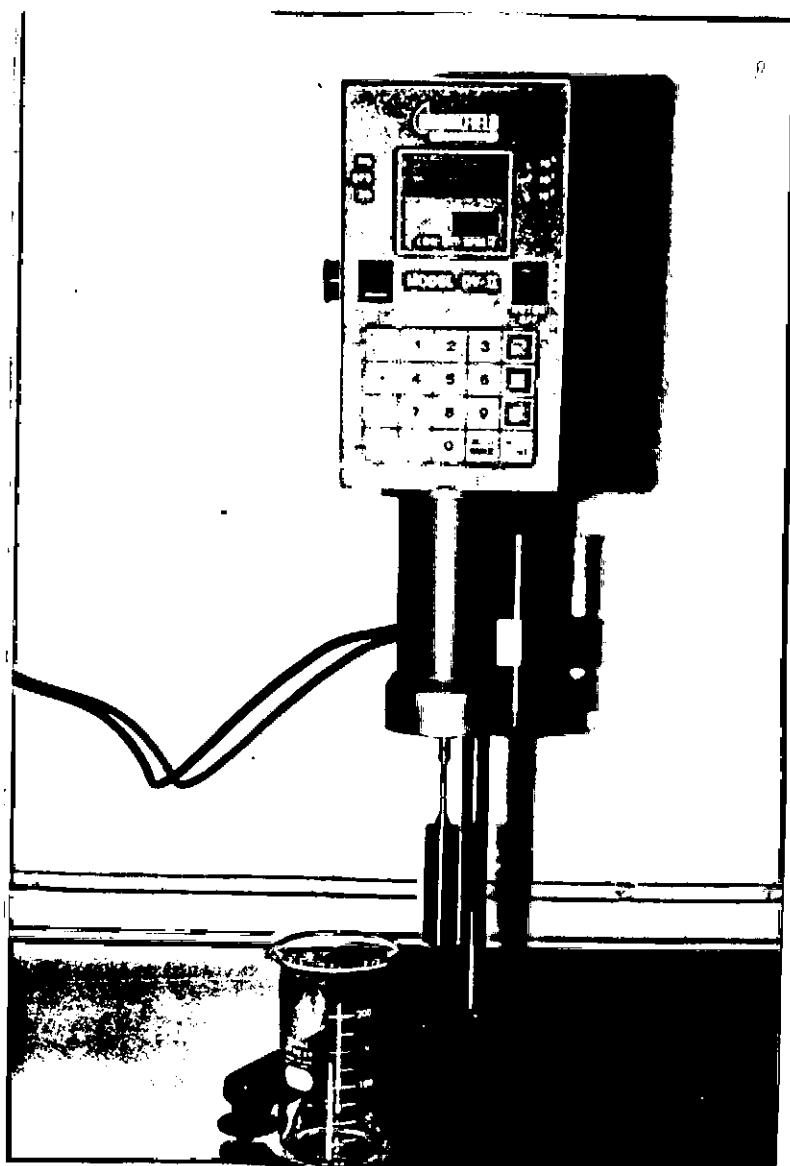
ภาพประกอบ 44 เครื่องกรองภายใต้ความดัน



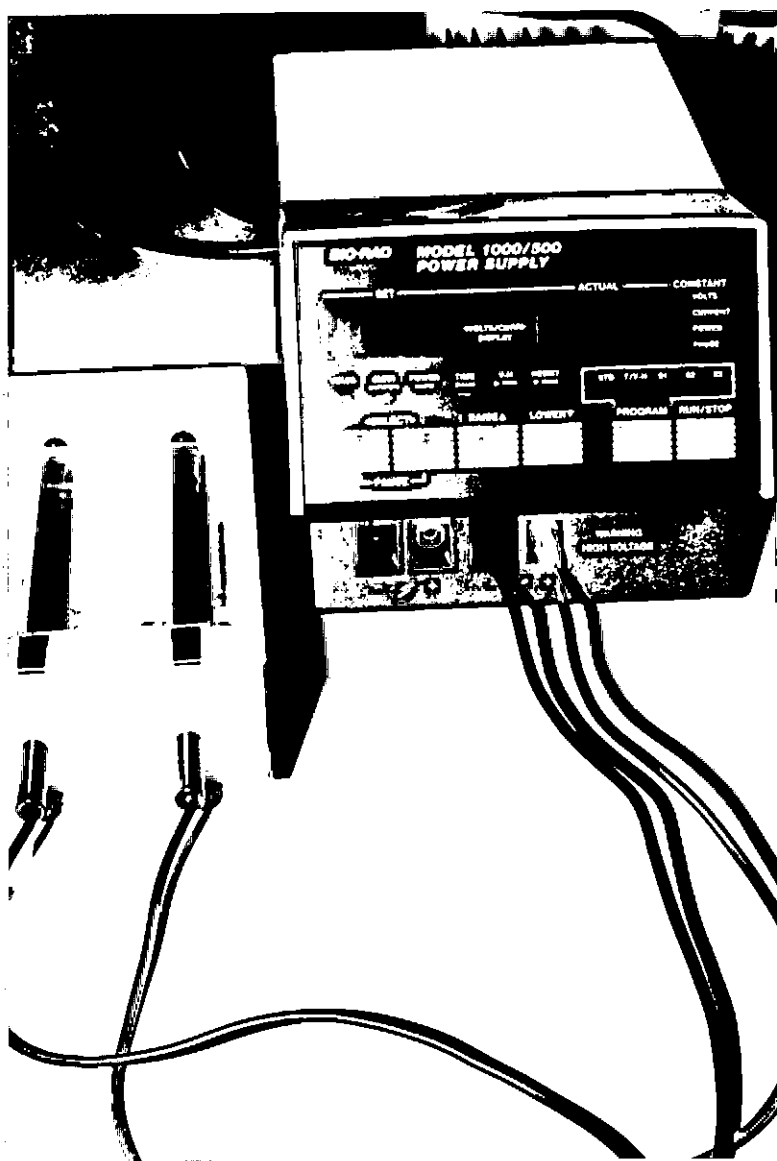
ภาพประกอบ 45 เครื่องบดละเอียด (Mortar Grinder)



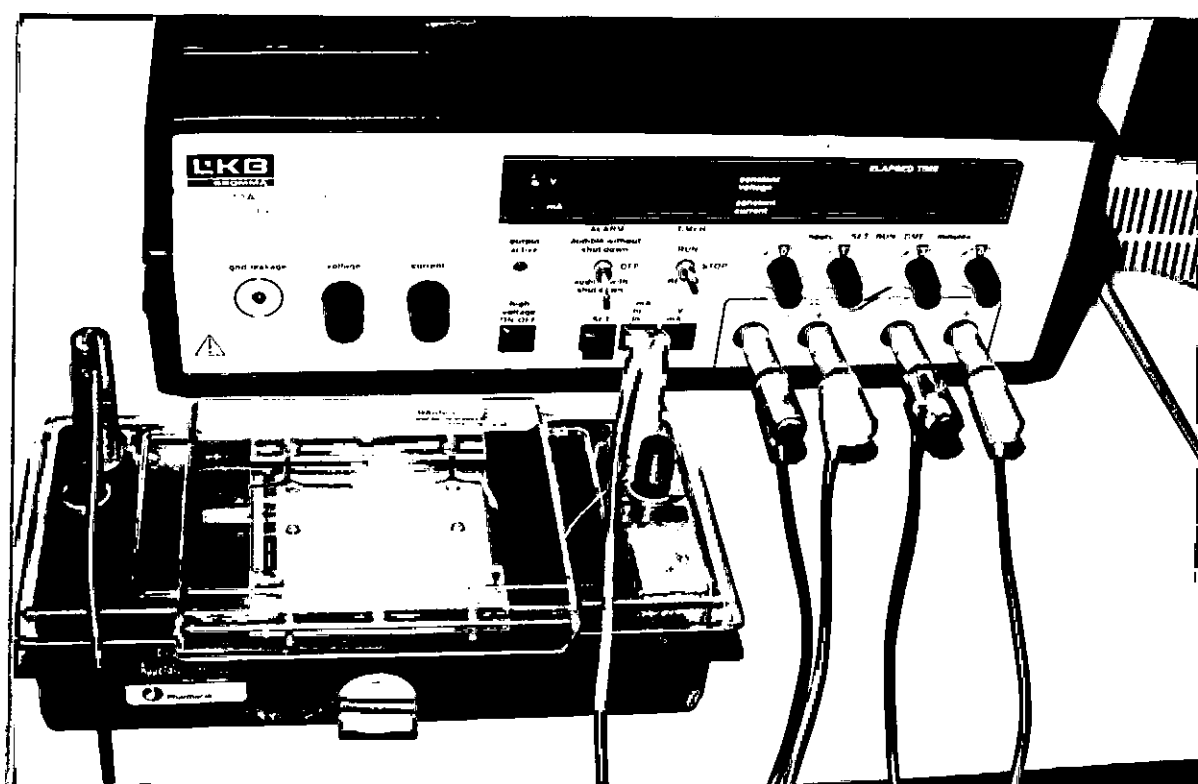
ภาพประกอบ 46 เครื่องวัดความแข็งของเจลของ Marine Colloids



ภาพประกอบ 47 เครื่องวัดความหนืดของ Brookfield



ภาพประกอบ 48 เครื่องไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงแอมเบอร์ของ Bio-Rad



ภาพประกอบ 49 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสแอมเบอร์ของ Pharmacia ใช้ในการหาอิเล็กโตรเอนคอสโมซิส

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ นางสาวพานิ ชื่อสกุล จักรแสงชัยโชติ

เกิดวันที่ 24 มกราคม

พุทธศักราช

สถานที่เกิด

อำเภอป้อมปราบ จังหวัดกรุงเทพมหานคร

สถานที่อยู่ปัจจุบัน

บ้านเลขที่ 85-87 ถนนราชวงศ์ เขตสัมพันธวงศ์

กรุงเทพฯ 10100

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2527

ประกาศนียบัตรวิชาชีพ จากโรงเรียนปัญญาพานิชย์

พ.ศ. 2532

วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง

พ.ศ. 2539

วท.ม. (เคมีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประสานมิตร