



## ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตรการประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง องค์ประกอบ และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสาร โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่าย  
สีน้ำตาลบางชนิด

Components and Antimicrobial of Polysaccharide Extracted from Some Species of  
Brown Seaweeds

นามผู้วิจัย นายอรรถชัย กันทะชุมภู

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

( รองศาสตราจารย์อนงค์ จีรภัทร์, Ph.D. )

กรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D. )

กรรมการ

( รองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, M.Sc. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

องค์ประกอบ และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก  
สาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิด

Components and Antimicrobial of Polysaccharide Extracted from  
Some Species of Brown Seaweeds

โดย

นายอรรถชัย คั่นระชุมภู

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2551

อรรถชัย คันธะขุมภู 2551: องค์ประกอบ และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก  
สาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขา  
วิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง ภาควิชาการประมงที่ปรึกษา:  
รองศาสตราจารย์อรรถชัย จีระภัทร์, Ph.D. 84 หน้า

สาหร่ายทะเลสีน้ำตาล 7 ชนิด ได้แก่ *Colpomenia sinuosa* (CS), *Dictyota dichotoma* (DD), *Hydroclathrus clathratus* (HC), *Padina australis* (PA), *Padina minor* (PM), *Sargassum polycystum* (SP) และ *Turbinaria conoides* (TC) เก็บรวบรวมจากจังหวัดชลบุรี (01) ชุมพร (02) และระยอง (03) และตัวอย่างสาหร่ายแห้งนำมาสกัดสารโพลีแซคคาไรด์ โดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100°C (E1) และในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2 mol/L ที่อุณหภูมิ 75°C (E2) สารสกัดหยาบที่ได้นำมาตรวจวัดปริมาณ (yield) และวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปริมาณซัลเฟตและองค์ประกอบน้ำตาล สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 มีปริมาณสูงสุด  $1.97 \pm 1.15\%$  (w/w) ในตัวอย่างชนิด SP03 สารสกัดที่ได้จากวิธี E1 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ  $55.95 \pm 0.72\%$  และ  $51.94 \pm 0.08\%$  ซึ่งค่อนข้างสูงและได้จากตัวอย่างชนิด PM02 และ PA03 ตามลำดับ และสารสกัดจากวิธี E1 ยังให้ปริมาณซัลเฟตมากที่สุด  $18.10 \pm 0.25\%$  (w/w) ในตัวอย่างสาหร่ายชนิด HC01 ในทางตรงข้าม การสกัดด้วยวิธี E2 ให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด  $19.69 \pm 0.23\%$  (w/w) ในตัวอย่างสาหร่ายชนิด HC01 ในขณะที่คาร์โบไฮเดรตมีค่าสูงสุดในตัวอย่างชนิด PM02 ( $44.41 \pm 0.94\%$  w/w) โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E2 ให้ปริมาณซัลเฟตมีค่าสูงถึง  $14.22 \pm 0.69\%$  ในตัวอย่างชนิด CS01 และ  $13.82 \pm 0.18\%$  ในตัวอย่างชนิด HC01 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและซัลเฟตในสารสกัดหยาบมีค่าแปรผันขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้สกัดและชนิดของสาหร่าย

ในการศึกษานี้ องค์ประกอบน้ำตาลในสารสกัดหยาบ E1 และ E2 ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC โดยใช้น้ำตาลมาตรฐาน กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส กาแลกโตส และแมนโนส ผลการวิเคราะห์พบว่าฟรุคโตสเป็นองค์ประกอบน้ำตาลหลักในทุกตัวอย่าง ซึ่งให้ปริมาณสูงสุด 12.35% ในสาหร่ายชนิด HC01 นอกจากนี้ ยังพบแมนโนสในตัวอย่างชนิด CS01, PA03, PM02, SP01 และ SP03 แต่ไม่พบในตัวอย่างชนิด DD02, HC01, PA01, PA02 และ TC02 อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดที่ตรวจพบมีค่าค่อนข้างต่ำในตัวอย่างสาหร่ายทุกชนิด สารสกัดหยาบทั้งจากวิธี E1 และ E2 นำมาตรวจวิเคราะห์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้แบคทีเรียแกรมบวก 2 ชนิด แกรมลบ 5 ชนิด เชื้อรา 1 ชนิด และเชื้อยีสต์ 1 ชนิด และพบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด 2 mg/ml สารสกัด E1 จากสาหร่ายชนิด SP01 ( $E1 = 0.122 \pm 0.004$  mm,  $E2 = 0.123 \pm 0.003$  mm) และ E2 จากสาหร่ายชนิด CS01 ( $0.156 \pm 0.035$  mm) สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้เพียงชนิดเดียว ในทางกลับกันสารสกัด E1 และ E2 จากตัวอย่างสาหร่ายเกือบทุกชนิด นอกจากไม่แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบแล้ว ส่วนใหญ่ยังทำให้มีการเจริญของเชื้อที่ทดสอบ โดยเฉพาะในสารสกัดที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย

Attachai Kantachumpoo 2008: Components and Antimicrobial of Polysaccharide Extracted from some Species of Brown Seaweeds. Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Anong Chirapart, Ph.D. 84 pages.

Seven species of brown marine algae, *Colpomenia sinuosa* (CS), *Hydroclathrus clathratus* (HC), *Dictyota dichotoma* (DD), *Padina australis* (PA), *Padina minor* (PM), *Sargassum polycystum* (SP) and *Turbinaria conoides* (TC), were gathered from Chonburi (01), Chumporn (02) and Rayong (03) provinces. Crude polysaccharides of the dried seaweeds were extracted by boiling in hot water at 100 °C (E1) and in HCl 2 mol/L at 75 °C (E2). Yield, total carbohydrate, sulfate content, and sugar components of the E1 and E2 extracts were determined. The crude polysaccharides extracted with E1 had a maximum yield of  $1.97 \pm 1.15\%$  (w/w) obtained from the sample of SP03. The E1 extracts had rather high content of carbohydrate of  $55.95 \pm 0.72\%$  and  $51.94 \pm 0.08\%$  that obtained from the PM02 and PA03 plants, respectively. The maximum sulfate content was  $18.10 \pm 0.25\%$  (w/w) obtained from HC01 plant. In contrast, the E2 extraction gave a maximum yield of  $19.69 \pm 0.23\%$  (w/w) in the sample of HC01 while total carbohydrate was the highest in the PM02 species ( $44.41 \pm 0.94\%$  w/w). Highly sulfate contents were obtained from the E2 extracts of  $14.22 \pm 0.69\%$  in plant of CS01 and  $13.82 \pm 0.18\%$  in plant of HC01. The contents of carbohydrate and sulfate in the crude extracts were varied depend on the extraction method and algal species.

In this study, the techniques TLC and HPLC were used for analysis of sugar composition of the E1 and E2 crude extracts using glucose, fructose, fucose, galactose and mannose as standard. The results showed fucose as a main component in all extracts which the highest value of 12.35% obtained from the species of HC01. Beside, mannose was observed in the samples of CS01, PA03, PM02, SP01 and SP03, but not in the DD02, HC01, PA01 PA02 and TC02. However, each sugar rather low amounts were detected in all algal species. Both the E1 and E2 crude extracts were assayed for antimicrobial activity as well. Two species of gram positive and five species of gram negative bacteria, one species of fungi and one species of yeast, were used as references. The assay at concentration of 2 mg/ml showed the crude extract of SP01 species that only had the activity against *Candida albicans* (E1 =  $0.122 \pm 0.004$  mm, E2 =  $0.123 \pm 0.003$  mm) as well as the E2 of CS01 ( $0.156 \pm 0.035$  mm). In contrary, most of the E1 and E2 extracts had not only inactivity against the tested microbial but also they caused the microbial growth particularly in the extracts that had mannose.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์อนงค์ จีรภัทร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์ กรรมการวิชาการ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ แก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ท่านศาสตราจารย์กาญจนาภรณ์ ลีวโนมนต์ และ คุณธิดารัตน์ น้อยรักษา ที่ให้คำปรึกษาในการจำแนกชนิดของสาหร่าย ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT\_T 650005 ที่ช่วยสนับสนุนให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา คุณแสงวัน ใจมูล คุณประภาพร คำมามูล และครอบครัว ที่ให้การส่งเสริม สนับสนุนด้านการศึกษา ทั้งทางด้านทุนทรัพย์และคอยให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ คุณจันทนา ไพรบูรณ์ ที่ให้คำแนะนำทางด้านเทคนิคต่างๆ ในการทำงานวิจัยชิ้นนี้ และขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายและพรรณไม้น้ำที่ช่วยเป็นกำลังใจให้การทำงานผ่านไปด้วยดี

อรรธชัย กันทะชุมภู

สิงหาคม 2551

## สารบัญ

### หน้า

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| สารบัญ                                                          | (1) |
| สารบัญตาราง                                                     | (2) |
| สารบัญภาพ                                                       | (5) |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ                                       | (9) |
| คำนำ                                                            | 1   |
| วัตถุประสงค์                                                    | 3   |
| การตรวจเอกสาร                                                   | 4   |
| อุปกรณ์และวิธีการ                                               | 12  |
| อุปกรณ์                                                         | 12  |
| วิธีการทดลอง                                                    | 15  |
| ผลและวิจารณ์                                                    | 20  |
| ผลการทดลอง                                                      | 20  |
| วิจารณ์ผลการทดลอง                                               | 45  |
| สรุปและข้อเสนอแนะ                                               | 52  |
| สรุป                                                            | 52  |
| ข้อเสนอแนะ                                                      | 53  |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง                                            | 54  |
| ภาคผนวก                                                         | 61  |
| ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ | 62  |
| ภาคผนวก ข ข้อมูลการทดลองของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์             | 67  |
| ภาคผนวก ค กราฟโครมาโตแกรมน้ำตาลมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC | 70  |
| ภาคผนวก ง ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ                                | 76  |
| ประวัติการศึกษา และการทำงาน                                     | 84  |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                         | หน้า |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | ค่า Rf ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E1 โดยใช้เทคนิค TLC      | 26   |
| 2        | ค่า Rf ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E2 โดยใช้เทคนิค TLC      | 27   |
| 3        | ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E1 และตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC | 28   |
| 4        | ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E2 และตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC | 34   |
| 5        | ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1                       | 42   |
| 6        | ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2                       | 43   |

## ตารางผนวกที่

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ข1 | <p>ปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2)</p> <p>CS = <i>C. sinuosa</i>, DD = <i>D. dichotoma</i>, HC = <i>H. clathratus</i>, SP = <i>S. polycystum</i>, PA = <i>P. australis</i>, PM = <i>P. minor</i>, TC = <i>T. conoides</i>, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร และ 03 = ระยอง</p> | 68 |
| ข2 | <p>ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2) CS = <i>C. sinuosa</i>, DD = <i>D. dichotoma</i>, HC = <i>H. clathratus</i>, SP = <i>S. polycystum</i>, PA = <i>P. australis</i>, PM = <i>P. minor</i>, TC = <i>T. conoides</i>, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร และ 03 = ระยอง</p>                          | 68 |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ | หน้า                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ข3           | ปริมาณซัลเฟตจากการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2) CS = <i>C. sinuosa</i> , DD = <i>D. dichotoma</i> , HC = <i>H. clathratus</i> , SP = <i>S. polycystum</i> , PA = <i>P. australis</i> , PM = <i>P. minor</i> , TC = <i>T. conoides</i> , 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร และ 03 = ระยอง 69 |
| ข4           | ผลการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ <i>Candida albicans</i> จากสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2) CS = <i>C. sinuosa</i> , SP = <i>S. polycystum</i> และ 01 = ชลบุรี 69                                                                                                                |
| ง1           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E1 77                                                                                                                                                                                                                                        |
| ง2           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E2 77                                                                                                                                                                                                                                        |
| ง3           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ระหว่างวิธีสกัดด้วยวิธี E1 และ E2 77                                                                                                                                                                                                                                                   |
| ง4           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1 78                                                                                                                                                                                                                           |
| ง5           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2 78                                                                                                                                                                                                                           |
| ง6           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1 78                                                                                                                                                                                                                        |
| ง7           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2 79                                                                                                                                                                                                                        |
| ง8           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E1 79                                                                                                                                                                                                                                                    |



### สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ |                                                                                                          | หน้า |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ง9           | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E2                     | 79   |
| ง10          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตระหว่างวิธีการสกัดสกัดด้วยวิธี E1 และ E2                         | 80   |
| ง11          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1        | 80   |
| ง12          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2        | 80   |
| ง13          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตระหว่างสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1 | 81   |
| ง14          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2     | 81   |
| ง15          | ค่าทางสถิติระหว่างปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E1                                      | 81   |
| ง16          | ค่าสถิติระหว่างปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E2                                         | 81   |
| ง17          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตระหว่างวิธีสกัดด้วยวิธี E1 และ E2                                      | 82   |
| ง18          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1              | 82   |
| ง19          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2              | 82   |
| ง20          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1           | 82   |
| ง21          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2           | 83   |
| ง22          | ค่าทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์                                          | 83   |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | หน้า |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษา (1) <i>Colpomenia sinuosa</i> (Roth) Derb. et Sol., (2) <i>Dictyota dichotoma</i> (Huds.) Lamx., (3) <i>Hydroclathrus clathratus</i> (C.Agardh) Howe, (4) <i>Padina australis</i> Hauck, (5) <i>Padina minor</i> Yamada, (6) <i>Sargassum polycystum</i> C. Agardh, (7) <i>Turbinaria conoides</i> (J. Agardh) Kützing | 9    |
| 2      | อุปกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด โพลีแซคคาไรด์                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 19   |
| 3      | ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดจากสาหร่ายทะเล โดยวิธี E1 และ E2; CS = <i>C. sinuosa</i> , DD = <i>D. dichotoma</i> , HC = <i>H. clathratus</i> , SP = <i>S. polycystum</i> , PA = <i>P. australis</i> , PM = <i>P. minor</i> , TC = <i>T. conoides</i> , 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร, 03 = ระยอง และ verticel bar = standard deviation                                           | 21   |
| 4      | ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายทะเล; CS = <i>C. sinuosa</i> , DD = <i>D. dichotoma</i> , HC = <i>H. clathratus</i> , SP = <i>S. polycystum</i> , PA = <i>P. australis</i> , PM = <i>P. minor</i> , TC = <i>T. conoides</i> , 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร, 03 = ระยอง และ verticel bar = standard deviation                                                                   | 23   |
| 5      | ปริมาณซัลเฟตจากสาหร่ายทะเล; CS = <i>C. sinuosa</i> , DD = <i>D. dichotoma</i> , HC = <i>H. clathratus</i> , SP = <i>S. polycystum</i> , PA = <i>P. australis</i> , PM = <i>P. minor</i> , TC = <i>T. conoides</i> , 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร, 03 = ระยอง และ verticel bar = standard deviation                                                                         | 24   |
| 6      | ชนิดของน้ำตาลในโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 และ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด คือ Glu, Ga, Ma, Fru และ Fu                                                                                                                                                                                                             | 25   |
| 7      | ชนิดของน้ำตาลในโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 และ ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด คือ Glu, Ga, Ma, Fru และ Fu                                                                                                                                                                                                             | 26   |

### สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                         | หน้า |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 8      | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1;<br>CS01 = <i>C. sinuosa</i> (ชลบุรี) และ DD02 = <i>D. dichotoma</i> (ชุมพร)       | 29   |
| 9      | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1;<br>HC01 = <i>H. clathratus</i> (ชลบุรี) และ PA01 = <i>P. australis</i> (ชลบุรี)   | 30   |
| 10     | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1; PA02 = <i>P. australis</i> (ชุมพร) และ PA03 = <i>P. australis</i> (ระยอง)         | 31   |
| 11     | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย เทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1;<br>PM02 = <i>P. minor</i> (ชุมพร) และ SP01 = <i>S. polycystum</i> (ชลบุรี)       | 32   |
| 12     | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1;<br>SP03 = <i>S. polycystum</i> (ระยอง) และ TC02 = <i>T. conoides</i> (ชุมพร)      | 33   |
| 13     | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2;<br>CS01 = <i>C. sinuosa</i> (ชลบุรี) และ DD02 = <i>D. dichotoma</i> (ชุมพร)     | 35   |
| 14     | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2;<br>HC01 = <i>H. clathratus</i> (ชลบุรี) และ PA01 = <i>P. australis</i> (ชลบุรี) | 36   |
| 15     | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2;<br>PA02 = <i>P. australis</i> (ชุมพร) และ PA03 = <i>P. australis</i> (ระยอง)    | 37   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | หน้า |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 16         | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2;<br>PM02 = <i>P. minor</i> (ชุมพร) และ SP01 = <i>S. polycystum</i> (ชลบุรี)                                                                                                                                                                           | 38   |
| 17         | กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2;<br>SP03 = <i>S. polycystum</i> (ระยอง) และ TC02 = <i>T. conoides</i> (ชุมพร)                                                                                                                                                                         | 39   |
| 18         | ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลที่ศึกษา                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 40   |
| 19         | การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดปกคลุมทั่วบริเวณรอบแผ่นทดสอบของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายที่ศึกษา                                                                                                                                                                                                                                                                  | 41   |
| 20         | ผลการยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด SP01 ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 และ E2 ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml (1 = ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของสารที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1, 2 = ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของสารที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2, 3 = ลักษณะโซนใสแสดงการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ) | 44   |
| <br>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |
| ภาพผนวกที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |      |
| ก1         | กราฟมาตรฐานปริมาณโปตัสเซียมซัลเฟต                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 64   |
| ก2         | กราฟมาตรฐานปริมาณคาร์โบไฮเดรต                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 66   |
| ค1         | กราฟโครมาโตแกรมแสดงน้ำตาลมาตรฐานฟูโคส และฟรุคโตส                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 71   |
| ค2         | กราฟโครมาโตแกรมแสดงน้ำตาลมาตรฐานแมนโนส และกลูโคส                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 72   |
| ค3         | กราฟโครมาโตแกรมแสดงน้ำตาลมาตรฐานกาแลคโตส                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 72   |
| ค4         | กราฟโครมาโตแกรมน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด; S1 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 2 mg/ml และ S2 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 1 mg/ml                                                                                                                                                                                                                                                        | 73   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพผนวกที่                                                                                                                        | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ก5      กราฟโครมาโตแกรมน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด; S3 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 mg/ml และ S4 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 mg/ml | 74   |
| ก6      กราฟโครมาโตแกรมน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 mg/ml (S5)                                                        | 75   |

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

E1 = การสกัดด้วยน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 100°C

E2 = การสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75°C

CS = *Colpomenia sinuosa* (Roth) Derb. et Sol.

DD = *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamx.

HC = *Hydroclathrus clathratus* (C.Agardh) Howe

PA = *Padina australis* Hauck

PM = *Padina minor* Yamada

SP = *Sargassum polycystum* C. Agardh

TC = *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützing

01 = จังหวัดชลบุรี

02 = จังหวัดชุมพร

03 = จังหวัดระยอง

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

Fru = Fructose

Fu = Fucose

Ga = Galactose

Glu = Glucose

Ma = Mannose

## องค์ประกอบ และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก สาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิด

### Components and Antimicrobial of Polysaccharide Extracted from Some Species of Brown Seaweeds

#### คำนำ

สาหร่ายเป็นพืชชั้นต่ำที่มีคลอโรฟิลล์ มีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็ก ไปจนถึงขนาดใหญ่ มีลักษณะที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือมีเซลล์หลายเซลล์ พบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ซึ่งมนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลานานกว่า 4,000 ปีมาแล้ว โดยเฉพาะชาวจีนที่นำมาบริโภค นำมารักษาโรคต่างๆ และมีหลายประเทศนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์จนมีการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม เช่น การผลิตคาร์ราจีแนน แอลจิเนต และวุ้น เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการเกษตรใช้ทำปุ๋ย เช่น สาหร่ายสีน้ำตาลซึ่งมีปริมาณของโพแทสเซียมสูงจึงนำมาใช้ในการทำปุ๋ยทางการเกษตรได้ดี (อักษร, 2529) หรือนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ นอกจากนี้ สาหร่ายยังนำมาทำเป็นยารักษาโรคได้อีกด้วย

สาหร่ายที่นิยมนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะเป็นสาหร่ายทะเลซึ่งนำมาใช้สกัดสารโพลีแซคคาไรด์ และในจำนวนนี้สาหร่ายสีน้ำตาล (Division Phaeophyta) จัดเป็นสาหร่ายทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากมีปริมาณที่มาก สามารถพบได้ทั่วไปตั้งแต่เขตร้อนจนถึงเขตอบอุ่น โดยนำมาใช้สกัดสารโพลีแซคคาไรด์ที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ แอลจิเนต (alginate) ลามินาแรน (laminaran) และ ฟุกอยแดน (fucoidans) ซึ่งสารสกัดเหล่านี้นำมาใช้เป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาสาหร่ายสีน้ำตาลมากขึ้น โดยเฉพาะในด้านการแพทย์ที่มีการนำสารโพลีแซคคาไรด์มาทดสอบผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของสารที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์และในมนุษย์ เช่น การศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันเมื่อสัตว์บริโภคสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลที่ผสมอยู่ในอาหาร การศึกษาการยับยั้งการเจริญตัวของหลอดเลือด การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเซลล์ การศึกษาการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เป็นต้น ทำให้ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายสีน้ำตาลได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น แต่สำหรับในประเทศไทยรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสาหร่ายสีน้ำตาลและการใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ของสาหร่ายในกลุ่มนี้ยังมีไม่มากนัก และยังขาดข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นอีกหลายประการ การใช้ประโยชน์จากสาหร่ายสีน้ำตาลในประเทศไทยนั้นจำกัดเฉพาะในชุมชนที่อยู่ใกล้บริเวณชายฝั่งทะเลเท่านั้น

ดังนั้นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ของสาหร่ายสีน้ำตาลเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะปริมาณ และองค์ประกอบทางเคมีของโพลิแซคคาไรด์ รวมทั้งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ เพื่อการประยุกต์ใช้ สาหร่ายสีน้ำตาลต่อไป



### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณ และองค์ประกอบของสารโพลีแซคคาไรด์ในสาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิด
2. เพื่อศึกษาผลของโพลีแซคคาไรด์ในสาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิดที่มีต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
3. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ องค์ประกอบและผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ทำการศึกษา

## การตรวจเอกสาร

สาหร่าย หมายถึง พืชชั้นต่ำมีคลอโรฟิลล์ แต่ไม่มีส่วนที่เป็นราก ลำต้น และใบที่แท้จริง มีขนาดตั้งแต่เล็กมากประกอบด้วยเซลล์เดียว ต้องมองดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ไปจนถึงขนาดใหญ่ ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมาก อาจเป็นเส้นสาย (filament) หรือมีลักษณะคล้ายพืชชั้นสูง โดยมีส่วนที่คล้ายราก ลำต้นและใบ รวมเรียกว่า ทัลลัส (thallus) ซึ่งมีทั้งพวกที่อยู่เป็นอิสระ เป็นแพลงก์ตอน และเป็นพวกยึดเกาะกับพื้น (กาญจนภาณุ, 2527; Waaland, 1977)

## ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสาหร่ายสีน้ำตาล

### ลักษณะทั่วไป

สาหร่ายสีน้ำตาลพบขึ้นอยู่ได้ทั้งในเขตอบอุ่นและเขตหนาวมากกว่าเขตร้อน มีจำนวนสกุลทั้งหมดประมาณ 250 สกุล และมีจำนวนมากกว่า 1,000 ชนิด ขึ้นอยู่ตั้งแต่ระดับน้ำท่วมถึงไปจนถึงระดับน้ำลึก 100 เมตร หรืออาจจะมากกว่า 220 เมตรในบริเวณน้ำที่ใส แสงส่องถึงได้ สาหร่ายมักขึ้นบนก้อนหิน หรือเป็นอีพิไฟต์ในสาหร่ายหรือพืชชนิดอื่นที่เลือกจำเพาะเจาะจงสิ่งที่ยึดเกาะ (selected host) รูปร่างลักษณะของสาหร่ายสีน้ำตาลจะมีตั้งแต่รูปแบบที่ง่ายมีลักษณะเป็นเส้นสายที่แตกแขนง หรือไม่แตกแขนง เช่น ในอันดับ Ectocarpales บางสกุลมีรูปร่างเป็นแผ่นแผ่ไปตามพื้นที่ยึดเกาะ เป็นก้อนกลมวง หลอดกลมวง หรือมีขนาดใหญ่ที่เรียกกันทั่วไปว่า เคลป์ (Kelp) มักพบตามแถบชายฝั่งแปซิฟิกและอาร์คติก บางสกุลมีลักษณะเซลล์ที่เป็นเซลล์พารენไคมา เช่น *Stictyosiphon* และใน order Laminariales และ Fucales เป็นต้น หรือมีลักษณะเซลล์ชูโดพารენไคมา เช่น *Ralfsia* และ *Analipus* เป็นต้น (Bold and Wynne 1978; Chapman 1962)

### ส่วนประกอบ และรงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำตาล

ส่วนที่ใช้ยึดเกาะกับสิ่งยึดเกาะ (substrate) เรียกว่า holdfast ส่วนที่คล้ายลำต้นเรียกว่า สไตป์ (stipe) หรือคอลลอยด์ (cauloid) ส่วนที่คล้ายใบเรียกว่า เบลด (blade) สาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิดมีถุงลมอยู่ที่โคนใบเพื่อช่วยพยุงให้ลอยตัวในน้ำ เรียกว่า air bladder หรือ pneumatocyst ส่วนรูปร่างของคลอโรพลาสต์ของสาหร่ายสีน้ำตาลโดยทั่วไปมีลักษณะกลมแบน (discoid) บางชนิดเป็นแถบแบน (ribbon-shaped) และรงควัตถุของสาหร่ายสีน้ำตาลประกอบด้วย คลอโรฟิลล์ เอและซี เบต้าแคโร

ทิน แซนโทฟิล 2-6 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นพวกฟูโคแซนทิน (fucoxanthin) และไวโอลาแซนทิน (violaxanthin) (กาญจนภาณุ, 2527)

### อาหารสะสมในสาหร่ายสีน้ำตาล

อาหารสะสมมีโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำพวก laminaran ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายกับที่สะสมอยู่ใน Chrysophyta และ Euglenophycophyta รวมทั้งยังมีสารจำพวก แมนนิทอล (mannitol) น้ำตาลซูโครส (sucrose) และกลีเซอรอล (glycerol) (Bold and Wynne, 1978)

### โพลีแซคคาไรด์ในสาหร่ายสีน้ำตาล

โพลีแซคคาไรด์ในสาหร่ายสีน้ำตาลส่วนใหญ่จะประกอบด้วย fucoidan, laminaran และกรดอัลจินิก (alginic acid) ซึ่ง fucoidan และ laminaran จะมีปริมาณ 20-50% ของน้ำหนักแห้ง และ alginic acid จะมีถึง 24% ของน้ำหนักแห้ง โดยทั้งหมดจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

#### 1. ส่วนที่ไม่ละลายน้ำ

โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำในสาหร่ายสีน้ำตาลจะเป็นพวกอัลจิเนต (alginate) ซึ่งพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1881 โดย Stanford โดยทั่วไปสาหร่ายสีน้ำตาลสามารถนำมาสกัดกรดอัลจินิกได้ในรูปของ เกลืออัลจินตที่ไม่ละลายน้ำ เป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบไปด้วย ดี-แมนูโรนิก (D-manuronic) และแอล-กูรูโรนิก (L-guluronic) ซึ่งอยู่บริเวณผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ ปริมาณของกรดอัลจินิกจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย แหล่งที่อยู่และฤดูกาล ชนิดของสาหร่ายสีน้ำตาลที่มีปริมาณกรดอัลจินิกที่มักจะนำมาใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ *Macrocystis pyrifera* *Ascophyllum nodosum* *Laminaria* sp. และ *Ecklonia* sp. (อรพิน, 2523)

#### 2. ส่วนที่ละลายน้ำ

โพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำในสาหร่ายสีน้ำตาลจะเป็นสารพวก laminaran และ fucoidan ซึ่ง laminaran ได้รับการค้นพบครั้งแรกในปีค.ศ. 1885 โดยสกัดได้จากส่วนของสไตป์ (stipe) ของ *Laminaria* laminaran จะมีองค์ประกอบจำพวก แมนนิทอล,  $\beta$ -1, 3-linked glucose ส่วน fucoidan ซึ่งพบอยู่ระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยสารจำพวก เอสเทอร์ซัลเฟต (ester sulfate) ฟูโคส

(fucose) กาแลคโตส (galactose) ไซโลส (xylose) กรดยูริก (uric acid) และสารอื่นๆ ซึ่งองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในกลุ่มสารโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้เป็นสารจำพวก fucose (Percival and McDowell, 1967) สารสกัด fucoïdan จาก *Ascophyllum nodosum* มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจำพวก L-fucose นอกจากนี้ยังพบ xylose และ sulfate เป็นองค์ประกอบอีกด้วย (Marais and Joseleau, 2001) และการแยกองค์ประกอบของสาร fucoïdan จาก *Sargassum stenophyllum* พบว่ามี L-fucose เป็นองค์ประกอบหลักเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบอื่นๆ อีกได้แก่ D-mannose D-glucuronic acid D-glucose และ D-xylose (Duarte *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับสาหร่าย *Fucus evanesens* ซึ่งประกอบด้วย L-fucose sulfate และ acetate ในอัตราส่วน 1: 1.23: 0.36 (Bilan *et al.*, 2002) และจากรายงานการวิเคราะห์โพลีแซคคาไรด์ในสาหร่าย *Sargassum patens* ด้วยวิธี Gas chromatography (GC) พบว่าประกอบด้วย fucose เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ galactose นอกจากนี้ยังประกอบด้วย mannose xylose glucose และ galactosamine (Zhu *et al.*, 2003)

Ponce *et al.* (2003) รายงานว่า fucoïdan ที่สกัดได้จาก *Adenocystis utricularis* ด้วยสารละลาย 3 ชนิด ที่แตกต่างกันคือน้ำกลั่น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2% และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจางที่มี pH เท่ากับ 2 พบว่า โพลีแซคคาไรด์ชนิด fucoïdan มีองค์ประกอบหลักเป็น L-fucose ในทุกสารละลายที่ใช้สกัด และยังมี D-galactose ester-sulfate เป็นองค์ประกอบใน fucoïdan อีกด้วย เช่นเดียวกับสารที่สกัดจากสาหร่าย *Laminaria japonica* ซึ่งนำมาแยกลำดับส่วนของสารสกัดแล้ว และนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโดยวิธี GC พบว่ามีองค์ประกอบหลักจำพวก fucose ในปริมาณ 62.08% ของน้ำตาลทั้งหมด รองลงมาคือ galactose ซึ่งจะพบมากในการแยกลำดับส่วนในส่วนที่หนึ่ง 43.30% และ arabinose ในปริมาณเล็กน้อย 5.60 % และในส่วนที่สามพบ mannose และ glucose ในปริมาณ 78.54% และ 11.86% ตามลำดับ (Wang *et al.*, 2008) นอกจากนี้สารสกัดจากสาหร่าย *Stoechospermum marginatum* ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำเมื่อนำมาแยกลำดับส่วนโดยวิธี anion exchange chromatography พบว่าองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบประกอบด้วย fucose เป็นองค์ประกอบหลัก ในขณะที่ galactose, glucose, xylose และ mannose พบในปริมาณเล็กน้อย (Adhikari *et al.*, 2006)

Chandía and Matsuhira (2008) รายงานว่า สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ชนิด fucoïdan จาก *Lessonia vadosa* ที่สกัดโดย petroleum ether มีองค์ประกอบหลักเป็น fucose และ sulfate ในอัตราส่วน 1.0:1.12 ตามลำดับ สารสกัดโพลีแซคคาไรด์จาก *Sargassum latifolium* ที่สกัดโดยใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำไปแยกลำดับส่วนด้วย anion exchange chromatography และ gel

filtration chromatography พบว่ามีองค์ประกอบหลักที่ประกอบด้วย glucuronic acid, mannose, glucose, xylose และ fucose ซึ่งในทุกลำดับการแยกจะพบ glucose เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นๆ จะพบในปริมาณน้อย (Mohsen *et al.*, 2007)

ในประเทศไทยได้มีการรายงานสาหร่ายในกลุ่มสีน้ำตาล มีทั้งหมด 20 สกุล 48 ชนิด (Lewmanomont *et al.*, 1995) ซึ่งได้นำมาทำการศึกษาทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ *Colpomenia sinuosa*, *Dictyota dichotoma*, *Hydroclathrus clathratus*, *Padina australis*, *Padina minor*, *Sargassum polycystum* และ *Turbinaria conoides* (นัยนา, 2529; พ้วน, 2535; กาญจนภาณุ และคณะ, 2550; Misra, 1966; Lewmanomont and Ogawa, 1995) (ภาพที่ 1)

### ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษารังนี้

*Colpomenia sinuosa* (Roth) Derb. et Sol.

ทัลลัสเป็นก้อนกลม ลักษณะกลมหรือรูปร่างไม่แน่นอน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-6 ซม. ผิวเรียบ หรือเป็นรอยย่นเว้า สีน้ำตาลปนเขียว ขึ้นบนก้อนหินหรือผิวพื้นบริเวณริมหาดน้ำไม่ลึกนัก หรือในแอ่งน้ำ มักหลุดลอยไปตามน้ำ หรือถูกคลื่นซัดมาติดริมหาด

*Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamx.

ทัลลัสเป็นแถบแบนบาง ความกว้าง 3-6 มม. แตกแขนงแบบคู่หลายครั้งจนเป็นพุ่ม อาจสูงถึง 20 ซม. โดยมีส่วนรากยึดเกาะเป็นรูปถ้วย ปลายแขนงบนแยกเป็นคู่ ขอบเรียบ แต่บางครั้งมีต้นอ่อนเกิดที่ขอบจำนวนมาก ทัลลัสสีน้ำตาลปนเหลือง ขึ้นบนก้อนหิน เศษหินหรือเปลือกหอย ในเขตน้ำตื้น มักขาดลอยมาติดบริเวณชายหาด

*Hydroclathrus clathratus* (C.Agardh) Howe

ทัลลัสลักษณะคล้ายร่างแหโปร่ง รูปร่างไม่แน่นอน เมื่อยังอ่อนลักษณะเป็นถุงกลมกลวง เมื่อแก่ขนาดจะขยายใหญ่ขึ้น และเกิดรอยฉีกขาดเป็นรูขนาดเล็กใหญ่ต่างๆ กัน บริเวณขอบรูมีวน ทัลลัสสีน้ำตาลอมเหลือง ขึ้นบนหินหรือตามผิวพื้นท้องน้ำ ที่น้ำไม่ลึกมากนัก โดยมีรากเล็กๆ ยึดเกาะไม่แน่น จึงมักหลุดจากที่ยึดเกาะ และถูกคลื่นซัดติดตามริมหาด

*Padina australis* Hauck

ทัลลัสแผ่เป็นแผ่นรูปพัด ขอบม้วนบริเวณขอบเจริญเติบโตเร็วกว่าส่วนโคนทำให้เกิดรอยพับหรือฉีกขาด จนมีลักษณะเป็นพุ่ม สูง 10-15 ซม. ขนาดของพุ่มกว้าง 10-18 ซม. ความหนาของทัลลัส 2 ชั้น เซลล์ตลอด ตั้งแต่โคนถึงปลาย ส่วนรากที่ใช้ยึดเกาะเป็นรูปถ้วย มีสไตป์สั้นๆ ส่วนที่แผ่เป็นรูปพัดบางใส มีรอยแฉกไขว้กัน ขอบของทัลลัสหลายแนวจากโคนถึงปลาย มีหินปูนขึ้นคลุมบ้าง อวัยวะสืบพันธุ์เป็นจุดกลมๆ สีเข้มเป็นแนวระหว่างแนวขน เห็นเป็นแถบสีเข้มสลับกับแถวว่าง เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ขึ้นบนก้อนหิน หรือเปลือกหอยในระดับน้ำขึ้นน้ำลง

*Padina minor* Yamada

ทัลลัสแผ่เป็นรูปพัดหรือรูปไต สูง 3-6 ซม. มีรากยึดเกาะลักษณะเป็นรูปถ้วย และมีสไตป์สั้นๆ ส่วนที่แผ่เป็นรูปพัดบางใส มีความหนา 2 ชั้นเซลล์ ผิวด้านล่างมีคราบหินปูน ผิวด้านบนมีขนเป็นแนวไขว้กัน ขอบของทัลลัส และมีอวัยวะสืบพันธุ์เป็นแนวสีเข้ม เนื้อแนวขนทุกแนว ทัลลัสสีน้ำตาลอมเขียวหรือน้ำตาลอมเหลือง ขึ้นบนเศษหินหรือกรวด ในระดับน้ำขึ้นน้ำลง

*Sargassum polycystum* C. Agardh

ทัลลัสตั้งตรงสูง 150 ซม. มีรากยึดเกาะรูปถ้วย มีสไตป์รูปทรงกระบอกสั้นๆ สูง 5-10 มม. แขนงที่แตกจากสไตป์มีหนามเล็กๆ จำนวนมาก ส่วนที่คล้ายใบหอก ขอบใบมีหยัก เส้นกลางใบเห็นได้ชัดมีจุดกลมกลมๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.5 มม. จำนวนมาก อวัยวะสืบพันธุ์รูปทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. ยาว 3-5 มม. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียแยกกัน อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ลักษณะเป็นแท่งกลมยาวประมาณ 1 ซม. เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเป็นแท่งกลมแบนยาวประมาณ 4 มม. อยู่รวมกันเป็นข้อ ส่วนของสไตป์สามารถสร้างสโตลอน (stolon) ออกไปได้หลายทิศทาง เพื่องอกเป็นต้นใหม่ได้ ทัลลัสสีน้ำตาล ขึ้นบนก้อนหิน ในระดับน้ำขึ้น น้ำลง หรือลึกกว่า มักพบขาดลอยอยู่ในน้ำ หรือถูกคลื่นซัดติดริมหาด (กาญจนาภรณ์ และคณะ, 2550; Lewmanomont and Ogawa, 1995)

รอยหยักที่ขอบ และมีถุงลมฝังอยู่ตรงกลาง อวัยวะสืบพันธุ์แตกแขนงเป็นพุ่มเล็กๆ อยู่ส่วนโคนของใบ ทลัสดมีรากยึดเกาะแข็งแรง แตกแขนงแผ่กว้างบนหินหรือซากปะการัง ในที่น้ำใสระดับความลึกกว่าแนวน้ำลงต่ำสุด



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษา (1) *Colpomenia sinuosa* (Roth) Derb. et Sol., (2) *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamx., (3) *Hydroclathrus clathratus* (C. Agardh) Howe, (4) *Padina australis* Hauck, (5) *Padina minor* Yamada, (6) *Sargassum polycystum* C. Agardh, (7) *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützinger

## ประโยชน์ของสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล

ในอดีตได้มีการนำสาหร่ายหลายชนิดมาทำยาเช่น *Sargassum Fucus* และ *Laminaria* โดยนำมาใช้รักษาโรคคอพอก สารสกัดจาก *Ascophyllum* นำมาใช้ในการรักษาอาการเคล็ดและรักษาโรคปวดในข้อ (rheumatism) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลได้แก่ laminaran fucooidan และ alginic acid สามารถนำมายับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ลดระดับปริมาณไขมันในเลือด (lipolytic) ลดระดับคลอเรสเตอรอลในกระแสเลือด ลดระดับน้ำตาลในเลือด รวมทั้งใช้ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ที่ผิดปกติและการยับยั้งการเกิดแผลอักเสบได้

Church *et al.* (1989) รายงานว่า สาร fucooidan ที่สกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาล เมื่อนำมาทดลองในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือดโดยให้ความเข้มข้นของสาร fucooidan 0.1-10  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งการแข็งตัวของหลอดเลือดในหลอดทดลอง โดยการเข้าไปขัดขวางการทำงานของ heparin cofactor II และเมื่อทำการแยกสารสกัด fucooidan จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่ม echinoderms และสาหร่ายสีน้ำตาล แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด พบว่าสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลสามารถยับยั้งการสร้างสาร thrombin ส่วนสารสกัดที่แยกมาจาก echinoderms จะยับยั้งสาร thrombin และ heparin cofactor II ซึ่งให้ผลยับยั้งไม่รุนแรงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสาร fucooidan ที่สกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาล (Pareira *et al.*, 1999) เมื่อนำสาร fucooidan ที่สกัดมาจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Ecklonia kurome* พบว่ามีผลต่อการสร้างสาร thrombin และ factor Xa โดยสารสกัดจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ prothrombinase ในกระบวนการสร้างสาร thrombin (Nishino *et al.*, 1999)

Güven *et al.* (1999) รายงานว่าสาร laminaran มีผลต่อการยับยั้งการแข็งตัวของหลอดเลือดได้ประมาณ 20-40% ซึ่งสาร laminaran ที่มีกลุ่ม sulfate สูงมีผลต่อการยับยั้งได้สูงกว่ากลุ่มของ laminaran ที่มีกลุ่ม sulfate น้อย และสาร fucooidan สามารถยับยั้งการแข็งตัวของหลอดเลือดได้ประมาณ 40-80% เมื่อทำทดสอบในหลอดทดลอง นอกจากนี้สารสกัด fucooidan ยังมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่แยกมาจากเซลล์บริเวณใกล้เคียงกับสายสะดือของมนุษย์ โดยสารสกัด fucooidan เข้าไปขัดขวางการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยกลุ่ม sulfate ที่อยู่ในสารสกัด fucooidan (Koyanagi *et al.*, 2003) และในการใช้สาร fucooidan ที่สกัดจาก *Sargassum polycystum* มาทดสอบการลดผลกระทบของโรคจุลหวาในกุ้งกุลาดำ โดยผสมสาร fucooidans กับอาหารให้กุ้งที่มีน้ำหนัก 5-8 g และ 12-15 g กุ้งมีอัตราการรอด 46% และ 93% ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากสาหร่ายมาทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Vibrio harveyi* *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) เท่ากับ 12.0, 12.0 และ 6.0 mg/ml ตามลำดับ (Chotigeat *et al.*, 2004)



เช่นเดียวกับการทดลองของ Yeh *et al.* (2006) ที่ได้ทำการศึกษาศาสตร์จาก *Sargassum duplicatum* ที่สกัดโดยวิธีร้อน โดยทำการทดสอบ 2 วิธี คือ การฉีด และการแช่ในสารสกัด ซึ่งทำการทดสอบในกุ้ง *Litopenaeus vannamei* เพื่ออัตราการรอด การสร้างภูมิคุ้มกันสำหรับกุ้งที่ทำการทดสอบโดยการฉีด จากการติดเชื้อจาก *Vibrio alginolyticus* พบว่า เมื่อทำการฉีดสารสกัดลงในตัวกุ้งที่ 6, 10 และ 20  $\mu\text{g/g}$  กุ้งสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อได้ ในทุกความเข้มข้นที่ฉีดเข้าไปภายหลังจากการฉีดเข้าไปเป็นเวลา 1-6 วัน ส่วนตัวอย่างกุ้งที่แช่ในสารสกัดจากสาหร่ายเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้น 100, 300 และ 500  $\text{mg/l}$  มีอัตราการรอดที่ดีกว่าชุดการควบคุมที่ไม่ได้แช่สารสกัดเลยภายหลังจากการแช่เป็นเวลา 6 วันเมื่อทำการทดสอบกับเชื้อ จากการศึกษารายงานของ Zhu *et al.* (2003) สาร fucoidan ที่แยกจากสาหร่าย *Sargassum patens* ซึ่งนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรค herpes พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดผลการยับยั้งเชื้อ 50% ( $\text{EC}_{50}$ ) สามารถต่อต้าน cold sores และ genital herpes ที่ 1.3 และ 5.5  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาศาสตร์ fucoidan ที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล *Fucus vesiculosus* สามารถต้านการทำงานของ cytotoxic และ myotoxic ที่มีอยู่ในกลุ่มของ Phospholipase  $\text{A}_2$  ที่นำมาจากพิษของงู *Bothrops asper*, *Cerrophidion godmani*, *Atropoides nummifer* และ *Bothriechis schlegelii* (Angulo and Lomonte, 2003) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าสารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้สกัดจาก *Macrocystis pyrifera* สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* (Espeche *et al.*, 1984) และมีการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยใช้พืชและสาหร่ายเป็นตัวทดสอบ ซึ่งพบว่าสาหร่ายสีเขียว *Ulva lactuca* และ *Sargassum wightii* สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกันกับเมื่อทดสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* กับพืชชนิด *Ricinus communis*, *Phyllanthus niruri*, *Leucus aspera* และ *Manihot esculenta* (Immanuel *et al.*, 2004) และในการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Cytoseira abies-marina*, *Dictyota dichotoma* และ *Laminaria saccharina* สามารถยับยั้งเชื้อ *V. anguillarum*, *Pseudomonas anguilliseptica* สาหร่ายชนิดที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด คือ *Asparagopsis armata* สามารถยับยั้งเชื้อ *V. anguillarum*, *P. anguilliseptica*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersin ruckeri* (Bansemir *et al.*, 2006) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาผลการยับยั้งของ *Padina australis*, *Sargassum polycystum* และ *Turbinaria conoides* ที่สกัดด้วย methanol, ethanol และ dichloromethane พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* (Kaewsrithong *et al.*, 2007) Jing-wen and Wei-ei (1984) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์จากสาหร่าย *Sargassum fusiforme*, *S. thunbergii* และ *S. kjellmanianum* พบว่าสามารถยับยั้ง *B. subtilis*, *E. coli* และ *Vibrio* sp.

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดสาหร่าย

1.1 ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลที่เก็บได้จาก หาดทุ่งวัวแล่น อ.ประทิว จ.ชุมพร ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก อ. บ้านเพ จ. ระยอง และแสมสาร อ. สัตหีบ จ.ชลบุรี

1.2 ชุดเครื่องแก้ว

1.3 เครื่อง rotary evaporator รุ่น BÜCHI Rotavapor R 200

1.4 Vortex รุ่น Genie 2

1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น Hettich zentrifugen EBA 20

1.6 กระดาษกรอง Whatman ขนาด 11, 8, 0.45 และ 0.02 ไมครอน

1.7 ชุดกรอง Millipore filter

1.8 เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง รุ่น Precisa 404 MSCS

1.9 เครื่องเขย่า (Shaker)

1.10 เครื่อง Heating Mantle รุ่น Electromantle

1.11 โถดูดความชื้น

1.12 ตู้แช่ -80°C

1.13 ตู้แช่ -20°C

1.14 Hot plate

1.15 น้ำกลั่น

1.16 ถังกรอง

1.17 เครื่องทำแห้งแบบระเหิด

1.18 ถัง dialysis tube รุ่น membrane Spectra/Pro MWCO : 6-8000

1.19 โถดูดความชื้น

#### 2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดจากสาหร่าย

2.1 D-Glucose

2.2 Fucose

- 2.3 Fructose
- 2.4 D (+) Mannose
- 2.5 D (+) Galactose
- 2.6 milli Q water
- 2.7 Orthophosphoric Acid 85%
- 2.8 Diphenylamine
- 2.9 n-Propanol
- 2.10 Aniline
- 2.11  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 2.12 Bacto gelatin
- 2.13 Sulfuric acid
- 2.14 Acetic acid
- 2.15 Hydrochloric acid
- 2.16 Phenol
- 2.17 แผ่น TLC Aluminium sheets 20 x 20 cm Silica gel 60 F<sub>254</sub>
- 2.18 เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Shimadzu UV-1700
- 2.19 หลอดแก้วคาพิลลารี (capillary tube)

### 3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการต้านเชื้อจุลินทรีย์

- 3.1 จานเลี้ยงเชื้อ
- 3.2 หม้ออบความดันสูง รุ่น TOMY Autoclave SS-320
- 3.3 กระดาษกรอง whatman (filter paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร
- 3.4 ตั้บมเชื้อ
- 3.5 เข็มฉีดยา (needle)
- 3.6 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.7 ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20-200 และ 200-1,000  $\mu\text{l}$
- 3.8 กระดาษทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะสำเร็จรูป (antimicrobial susceptibility test disc) [Oxoid] บรรจุสาร nystatin ความเข้มข้น 100 unit และ gentamicin ความเข้มข้น 10  $\mu\text{g}$

#### 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar (TCBS agar)

4.2 Nutrient agar (NA)

4.3 Potato dextrose agar (PDA)

4.4 YM agar (YMA)

4.5 Nutrient agar + 1% (w/v) NaCl

#### 5. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

5.1 แบคทีเรียแกรมบวก

*Bacillus subtilis* TISTR 008

*Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781

5.2 แบคทีเรียแกรมลบ

*Aeromonas hydrophilla* TISTR 1321

*Escherichia coli* TISTR 780

*Vibrio alginolyticus* TISTR 1572

*Vibrio parahaemolyticus* สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง

*Vibrio harveyi* สถาบันสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง

5.3 เชื้อราและยีสต์

*Aspergillus niger* TISTR 3254

*Candida albicans* TISTR 5779

#### หมายเหตุ

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

(สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลที่ศึกษา ที่เก็บรวบรวมมาจาก แสมสาร อ. สัตหีบ จ. ชลบุรี ได้แก่ *Colpomenia sinuosa* (CS01), *Hydroclathrus clathratus* (HC01), *Padina australis* (PA01) และ *Sargassum polycystum* (SP01)

ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจาก หาดทุ่งวัวแล่น อ.ประทิว จ.ชุมพร ได้แก่ *Dictyota dichotoma* (DD02) *Padina australis* (PA02), *Padina minor* (PM02) และ *Turbinaria conoides* (TC02)

และตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากชายฝั่งทะเลบริเวณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก อ. บ้านเพ จ. ระยอง ได้แก่ *Padina australis* (PA03) และ *Sargassum polycystum* (SP03)

ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลที่รวบรวมได้นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำทะเล เอาเศษตะกอน และสาหร่ายที่เกาะอยู่บนตัวอย่างออกให้หมด จากนั้นนำมาตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่แห้งแล้วไว้ในถุงที่แห้งและปิดสนิท

### 2. การสกัดสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลและการหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณผลผลิต (yield)

#### 2.1 การสกัดสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ (crude polysaccharide) จากสาหร่ายสีน้ำตาล

##### 2.1.1 วิธีการสกัดสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ในน้ำกลั่น ด้วยวิธีสกัดร้อน (E1)

นำตัวอย่างแห้งของสาหร่ายสีน้ำตาลที่เตรียมไว้ข้างต้นมาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วทำให้แห้งอีกครั้ง จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปสกัดสารโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้ตัวอย่างสาหร่ายต่อน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1: 5 (w/v) ใส่ลงในชุดสกัดภายใต้ระบบความดันต่ำ และต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองตัวอย่างสารละลายที่สกัดได้ด้วยถุงผ้าไนลอน (ขนาดตา 24 ไมครอน) เพื่อแยกกากสาหร่ายออก และนำไปกรองด้วยชุดเครื่องกรอง millipore filter ด้วยกระดาษกรองขนาดช่องตา 11, 8 และ 0.45 ไมครอน ตามลำดับ นำตัวอย่างที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator (รุ่น BÜCHI Rotavapor R 200) จนเหลือ

ปริมาณน้อยที่สุด จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบระเหิด จะได้สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธีร้อน

### 1.1.2 วิธีการสกัดสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (E2)

(Ozawa *et al.*, 2006)

ตัวอย่างแห้งของสาหร่ายสีน้ำตาลนำไปสกัดด้วยการใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2.0 mol/L โดยปรับค่า pH ในการสกัดสารให้มี pH เท่ากับ 3 และนำไปสกัดที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง กรองตัวอย่างสารละลายที่สกัดได้ออกด้วยถุงผ้าไนลอน (ขนาดตา 24 ไมครอน) เพื่อแยกกากสาหร่ายออก และนำไปกรองด้วยชุดเครื่องกรอง Millipore filter ด้วยกระดาษกรองที่มีขนาด 11, 8 และ 0.45 ไมครอนตามลำดับ ทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator (รุ่น BÜCHI Rotavapor R 200) จนเหลือปริมาณน้อยที่สุด จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบระเหิด จะได้สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ชนิด fucoidan

## 1.2 การหาเปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ (yield)

นำตัวอย่างสารสกัดที่ทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบระเหิดมาชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ (crude extract) ที่ได้เทียบกับน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างสาหร่ายแห้งที่นำมาสกัด ตามสูตร

$$\text{Yield (\% w/w)} = \frac{\text{น้ำหนัก Crude extract}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งที่นำมาสกัด}} \times 100$$

## 2. การทำบริสุทธิ์ (purification) และการวิเคราะห์ทางเคมี

### 2.1 การทำ purification

เตรียมตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์โดยนำสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ในอัตราส่วนโดยประมาณ 1:20 (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°C จนกระทั่งสารสกัดละลายน้ำจนหมด ตัวอย่างสารละลายที่ได้ นำไปปั่นเหวี่ยงและดูดส่วนใสลงในถุง dialysis tube จากนั้นแช่ถุงตัวอย่างในน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:2 (v/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อ

กำจัดอิมของเกลือที่ปนเปื้อนในตัวอย่างออก ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปทำแห้งอีกครั้ง

## 2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 3.1 มาวิเคราะห์หา Total carbohydrates โดยวิธี phenol sulfuric acid (Dubois *et al.*, 1956)

## 2.3 การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต

นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยวิธี การวัดความขุ่นของ  $\text{BaCl}_2$  (Craigie *et al.*, 1984) ภายหลังจากย่อยตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 N ที่  $100^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

## 2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 2.1 มา 2 mg ใส่ลงในขวด vial ฝาเกลียวสีขาว จากนั้นเติม HCl ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 0.5 ml นำไปต้มที่อุณหภูมิ  $100^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำตัวอย่างที่ได้ล้างด้วยน้ำกลั่นและระเหยกรดออก ด้วยเครื่อง rotary evaporator ทำซ้ำเช่นเดียวกันอีกหลายๆ ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีกรดเหลืออยู่ นำตัวอย่างที่ได้เก็บในขวดสีขาวเพื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ตามวิธีของ Stahl (1965) และตรวจสอบน้ำตาลโดยใช้ยาตรวจสอบตามวิธีของ Darmstadt (1980) ตัวอย่างสารสกัดหยาบอีกส่วนนำมาตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อยืนยันโดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ซึ่งประกอบด้วยปั๊ม Attech รุ่น 626 detector รุ่น Attech ELSD 2000 ES ชนิดของคอลัมน์ใช้ Lichrocart  $\text{NH}_2$  ขนาด  $250 \times 4$  mm และชนิดของ mobile phase ใช้ 85% Aceto nitrile ต่อ น้ำ 15% อัตราการฉีดตัวอย่าง 2 ml/min โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน (standard sugar) 5 ชนิด คือ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส กาแลกโตส และแมนโนส

### 3. การศึกษาประสิทธิภาพของสารโพลีแซคคาไรด์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบการตอบสนองของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้วิธี Disc diffusion ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรียแกรมลบชนิด *Aeromonas hydrophilla*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. harveyi* เชื้อยีสต์ *Candida albicans* และเชื้อรา *Aspergillus niger*

#### 3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ขยายใน Mueller Hinton Broth (MHB) จนกระทั่งเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการเก็บเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นจึงนำเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์มาทำความสะอาดด้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85% นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อทำการเก็บเซลล์อีกครั้ง ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เมื่อล้างเซลล์เสร็จเรียบร้อยแล้ว จึงเติมน้ำเกลือลงไปให้ จุลินทรีย์อยู่ในรูปสารแขวนลอย (suspension) และเพื่อตรวจวัดค่าความเข้มข้นของจุลินทรีย์ด้วยค่า optical density (O.D.) ด้วยเครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ปรับให้ได้ O.D. ที่ 0.14 สารละลายแขวนลอยที่ได้จะมีปริมาณจุลินทรีย์  $1 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ในอัตราส่วน 1:10 จนได้เชื้อที่มีปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ  $3 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้เปลี่ยนให้ทั่วอาหารที่ใช้ทดสอบเพื่อเตรียมนำไปทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ต่อไป

#### 3.2 การเตรียมสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

นำตัวอย่างของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์มาละลายในน้ำโดยให้ความเข้มข้น 2 1 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml หยดสารละลายที่ได้ลงบนแผ่นกระดาษกรองในปริมาตร 50  $\mu$ l/ แผ่น ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำมาทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์

#### 3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์

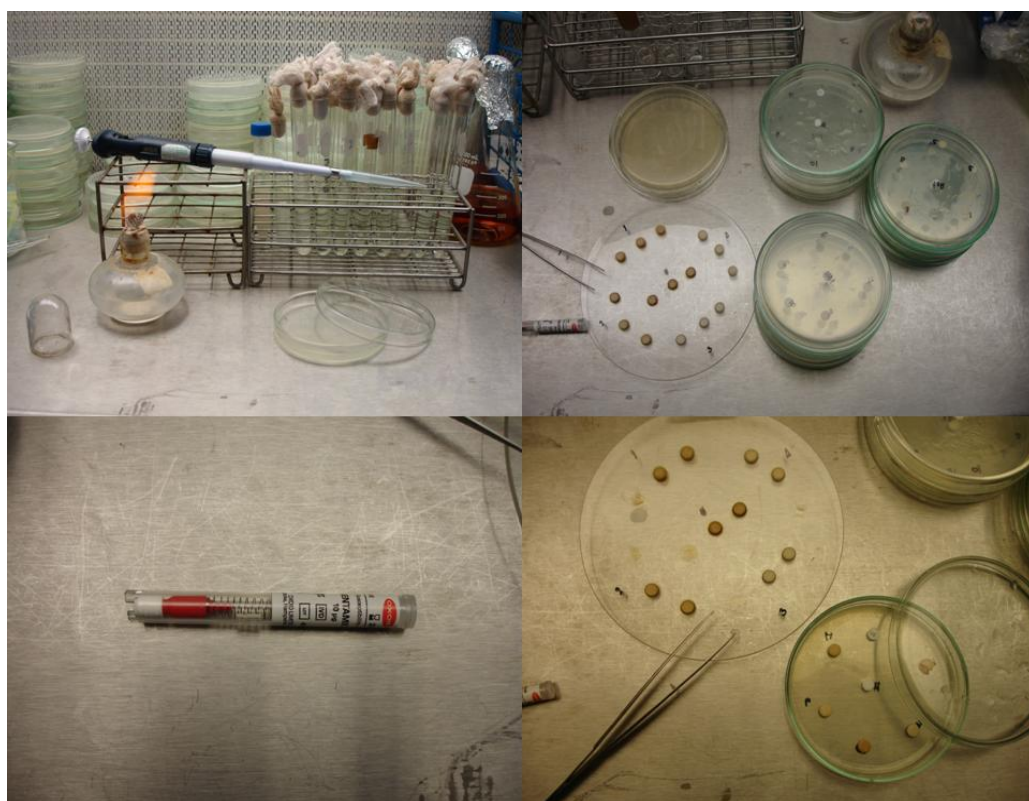
ใช้ปากคิปปิดที่ฆ่าเชื้อแล้ว คีบกระดาษที่หยดสารละลายที่เตรียมไว้ นำไปวางบนจานเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ โดยวางกระดาษทดสอบ 6 แผ่นต่อจานเลี้ยงเชื้อ โดยมีตัวควบคุมในการ



ทดลอง คือ กระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อและยาปฏิชีวนะ จากนั้นนำไปป้อนในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลการทดลอง

### 3.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์กับยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ gentamicin ซึ่งใช้เป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ nystain ใช้เป็นตัวยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อรา เปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กับสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์



ภาพที่ 2 อุปกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนต่างๆ ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์

## ผลและวิจารณ์

### ผลการทดลอง

#### 1. ปริมาณของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาลที่ทำการศึกษา

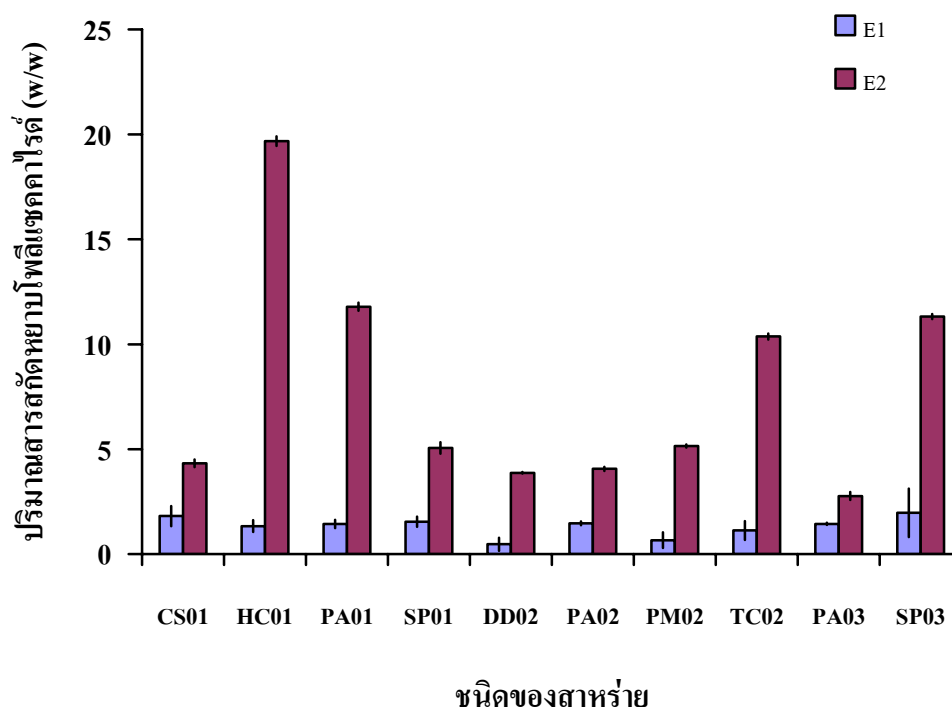
##### 1.1 ปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1

ปริมาณสารสกัดหยาบของโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลในน้ำด้วยวิธี E1 (ภาพที่ 3) มีค่าเฉลี่ยแปรผันแตกต่างกันในสาหร่ายแต่ละชนิด ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด CS01, HC01, SP01, SP03, PA01, PA02 และ PA03 ให้ปริมาณสารสกัดหยาบ  $1.81 \pm 0.48$ ,  $1.33 \pm 0.28$ ,  $1.54 \pm 0.24$ ,  $1.97 \pm 1.15\%$ ,  $1.44 \pm 0.20\%$ ,  $1.47 \pm 0.09\%$  และ  $1.44 \pm 0.05\%$  (w/w) ตามลำดับ ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้นี้ มีค่าสูงกว่าที่สกัดได้จากตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด DD02, PM02 และ TC02 โดยให้ปริมาณสารสกัดหยาบที่มีค่า  $0.47 \pm 0.31$ ,  $0.66 \pm 0.38$  และ  $1.13 \pm 0.45\%$  (w/w) ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างสาหร่ายชนิด SP03 ซึ่งให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุด ( $1.97 \pm 1.15\%$ ) และสูงกว่าปริมาณที่สกัดได้จากตัวอย่างชนิดเดียวกัน ที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี ในทางตรงข้าม สารสกัดหยาบที่ได้จากสาหร่ายชนิด PA มีปริมาณสารสกัดหยาบใกล้เคียงกับตัวอย่างชนิดเดียวกันที่เก็บจากแหล่งต่างกัน อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากตัวอย่างแต่ละชนิดด้วยวิธี E1 มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ค 1)

##### 1.2 ปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2

ตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลที่สกัดด้วยวิธี E2 (ภาพที่ 3) สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้อยู่ในรูปของ fucooidan ซึ่งปริมาณสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายชนิด CS01, HC01, PA01 และ SP01 มีค่า  $4.33 \pm 0.18$ ,  $19.69 \pm 0.23$ ,  $11.79 \pm 0.19$  และ  $5.06 \pm 0.27\%$  (w/w) ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างสาหร่ายชนิด DD02, PA02, PM02 และ TC02 ให้ปริมาณสารสกัดหยาบ  $3.87 \pm 0.04$ ,  $4.06 \pm 0.10$ ,  $5.15 \pm 0.08$  และ  $10.37 \pm 0.15\%$  (w/w) ตามลำดับ ตัวอย่างสาหร่ายชนิด SP03 ให้ปริมาณสารสกัด  $11.32 \pm 0.12\%$  (w/w) ซึ่งสูงกว่าสาหร่ายชนิดเดียวกันที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี (SP01) ในขณะที่ปริมาณสารสกัดจากสาหร่ายชนิด PA03 ( $2.77 \pm 0.19\%$  w/w) มีค่าต่ำกว่าสาหร่ายชนิด

เดียวกันที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี (PA01) โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E2 ในสาหร่ายแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เช่นกัน (ตารางภาคผนวกที่ ค 2)



ภาพที่ 3 ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดจากสาหร่ายทะเลโดยวิธีการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ

100 °C (E1) และ การสกัดด้วยกรด E2; CS = *C. sinuosa*, DD = *D. dichotoma*,

HC = *H. clathratus*, SP = *S. polycystum*, PA = *P. australis*, PM = *P. minor*,

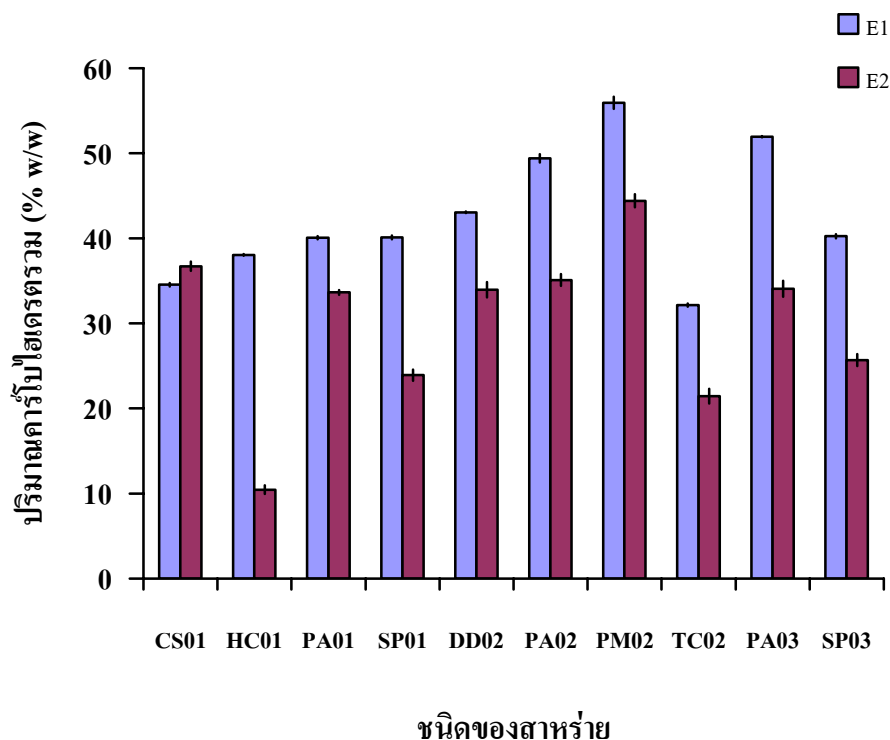
TC = *T. conoides*, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร, 03 = ระยอง และ vertical bar = standard deviation

## 2. องค์ประกอบทางเคมี

### 2.1 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (total carbohydrate) ในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์

สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดสำหรับน้ำตาลด้วยวิธี E1 พบว่าสำหรับน้ำตาลชนิด CS01, HC01, PA01 และ SP01 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต  $34.55 \pm 0.21$ ,  $38.04 \pm 0.10$ ,  $40.07 \pm 0.18$  และ  $40.10 \pm 0.23$  % (w/w) ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวอย่างสำหรับชนิด DD02, PA02, PM02 และ TC02 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต  $43.06 \pm 0.09$ ,  $49.40 \pm 0.50$ ,  $55.95 \pm 0.72$  และ  $32.15 \pm 0.18$  % (w/w) ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างสำหรับน้ำตาลชนิด SP03 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต  $40.25 \pm 0.24$  % ซึ่งใกล้เคียงกับตัวอย่างชนิดเดียวกันที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี (SP01) ในขณะที่สำหรับชนิด PA03 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต  $51.94 \pm 0.08$  % (w/w) ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างชนิดเดียวกันที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี (PA01) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าสูงสุด  $55.95 \pm 0.72$  % (w/w) ในสำหรับชนิด PM02 ส่วน SP01, PA01 และ SP03 มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ TC02 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่ำสุด  $32.15 \pm 0.18$  % (w/w) (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตาม ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากตัวอย่างแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เช่นกัน (ตารางภาคผนวกที่ ค 8)

สำหรับโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E2 จากสำหรับน้ำตาลชนิด CS01, HC01, PA01 และ SP01 ที่เก็บจากชลบุรี มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต  $36.72 \pm 0.55$ ,  $10.46 \pm 0.52$ ,  $33.64 \pm 0.67$  และ  $23.91 \pm 0.29$  % (w/w) ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างสำหรับน้ำตาลจากจังหวัดชุมพร ชนิด DD02, PA02, PM02 และ TC02 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่า  $33.95 \pm 0.78$ ,  $35.10 \pm 0.86$ ,  $44.41 \pm 0.94$  และ  $21.46 \pm 0.71$  % (w/w) ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างสำหรับน้ำตาลที่เก็บมาจากจังหวัดระยอง สำหรับชนิด SP03 ( $25.68 \pm 0.91$  % w/w) และชนิด PA03 ( $34.07 \pm 0.70$  % w/w) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดชลบุรีเล็กน้อย ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าสูงสุดในสำหรับชนิด PM02 จากชุมพร และต่ำสุดในชนิด HC01 จากชลบุรี (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตาม ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากตัวอย่างแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ค 9)

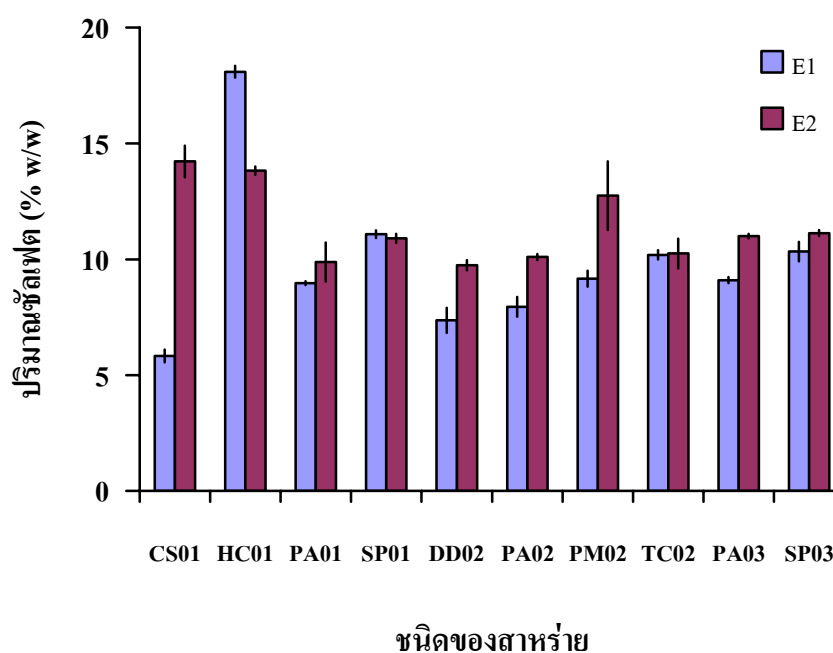


ภาพที่ 4 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายทะเล; CS = *C. sinuosa*, DD = *D. dichotoma*, HC = *H. clathratus*, SP = *S. polycystum*, PA = *P. australis*, PM = *P. minor*, TC = *T. conoides*, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร, 03 = ระยอง และ vertical bar = standard deviation

## 2.2 ปริมาณซัลเฟตในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์

ปริมาณซัลเฟตในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 มีความแตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย ตัวอย่างสาหร่ายชนิด CS01, HC01, PA01 และ SP01 จากชลบุรี มีปริมาณซัลเฟต  $5.83 \pm 0.28$ ,  $18.10 \pm 0.25$ ,  $8.97 \pm 0.09$  และ  $11.09 \pm 0.17\%$  (w/w) ตามลำดับ ตัวอย่างสาหร่ายชนิด DD02, PA02, PM02 และ TC02 จากชุมพร มีปริมาณซัลเฟต  $7.37 \pm 0.54$ ,  $7.95 \pm 0.43$ ,  $9.16 \pm 0.35$  และ  $10.19 \pm 0.20\%$  (w/w) ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างสาหร่าย SP03 และ PA03 จากระยอง มีปริมาณซัลเฟต  $10.33 \pm 0.42\%$  และ  $9.10 \pm 0.10\%$  (w/w) ตามลำดับ ปริมาณซัลเฟตมีค่าสูงสุดในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จาก HC01 ( $18.10 \pm 0.25\%$  w/w) และมีค่าต่ำสุดในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จาก CS01 (ภาพที่ 5) ปริมาณซัลเฟตที่ได้จากสาหร่ายแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ค 15)

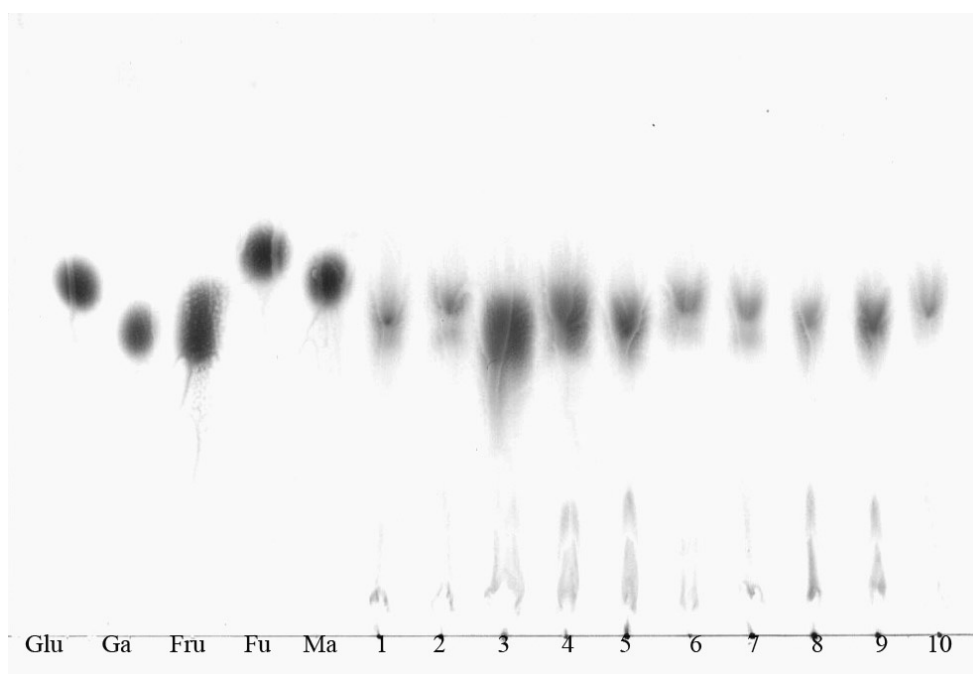
สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายชนิด CS01, HC01, PA01 และ SP01 ที่สกัดด้วยวิธี E2 มีปริมาณซัลเฟต  $14.22 \pm 0.69$ ,  $13.82 \pm 0.18$ ,  $9.88 \pm 0.20$  และ  $10.90 \pm 0.85$  % (w/w) ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างสาหร่าย DD02, PA02, PM02 และ TC02 มีปริมาณซัลเฟต  $9.74 \pm 1.49$ ,  $10.10 \pm 0.65$ ,  $12.75 \pm 0.10$  และ  $10.25 \pm 0.13$  % (w/w) ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างสาหร่าย SP03 และ PA03 มีปริมาณซัลเฟต  $11.13 \pm 0.22$ % และ  $11.00 \pm 0.13$ % (w/w) ตามลำดับ ปริมาณซัลเฟตมีค่าสูงสุดในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จาก CS01 ( $14.22 \pm 0.69$ % w/w) และมีค่าต่ำสุดในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จาก PA01 ( $9.88 \pm 0.20$ % w/w) และ DD02 ( $9.74 \pm 1.49$ % w/w) (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตาม ปริมาณซัลเฟตที่ได้จากตัวอย่างสาหร่ายแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางภาคผนวกที่ ก16)



ภาพที่ 5 ปริมาณซัลเฟตจากสาหร่ายทะเล; CS = *C. sinuosa*, DD = *D. dichotoma*, HC = *H. clathratus*, SP = *S. polycystum*, PA = *P. australis*, PM = *P. minor*, TC = *T. conoides*, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร, 03 = ระยอง และ vertical bar = standard deviation

### 2.3 ผลการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลจากสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

จากการศึกษาเบื้องต้น โดยตรวจสอบชนิดของน้ำตาลในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่า ค่า Rf ที่ได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันแล้ว ไม่ให้ผลที่ชัดเจน ค่า Rf ที่ได้เปรียบเทียบกับค่าน้ำตาลมาตรฐาน มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน และสำหรับในแต่ละชนิด การจำแนกชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ ด้วยวิธี E1 นั้นไม่มีความชัดเจนในการจำแนกชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ชนิดของน้ำตาลในโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 และ ตรวจวิเคราะห์ด้วย

เทคนิค TLC โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด คือ Glu, Ga, Ma, Fru และ Fu

Glu = น้ำตาลกลูโคส      Ga = น้ำตาลกาแลคโตส      Fru = น้ำตาลฟรุคโตส

Fu = น้ำตาลฟูโคส      Ma = น้ำตาลแมนโนส      1 = CS01

2 = DD03      3 = HC01      4 = PA01

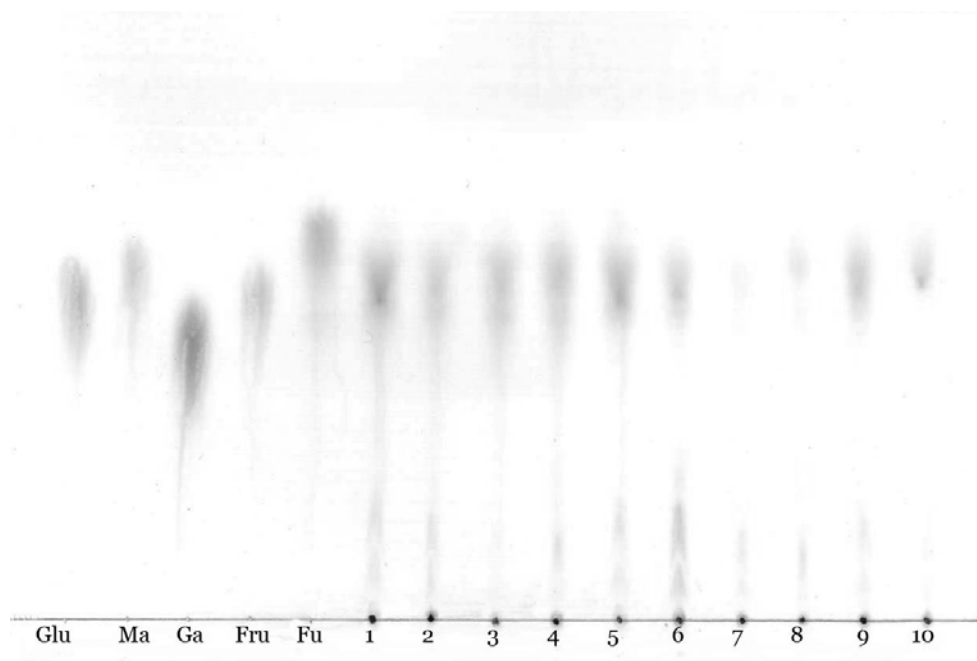
5 = PA02      6 = PA03      7 = PM02

8 = SP01      9 = SP03      10 = TC02

ตารางที่ 1 ค่า Rf ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E1 โดยใช้เทคนิค TLC

| ชนิด | Glu  | Ga   | Fru | Fu  | Ma   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Rf   | 0.55 | 0.49 | 0.5 | 0.6 | 0.57 | 0.52 | 0.53 | 0.51 | 0.52 | 0.52 | 0.56 | 0.54 | 0.56 | 0.53 | 0.58 |

เช่นเดียวกัน ค่า Rf ที่ได้จากการทดสอบการจำแนกชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากวิธีการสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 พบว่า มีค่าที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันในสਾਰายแต่ละชนิดและใกล้เคียงกับน้ำตาลมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ จึงไม่สามารถจำแนกออกเป็นน้ำตาลแต่ละชนิดได้ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ชนิดของน้ำตาลในโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 และตรวจวิเคราะห์ด้วย

เทคนิค TLC โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด คือ Glu, Ga, Ma, Fru และ Fu

Glu = น้ำตาลกลูโคส      Ga = น้ำตาลกาแลคโตส      Fru = น้ำตาลฟรุคโตส

Fu = น้ำตาลฟูโคส      Ma = น้ำตาลแมนโนส      1 = CS01

2 = DD03      3 = HC01      4 = PA01

5 = PA02      6 = PA03      7 = PM02

8 = SP01      9 = SP03      10 = TC02



ตารางที่ 2 ค่า Rf ที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E2 โดยใช้เทคนิค TLC

| ชนิด | Glu  | Ma   | Ga   | Fru | Fu  | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
|------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Rf   | 0.47 | 0.54 | 0.42 | 0.5 | 0.6 | 0.52 | 0.61 | 0.59 | 0.58 | 0.57 | 0.57 | 0.57 | 0.58 | 0.57 | 0.59 |

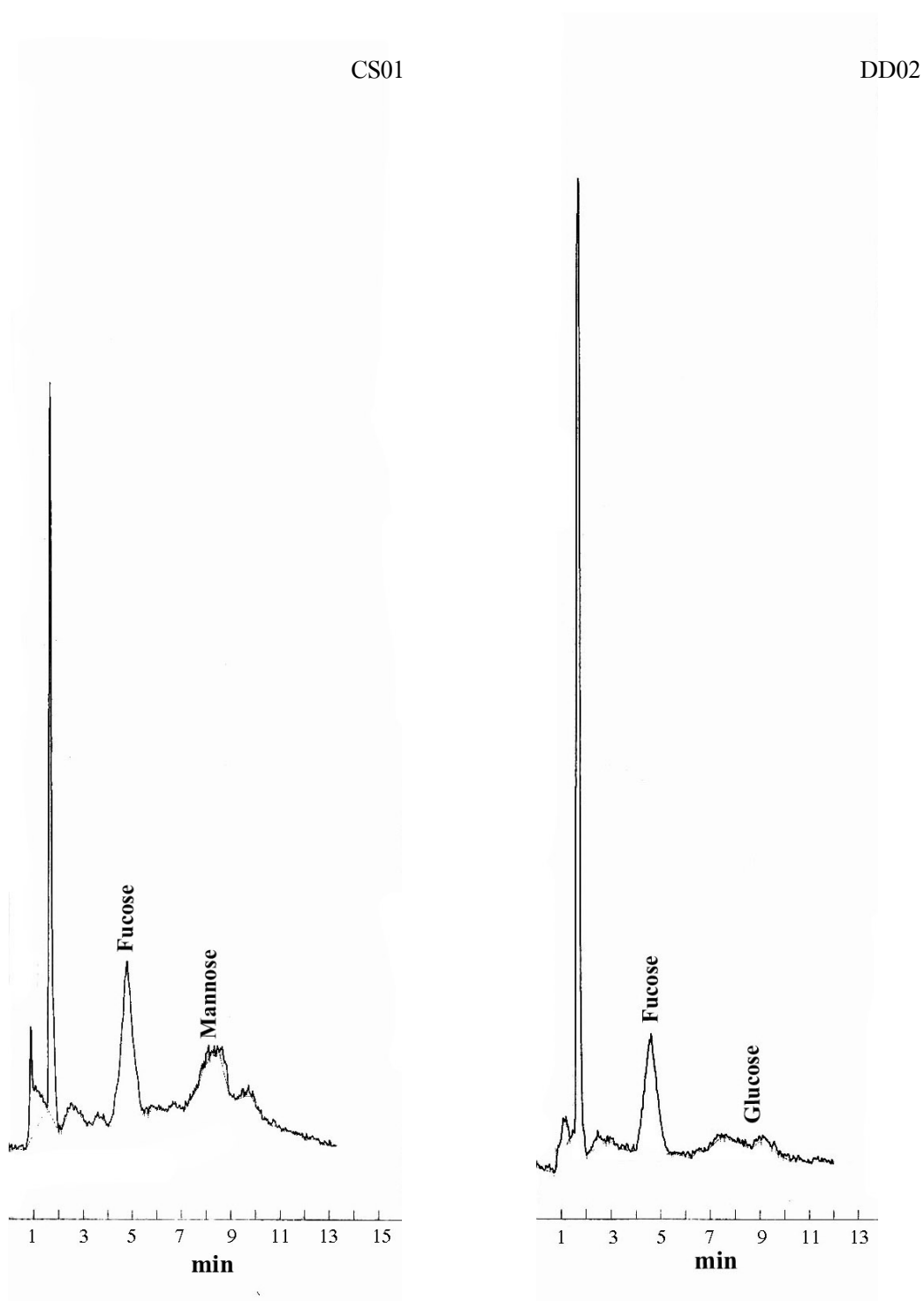
การตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธี TLC ในชนิดของน้ำตาลโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธี ไม่สามารถจำแนกชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายที่ศึกษา นำมาตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

#### 2.4 ผลการตรวจสอบชนิดของน้ำตาลจากสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

องค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดหยาบด้วยวิธี E1 และนำมาตรวจวิเคราะห์โดยวิธี HPLC พบว่า ทุกตัวอย่างมีน้ำตาลฟรุคโตส เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งพบปริมาณมากในสาหร่ายชนิด HC01 (12.35%) รองลงมาคือ แมนโนส ซึ่งตรวจพบได้ในตัวอย่างสาหร่ายชนิด CS01, PA03, PM02, SP01 และ SP03 แต่ไม่พบในตัวอย่างสาหร่ายชนิด DD02, HC01, PA01, PA02 และ TC02 ส่วนกาแลคโตส พบน้อยในชนิด PM02 และ SP03 ขณะที่กลูโคสจะพบในปริมาณน้อยที่สุด โดยพบในชนิด DD02 และ SP01 สำหรับน้ำตาลฟรุคโตสตรวจไม่พบในทุกตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 8-12)

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E1 และ  
ตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC

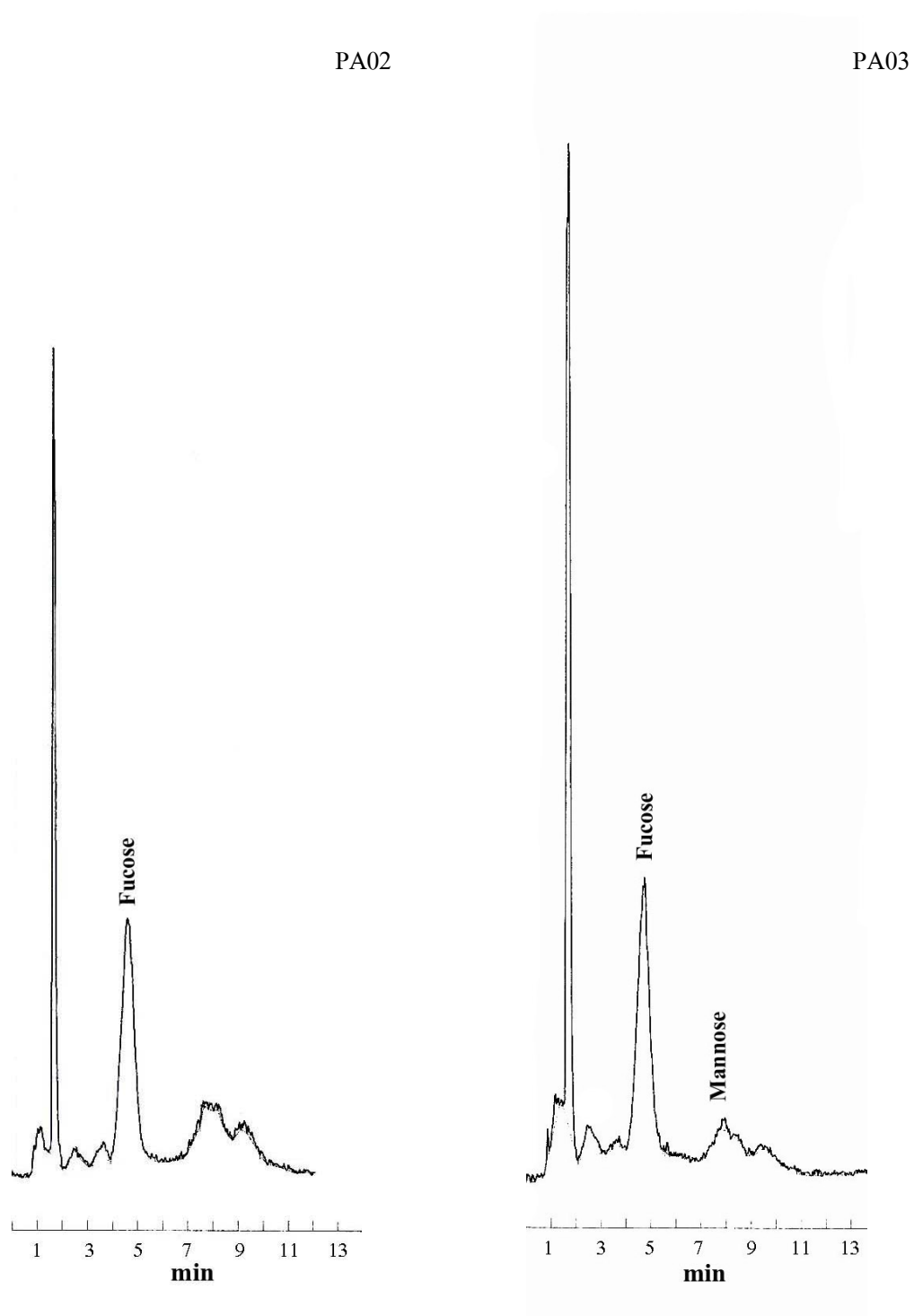
| ชนิดของน้ำตาล (%)<br>ชนิดของสาหร่าย | Glucose | Mannose | Fucose | Galactose | Fructose |
|-------------------------------------|---------|---------|--------|-----------|----------|
| CS01                                | -       | 0.035   | 3.9    | -         | -        |
| DD02                                | 0.095   | -       | 0.8    | -         | -        |
| HC01                                | -       | -       | 12.35  | -         | -        |
| PA01                                | -       | -       | 3.45   | -         | -        |
| PA02                                | -       | -       | 6.35   | -         | -        |
| PA03                                | -       | 0.25    | 6.65   | -         | -        |
| PM02                                | -       | 0.05    | 7.1    | 0.21      | -        |
| SP01                                | 0.09    | 0.45    | 2.1    | -         | -        |
| SP03                                | -       | 0.05    | 4.25   | 0.17      | -        |
| TC02                                | -       | -       | 6.15   | -         | -        |



ภาพที่ 8 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1; CS01 = *C. sinuosa* (ชลบุรี) และ DD02 = *D. dichotoma* (ชุมพร)



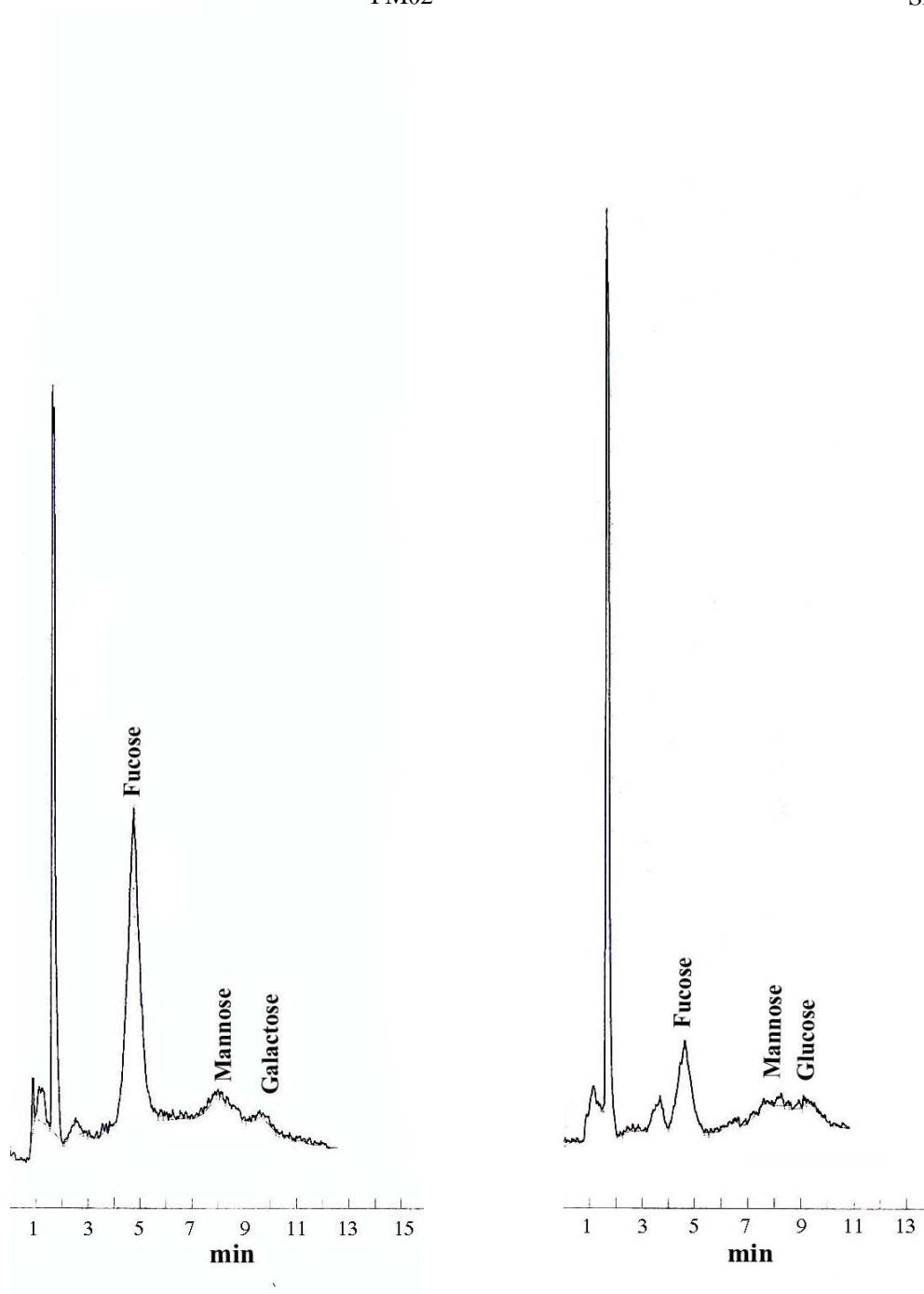
ภาพที่ 9 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1; HC01 = *H. clathratus* (ชลบุรี) และ PA01 = *P. australis* (ชลบุรี)



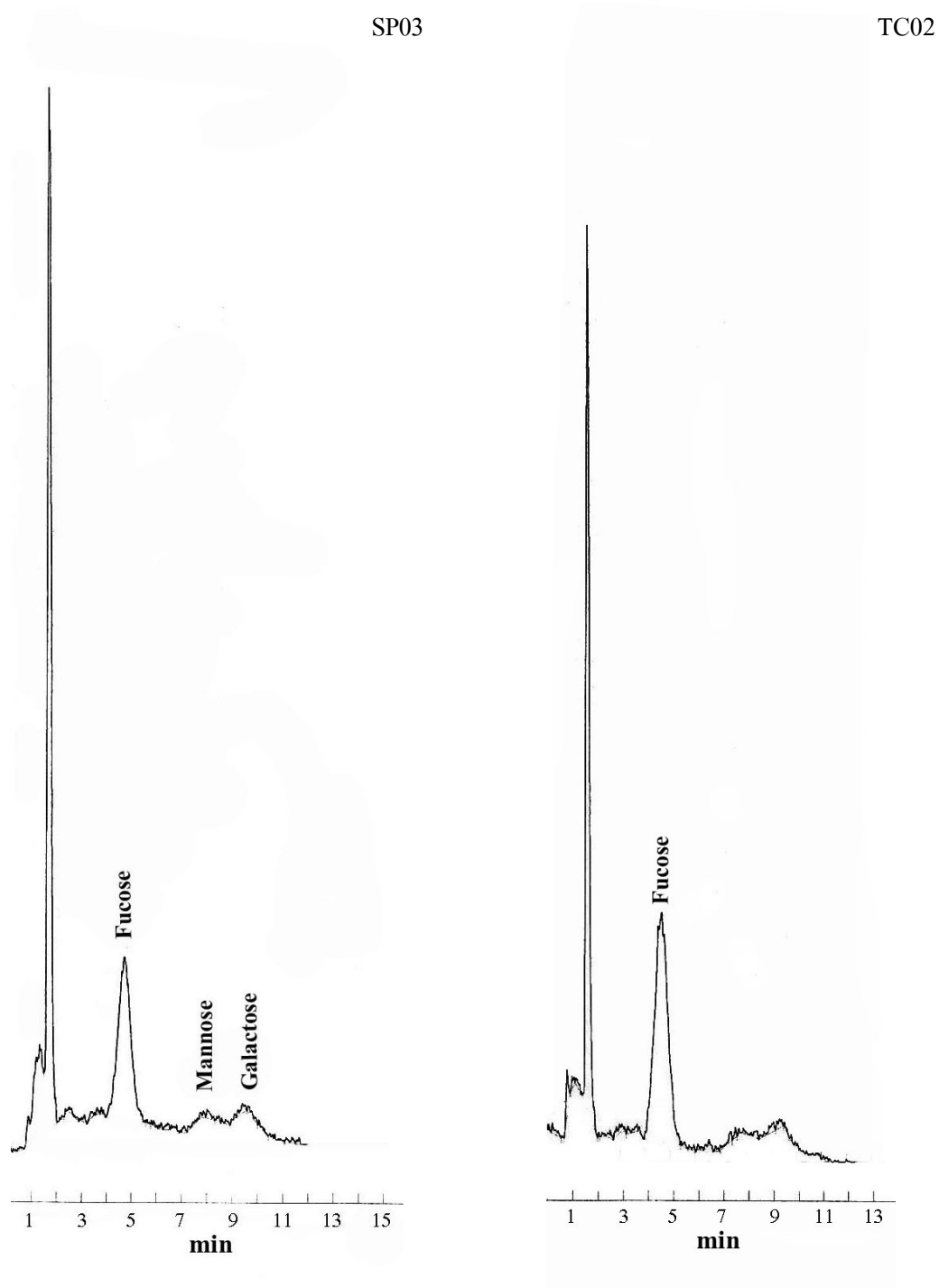
ภาพที่ 10 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1; PA02 = *P. australis* (ชุมพร) และ PA03 = *P. australis* (ระยอง)

PM02

SP01



ภาพที่ 11 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1; PM02 = *P. minor* (ชุมพร) และ SP01 = *S. polycystum* (ชลบุรี)



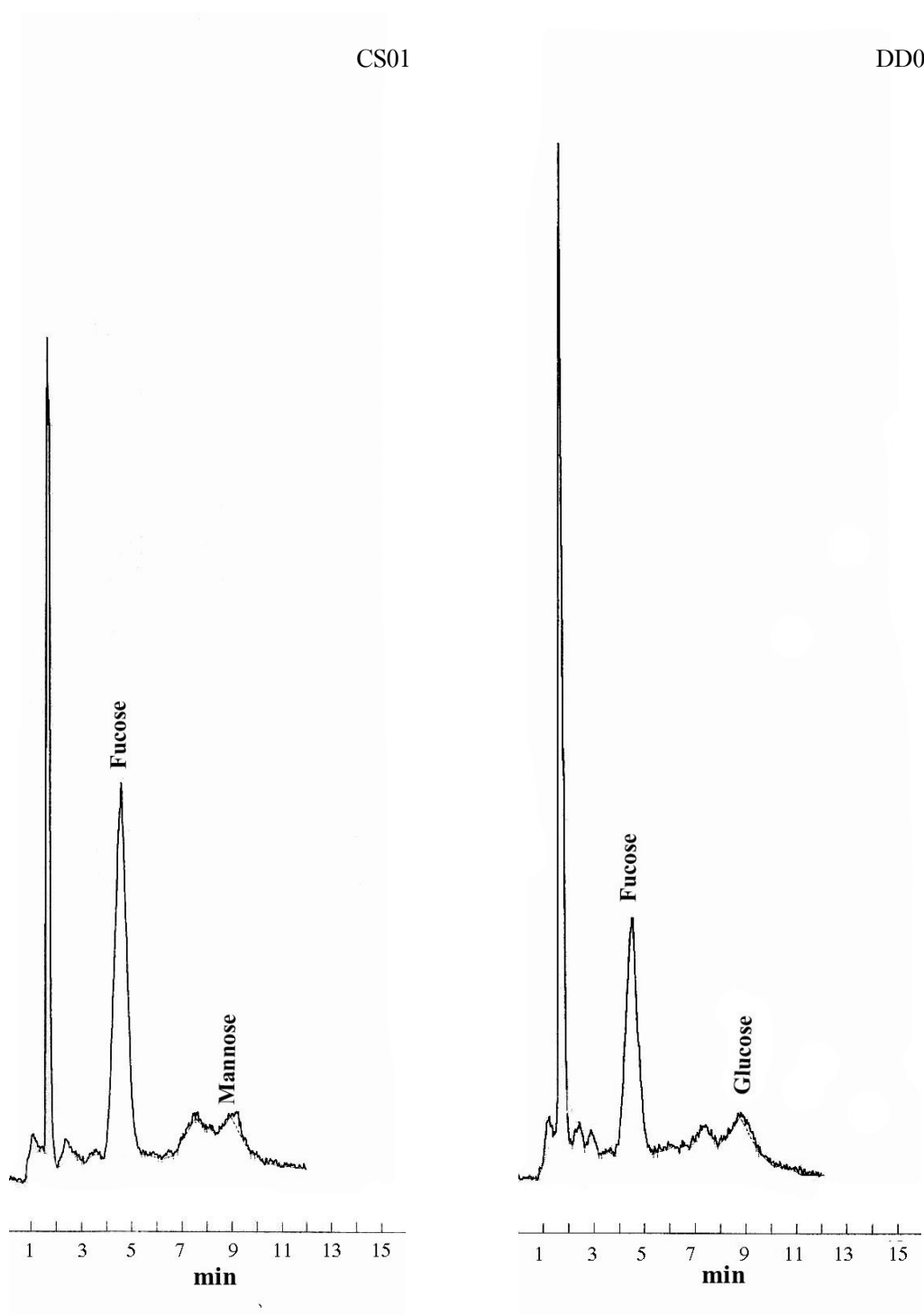
ภาพที่ 12 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ใน โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1; SP03 = *S. polycystum* (ระยอง) และ TC02 = *T. conoides* (ชุมพร)

องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 ซึ่งตรวจวิเคราะห์โดยวิธี HPLC (ตารางที่ 4, ภาพที่ 13-17) พบว่าสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ทุกตัวอย่างมีน้ำตาลฟรุคโตส เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งพบมากใน SP01 (9.095%) รองลงมาคือ กลูโคส ที่สามารถตรวจพบได้ใน DD02 และ TC02 และยังพบใน PA01 และ SP01 ในขณะที่แมนโนส และ กาแลคโตสตรวจพบในตัวอย่าง HC01 เท่านั้น และเช่นเดียวกับสารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 ผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC ไม่พบองค์ประกอบน้ำตาลประเภทฟรุคโตส ในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E2

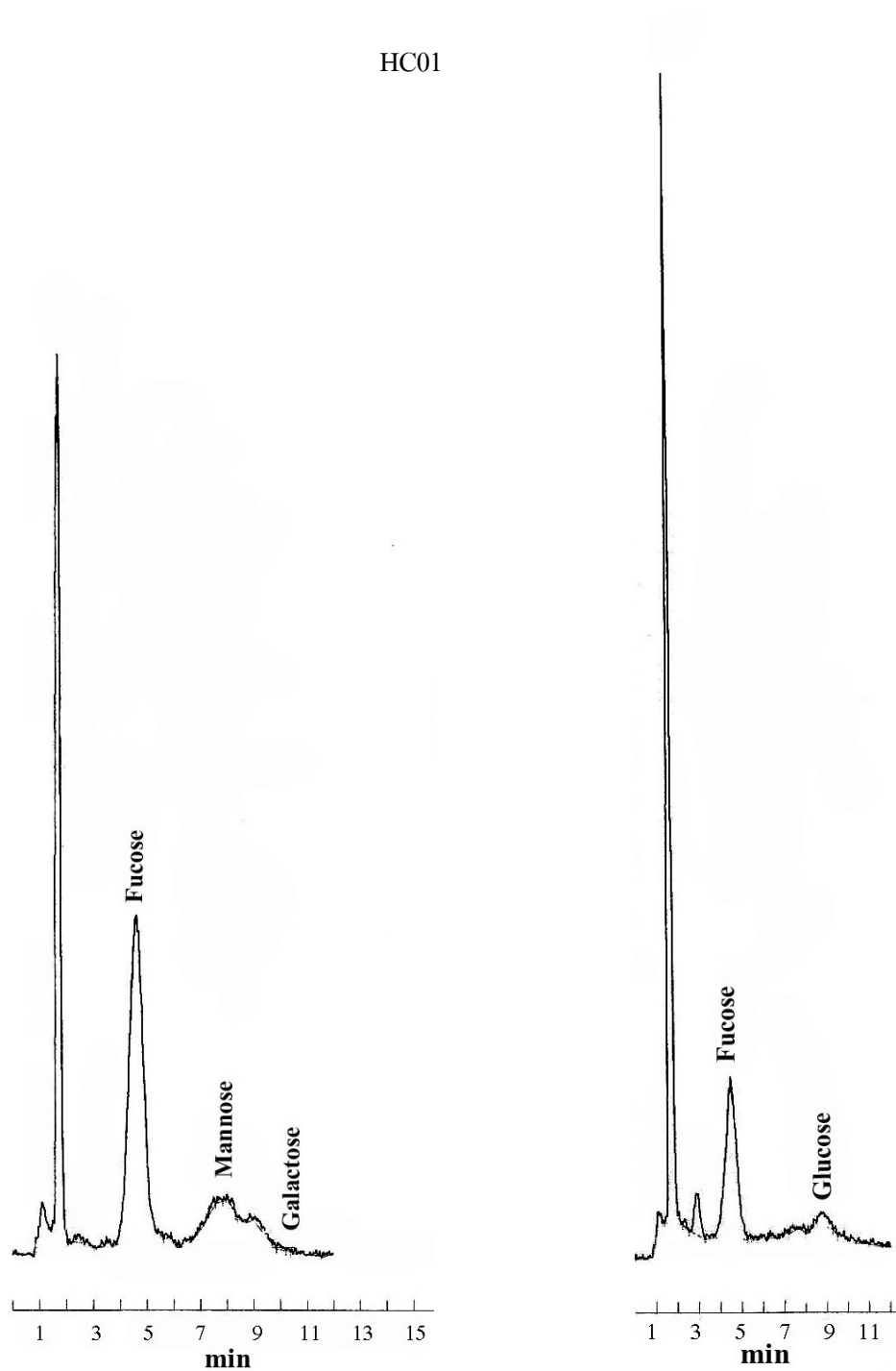
ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E2 และตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC

| ชนิดของน้ำตาล (%)<br>ชนิดของสาหร่าย | Glucose | Mannose | Fucose | Galactose | Fructose |
|-------------------------------------|---------|---------|--------|-----------|----------|
| CS01                                | -       | -       | 9.095  | -         | -        |
| DD02                                | 0.32    | -       | 5.75   | -         | -        |
| HC01                                | -       | 0.02    | 7.95   | 0.11      | -        |
| PA01                                | 0.45    | -       | 3.76   | -         | -        |
| PA02                                | -       | -       | 8.95   | -         | -        |
| PA03                                | -       | -       | 4.9    | -         | -        |
| PM02                                | -       | -       | 6.8    | -         | -        |
| SP01                                | 0.01    | -       | 3.8    | -         | -        |
| SP03                                | -       | -       | 5.75   | -         | -        |
| TC02                                | 0.146   | -       | 4.00   | -         | -        |

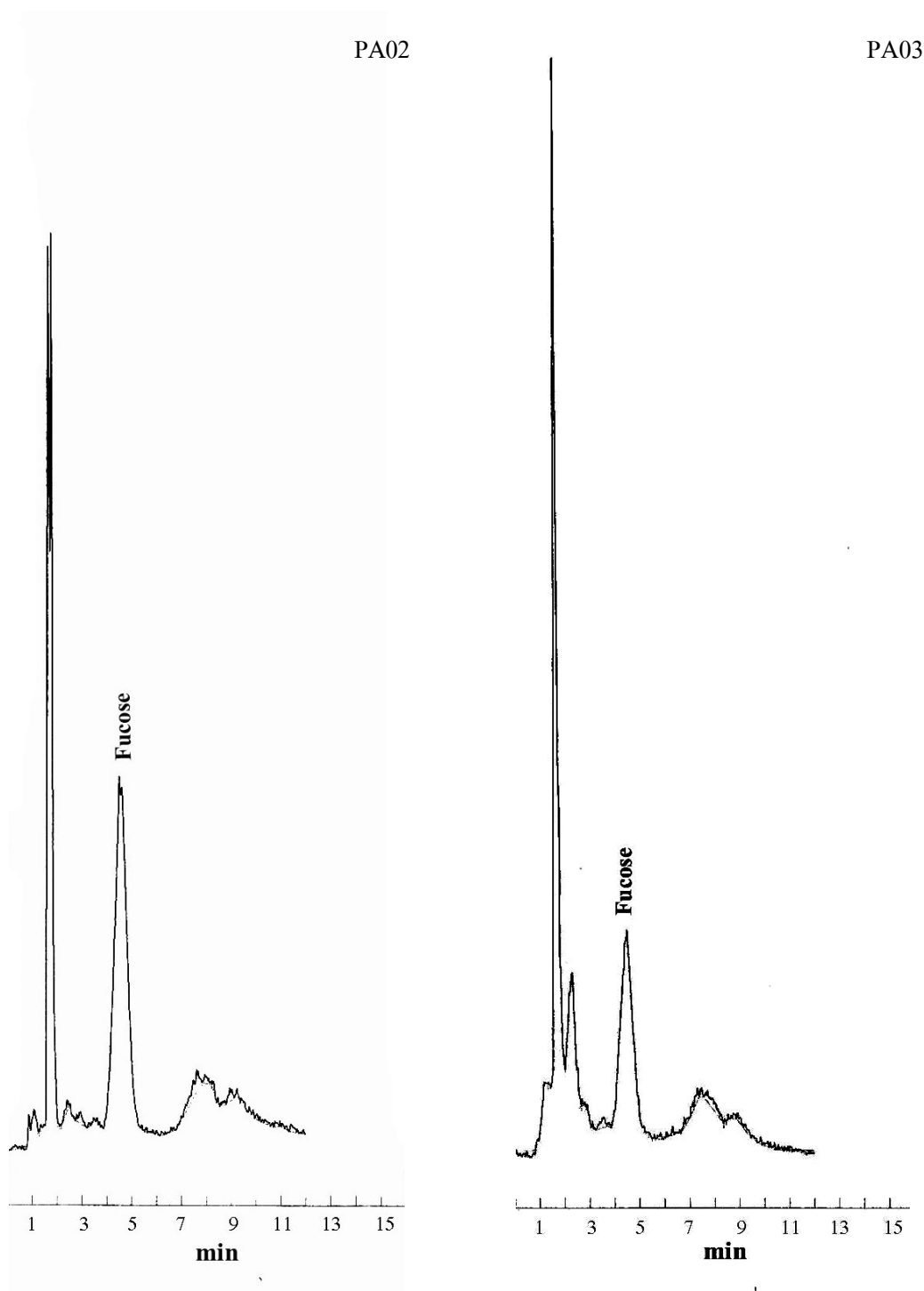




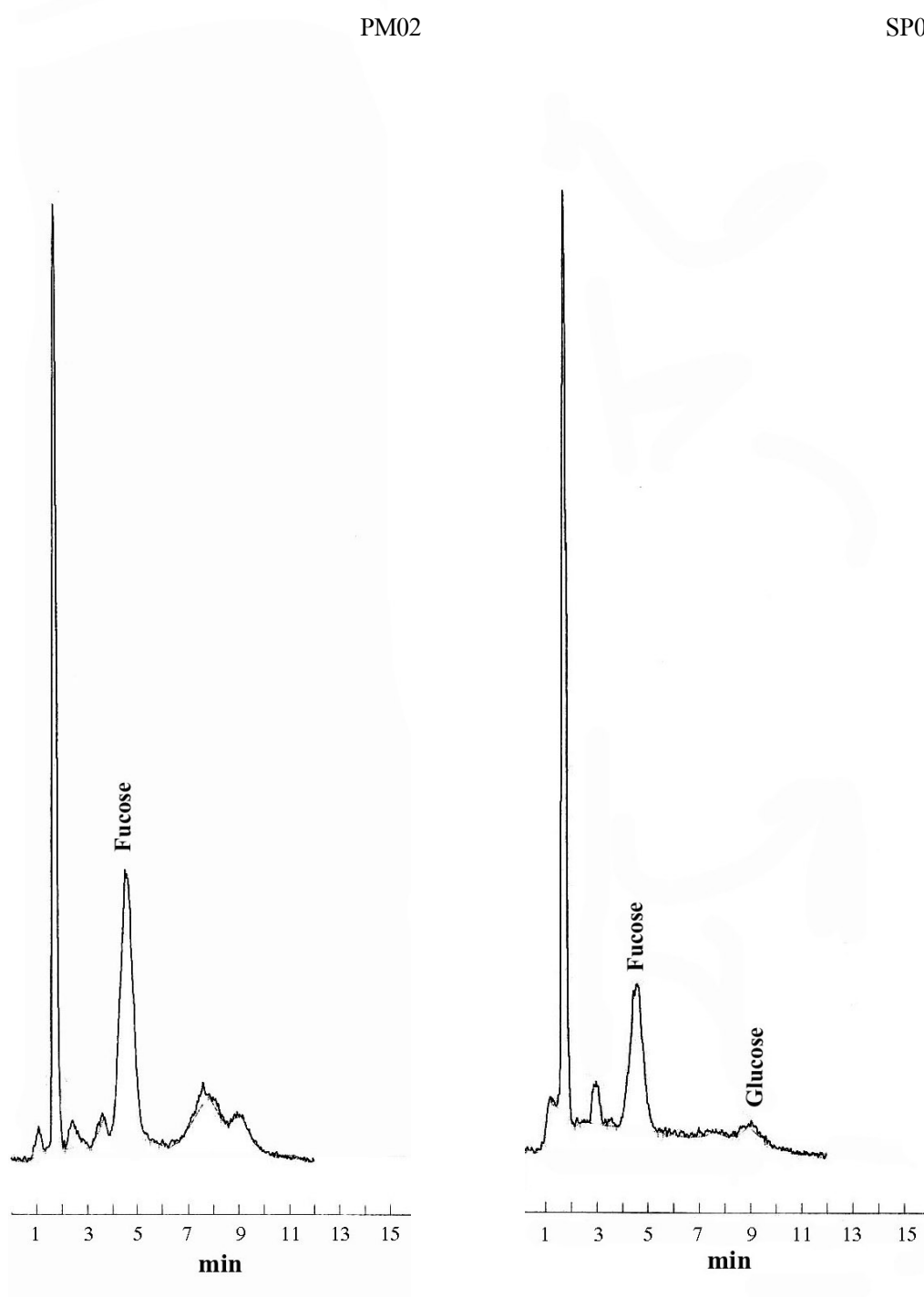
ภาพที่ 13 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเทคนิค HPLC ในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2; CS01 = *C. sinuosa* (ชลบุรี) และ DD02 = *D. dichotoma* (ชุมพร)



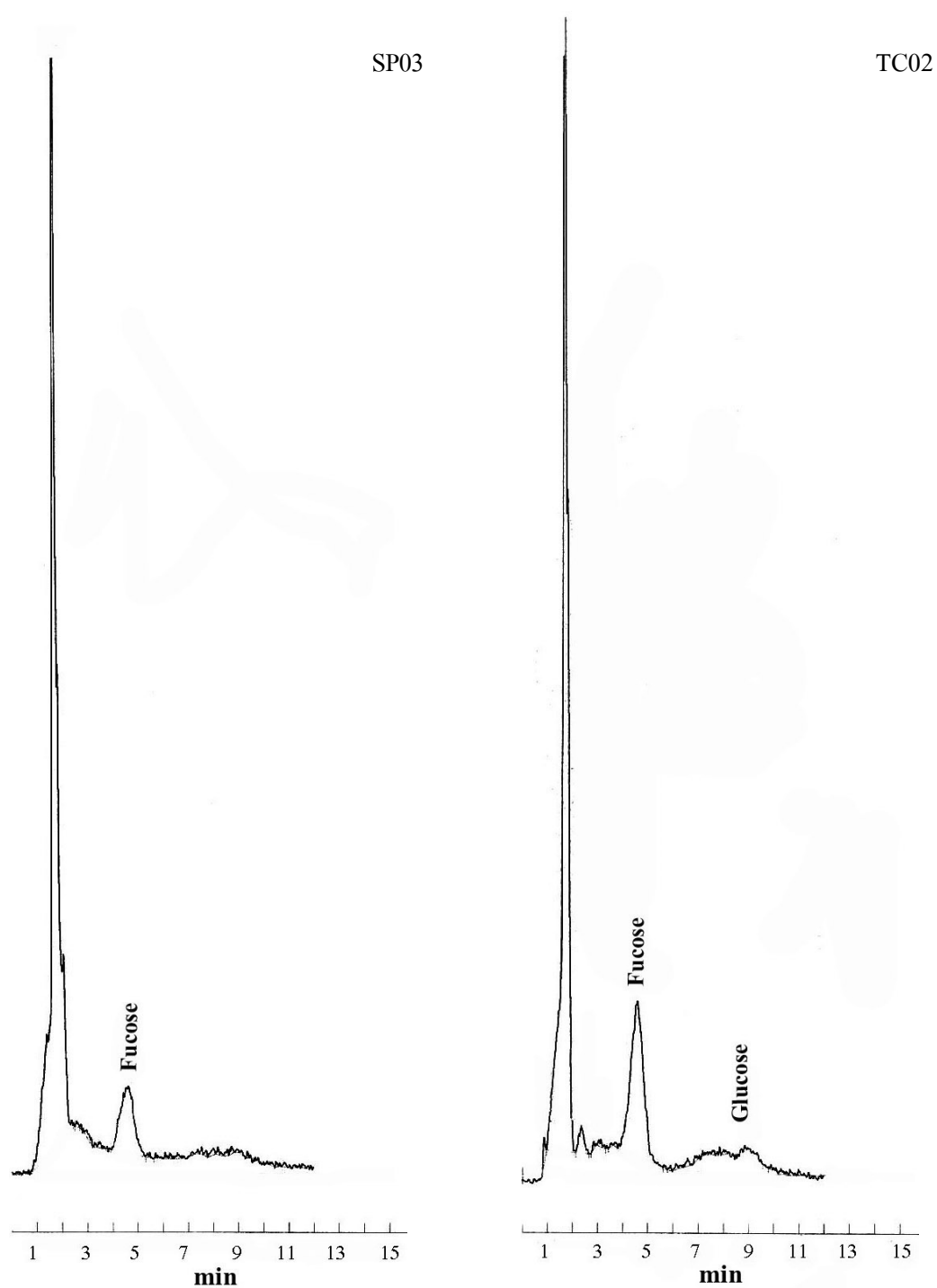
ภาพที่ 14 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย  
เทคนิค HPLC ในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2; HC01 = *H. clathratus* (ชลบุรี)  
และ PA01 = *P. australis* (ชลบุรี)



ภาพที่ 15 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย  
เทคนิค HPLC ในโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2; PA02 = *P. australis* (ชุมพร) และ  
PA03 = *P. australis* (ชลบุรี)



ภาพที่ 16 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย  
เทคนิค HPLC ในโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2; PM02 = *P. minor* (ชุมพร) และ  
SP01 = *S. polycystum* (ชลบุรี)



ภาพที่ 17 กราฟโครมาโตแกรมแสดงผลของการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย  
เทคนิค HPLC ในโพลิแซคคาไรด์ที่สกัดได้โดยใช้วิธี E2; SP03 = *S. polycystum* (ระยอง)  
และ TC02 = *T. conoides* (ชุมพร)

### 3. การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากผลทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรียแกรมลบชนิด *Aeromonas hydrophilla*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. harveyi* เชื้อยีสต์ *Candida albicans* และเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่ความเข้มข้น 2, 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml ของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธี จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด CS01, HC01, PA01, SP01, DD02, PA02, PM02, TC02, PA03 และ SP03 พบว่าการสกัดด้วยวิธี E1 สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จาก SP01 สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* โดยวัดส่วนของโซนใส (clear zone) มีขนาดความกว้าง  $0.122 \pm 0.004$  มิลลิเมตร เช่นเดียวกัน สารสกัดหยาบจากสาหร่ายสีน้ำตาล SP01 และ CS01 ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* เพียงชนิดเดียว โดยสารสกัดหยาบจากตัวอย่างสาหร่ายชนิด SP01 และ CS01 เกิดโซนใส วัดขนาดความกว้างของโซนใสได้  $0.123 \pm 0.003$  และ  $0.156 \pm 0.035$  มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ ภาคผนวกที่ ข4) สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธีนี้ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด 2 mg/ml อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25 และ 0.125 mg/ml ไม่มีผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 18 - 20 และตารางที่ 5-6) และผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางภาคผนวกที่ ค 22



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลที่ศึกษา

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ยังตรวจพบว่า สารสกัดสาหร่ายสีน้ำตาลที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ นั่น กลับมีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เกิดขึ้นตรงบริเวณที่วางแผ่นทดสอบการยับยั้ง (ภาพที่ 19) โดยเฉพาะสารที่สกัดได้ด้วยวิธี E1 พบว่ามีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด ตรงบริเวณรอบๆ ที่วางแผ่นทดสอบการยับยั้งเชื้อ โดยพบได้เกือบทุกตัวอย่างที่ทำการทดสอบยกเว้นในจุลินทรีย์ชนิด *Aeromonas hydrophila* และ *Aspergillus niger* ดังตารางที่ 5 ส่วนสารที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 พบว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ได้เป็นบางตัวอย่างดังตารางที่ 6 โดยจะพบว่า มีการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* เกิดขึ้นเมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาหร่ายชนิด CS01, HC01, PA02, PM02, SP03 และ TC02 และมีการเจริญของเชื้อ *E. coli* เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาหร่ายชนิด CS01, HC01, PM02, SP03 และ TC02 ส่วนเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่ามีการเจริญได้เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาหร่ายชนิด HC01 และ PA01 สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *A. hydrophilla* จะพบการเจริญ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาหร่ายชนิด PM01 และ PA01 ตามลำดับ ในขณะที่ *V. alginolyticus* จะไม่พบการเจริญของเชื้อ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาหร่ายชนิด DD02, PA02 และ SP01 เช่นเดียวกันกับเชื้อ *V. harveyi* ที่จะไม่พบการเจริญของเชื้อ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาหร่ายชนิด DD02 และ SP01 นอกจากนี้ไม่พบว่ามี การเจริญของเชื้อ *A. niger* ตรงบริเวณรอบแผ่นทดสอบเลย ในขณะที่พบการเจริญของ *C. albicans* ได้ เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดจากสาหร่ายเกือบทุกชนิด ยกเว้น สารสกัดจากสาหร่ายชนิด CS01 และ SP01



ภาพที่ 18 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดปกคลุมบริเวณรอบแผ่นทดสอบของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายที่ศึกษา

ตารางที่ 5 ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1

| ชนิดเชื้อจุลินทรีย์ \ ชนิดสารหยาบ | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>V. alginolyticus</i> | <i>V. harveyi</i> | <i>A. hydrophilla</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
|-----------------------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| CS01                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| DD02                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| HC01                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| PA01                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| PA02                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| PA03                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| PM02                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| SP01                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | +                  | -               |
| SP03                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| TC02                              | ×                  | ×              | ×                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |

หมายเหตุ บริเวณที่การยับยั้ง ++++ = มากที่สุด, +++ = ปานกลาง, ++ = น้อย, + = น้อยที่สุด, - = ไม่ยับยั้ง, × = กระตุ้นเจริญของเชื้อจุลินทรีย์



ตารางที่ 6 ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2

| ชนิดเชื้อจุลินทรีย์ / ชนิดสารหยาบ | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>V. parahaemolyticus</i> | <i>V. alginolyticus</i> | <i>V. harveyi</i> | <i>A. hydrophilla</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
|-----------------------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| CS01                              | ×                  | ×              | -                    | -                          | ×                       | ×                 | -                     | +                  | -               |
| DD02                              | -                  | -              | -                    | -                          | -                       | -                 | -                     | ×                  | -               |
| HC01                              | ×                  | ×              | ×                    | -                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| PA01                              | -                  | -              | ×                    | -                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| PA02                              | ×                  | -              | -                    | -                          | -                       | ×                 | ×                     | ×                  | -               |
| PA03                              | -                  | -              | -                    | -                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| PM02                              | ×                  | ×              | -                    | ×                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| SP01                              | -                  | -              | -                    | -                          | -                       | -                 | -                     | +                  | -               |
| SP03                              | ×                  | ×              | -                    | -                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |
| TC02                              | ×                  | ×              | -                    | -                          | ×                       | ×                 | -                     | ×                  | -               |

หมายเหตุ บริเวณที่การยับยั้ง ++++ = มากที่สุด, +++ = ปานกลาง, ++ = น้อย, + = น้อยที่สุด, - = ไม่ยับยั้ง, × = กระตุ้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์



**ภาพที่ 20** ผลการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด SP01จากการสกัดด้วยวิธี E1 และ E2 ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml (1 = ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของสารที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1, 2 = ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของสารที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2, 3 = ลักษณะโซนใสแสดงการยับยั้งเชื้อ *C. albicans*)

## วิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. ปริมาณของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล

ในการศึกษาครั้งนี้ การสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยวิธีสกัดร้อนจากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาลโดยการต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100°C (hot water extraction, E1) ซึ่งมีรายงานว่า สารสกัดหยาบที่ได้ส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกซัลเฟตโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำ (crude water soluble sulfated polysaccharide) (Asker *et al.*, 2007) ในขณะที่การสกัดโพลีแซคคาไรด์ด้วยวิธีสกัดร้อนจากตัวอย่างสาหร่าย โดยการบ่มในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่อุณหภูมิ 75°C (acid extraction, E2) มีรายงานว่า สารสกัดหยาบที่ได้ส่วนใหญ่ เป็นสารโพลีแซคคาไรด์จำพวกฟุกอยแดน (crude fucoidan) (Becker and Lowe, 2003) ในอดีตเคยมีรายงานไว้โดย Percival and Ross (1950) กล่าวอ้างโดย Berteau and Mulloy (2003) ไว้ว่าโพลีแซคคาไรด์ที่มีอยู่ในผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาล มีองค์ประกอบหลักเป็นพวก sulfated L-fucose ซึ่งสามารถสกัดออกมาได้โดยวิธีสกัดในน้ำร้อน หรือ สารละลายกรด โดยปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่ายและวิธีที่ใช้ในการสกัด (Ponce *et al.*, 2003; Asker *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2008) และยังขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมด้วย (Zvyagintseva *et al.*, 2003) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธี E1 มีปริมาณน้อยกว่าการสกัดโดยวิธี E2 ในสาหร่ายทุกตัวอย่าง ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ แม้ว่าสกัดจากสาหร่ายชนิดเดียวกันแต่ตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บจากแหล่งต่างกัน ปริมาณสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีค่าแตกต่างกัน ซึ่งเห็นได้จากตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี E2 สาหร่าย *Padina australis* ที่เก็บจากชลบุรี (PA01) มีปริมาณสารสกัดโพลีแซคคาไรด์มากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากระยอง (PA03) และชุมพร (PA02) นอกจากนี้ *Sargassum polycystum* (SP03) ที่เก็บจากระยอง ให้ปริมาณสารสกัดที่มีค่ามากกว่าตัวอย่างชนิดเดียวกันแต่เก็บจากชลบุรี (SP01) อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้มีค่าน้อยกว่าที่เคยมีรายงานไว้ในสาหร่ายสกุลเดียวกันนี้ในชนิด *Sargassum latifolium* (4.75%) ที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100°C (Asker *et al.*, 2007) และน้อยกว่าที่เคยมีรายงานใน *Sargassum fulvellum* และ *S. thunbergii* ซึ่งให้ปริมาณสารสกัดหยาบ 8.9 และ 9.6% ตามลำดับ (Kang *et al.*, 2008)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 มีปริมาณสารสกัดหยาบสูงสุดในสาหร่ายสีน้ำตาล *Hydroclathrus clathratus* (HC01) จากชลบุรี ( $19.69 \pm 0.23\%$ ) และมีค่า

ต่ำสุดในสาหร่ายสีน้ำตาล *Padina australis* (PA03) จากระยะของ  $(2.77 \pm 0.19\% \text{ w/w})$  เช่นเดียวกับการสกัดด้วยวิธี E1 ปริมาณสารสกัดหยาบที่สกัดได้โดยวิธี E2 จากสาหร่ายชนิดเดียวกันแต่เก็บจากแหล่งต่างกัน ปริมาณที่ได้มีค่าต่างกัน ดังจะเห็นได้จาก *Sargassum polycystum* ที่เก็บจากระยะของ (SP03) ให้ปริมาณสารสกัดที่มีค่ามากกว่าตัวอย่างที่เก็บจากชลบุรี (SP01) ปริมาณสารสกัดที่ได้มีค่าน้อยกว่าที่เคยมีรายงานไว้ในสาหร่ายชนิดเดียวกันที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก แต่ใช้ความเข้มข้น 0.1 N ที่อุณหภูมิ  $95^{\circ}\text{C}$  ซึ่งให้ปริมาณสารสกัดหยาบ  $22.3 \pm 4.51\%$  (Chotigeat *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารสกัดที่ได้แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีความเข้มข้น 2 N ซึ่งสูงกว่าที่รายงานไว้โดย Chotigeat *et al.* (2004) ที่ใช้กรดไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้น 0.1 N แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด  $95^{\circ}\text{C}$  ซึ่งสูงกว่าที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ( $75^{\circ}\text{C}$ ) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ สารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 และ E2 มีปริมาณสารสกัดแตกต่างกัน ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากโพลาลิดีที่มีประจุของน้ำที่ใช้ในวิธี E1 และกรดที่ใช้ในวิธี E2 เป็นตัวทำลายที่แตกต่างกัน (Percival and McDowell 1967; Rupérez *et al.*, 2002; Ponce *et al.*, 2003)

## 2. องค์ประกอบของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์

ในการศึกษาครั้งนี้ สารโพลีแซคคาไรด์จากตัวอย่างสาหร่ายที่สกัดได้ด้วยวิธี E1 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่าที่สกัดด้วยวิธี E2 ยกเว้นในตัวอย่างสาหร่ายชนิด CS01 ที่เก็บจากชลบุรี (ภาพที่ 4) โพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุดในสาหร่ายชนิด PM02 ( $55.95 \pm 0.72\%$ ) และมีค่าต่ำสุดในสาหร่ายชนิด TC02 ที่เก็บจากชุมพร ( $32.15 \pm 0.18\%$ ) และระหว่างสาหร่ายสกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิดกัน สาหร่ายชนิด PM02 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากกว่า ชนิด PA02 ที่เก็บจากชุมพร และชนิด PA01 จากชลบุรี และเช่นเดียวกันกับการสกัดด้วยวิธี E1 โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงที่สุดในตัวอย่างสาหร่ายชนิด PM02 ( $44.41 \pm 0.94\%$ ) แต่มีค่าต่ำสุดในสาหร่ายชนิด HC01 ( $10.46 \pm 0.52\%$ ) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสาหร่ายแต่ละชนิด ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกันตามชนิดของสาหร่าย เคยมีรายงานไว้ในสารสกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาล 3 ชนิดคือ *Laminaria cichorioides*, *L. japonica* และ *Fucus evanescens* เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากตัวอย่างที่ทำการสกัดแยกลำดับส่วนจากสาหร่ายทั้ง 3 ชนิด พบว่า ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในลำดับส่วนที่ 1 อยู่ในช่วง 20-25% และ ลำดับส่วนที่ 2 อยู่ในช่วง 26-32% (Zvyagintseva *et al.*, 2003) และโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดแยกลำดับส่วนจาก *Padina gymnospora* มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด 38.7% ต่ำสุด 3.2% (Silva *et al.*, 2005) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ มีค่าแปรผันขึ้นอยู่กับชนิด และแหล่งที่พบ นอกจากนี้ยังอาจ

ขึ้นอยู่กับฤดูกาลและอายุของสาหร่ายด้วย ดังเช่นที่เคยมีรายงานไว้ในสาหร่ายสีน้ำตาลสกุล *Laminaria* และ *Fucus* (Zvyagintseva *et al.*, 2003)

Zvyagintseva *et al.* (2003) กล่าวว่า องค์ประกอบที่สำคัญในโพลีแซคคาไรด์ในสาหร่ายทะเลสีน้ำตาล ส่วนใหญ่ได้แก่ ลามินาเลน ฟุกอยแคน และกรดแอลจินิก ซึ่งโดยทั่วไปมีอยู่ในปริมาณ 40 – 80% ของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง และภายในโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์เหล่านี้มีหมู่ซัลเฟตอยู่ในปริมาณเล็กน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย (Chevolot *et al.*, 1999; Rupérez *et al.*, 2002; Rioux *et al.*, 2007; Asker *et al.*, 2007; Rocha de Souza *et al.*, 2007) และโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณซัลเฟตสูงมักมีคุณสมบัติที่สำคัญในด้านการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งคุณสมบัติอื่นๆ เช่น anticoagulant (Chevolot *et al.*, 1999; Berteau and Mulloy, 2003; Hemmingson *et al.* 2006; Mohsen *et al.* 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ ปริมาณซัลเฟตที่มีอยู่ในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายสีน้ำตาลมีค่าแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิด และในบางตัวอย่างของสารสกัดหยาบจากตัวอย่างสาหร่ายชนิดเดียวกัน แต่เก็บจากต่างที่กัน มีปริมาณซัลเฟตที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ดังเห็นได้จากปริมาณซัลเฟตในสาหร่ายชนิด *Sargassum polycystum* และ *Padina australis* (ภาพที่ 5) และหากพิจารณาจากความสัมพันธ์ของปริมาณซัลเฟตกับคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสาหร่ายที่ศึกษาแล้ว (ซึ่งจะได้กล่าวรายละเอียดในหัวข้อถัดไป) สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถจัดกลุ่มปริมาณซัลเฟตออกเป็น พวกที่มีปริมาณซัลเฟตในระดับปานกลาง (5 - 9%) ได้แก่ สารสกัดจากสาหร่ายชนิด *Colpomenia sinuosa*, *Dictyota dichotoma*, *Padina australis* และ *Padina minor* และกลุ่มที่มีปริมาณซัลเฟตในระดับค่อนข้างสูง (10 - 18%) ได้แก่ สารที่สกัดจากสาหร่ายชนิด *Sargassum polycystum*, *Hydroclathrus clathratus* และ *Turbinaria conoides* โดยโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1 ปริมาณซัลเฟตระหว่างชนิดสาหร่าย มีค่าต่ำสุด  $5.83 \pm 0.28\%$  ในสาหร่ายชนิด CS01 และสูงสุด  $18.10 \pm 0.25\%$  ในชนิด HC01 และโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E2 มีปริมาณซัลเฟตระหว่างชนิดสาหร่ายต่ำสุด  $9.74 \pm 1.49\%$  ในสาหร่ายชนิด DD02 และสูงสุด  $14.22 \pm 0.69\%$  ในชนิด CS01 สำหรับโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E1 และ E2 จากสาหร่ายชนิด SP01 และ SP03 มีปริมาณซัลเฟตที่สามารถจำแนกได้ ในกลุ่มที่มีปริมาณซัลเฟตระดับค่อนข้างสูงอยู่ในช่วงระหว่าง 10 – 11% ซึ่งใกล้เคียงกับที่รายงานไว้ในสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด *Stoechospermum marginatum* (10%) ที่เก็บจากทะเล Arabian (Adhikari *et al.*, 2006) แต่น้อยกว่าที่เคยมีรายงานในสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum latifolium* ที่เก็บจาก Red Sea ประเทศซาอุดีอาระเบีย ซึ่งมีปริมาณซัลเฟตสูงสุดถึง 22.10% (Asker *et al.*, 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 จากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด PA01, PA02 และ PA03 ให้สารสกัดหยาบที่มีปริมาณซัลเฟต ระดับปานกลาง (~ 9%) ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณซัลเฟตที่ได้จากวิธีสกัดแบบ E2 (~

10%) แต่มีค่าน้อยกว่าที่เคยมีการศึกษาใน *Padina gymnospora* ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟตมีความแตกต่างกันในแต่ละลำดับส่วนของสารโพลีแซคคาไรด์ที่แยกได้หลังจากทำการแยกสารแบบลำดับส่วนโดยการใช้อะซิโตนแล้ว พบว่าส่วนแรกที่แยกได้มีปริมาณซัลเฟต 18.40% และส่วนที่สองมีปริมาณซัลเฟต 27.57% (Rocha de Souza *et al.*, 2007)

สำหรับองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 6 สกุล ทุกตัวอย่างมีน้ำตาลฟรุคโตส เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมา คือ แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส ตามลำดับ แต่ไม่พบน้ำตาลฟรุคโตส ในทุกตัวอย่าง ผลการศึกษาที่คล้ายคลึงกันเคยมีรายงานไว้ในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จาก *Sargassum stenophyllum* ซึ่งมีน้ำตาลประเภท ฟรุคโตส กาแลคโตส แมนโนส ไชโลส กลูโคส และกรดยูโรนิก (Dias *et al.*, 2008) เป็นองค์ประกอบหลัก เช่นเดียวกับ Usov *et al.* (2004) ซึ่งรายงานว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จาก *Colpomenia peregrine* ประกอบด้วย ฟรุคโตส ไชโลส และกาแลคโตส เป็นน้ำตาลหลักที่พบมาก แต่สามารถพบกลูโคส แมนโนสได้เช่นเดียวกัน ในการศึกษาครั้งนี้ ผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลด้วย HPLC พบน้ำตาลกาแลคโตส ในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E1 จากตัวอย่างสาหร่ายชนิด PM02 และ SP03 และในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดด้วยวิธี E2 จากตัวอย่างสาหร่ายชนิด HC01 ซึ่งมีองค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวยุ่คล้ายคลึงกับโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก *Laminaria japonica* ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลฟรุคโตสเป็นองค์ประกอบหลัก แต่เมื่อนำสารสกัดหยาบนี้มาแยกลำดับส่วนพบว่าสารที่แยกได้ในลำดับที่ 1 และ ลำดับที่ 3 มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลัก (Wang *et al.*, 2008) ในผลการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายทั้ง 6 สกุลนี้โดยวิธี HPLC สามารถยืนยันได้จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าในสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ น่าจะมี fucoidan เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (Ponce *et al.*, 2003; Chandía and Matsuhira, 2008) ซึ่งรายงานว่า สารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลฟรุคโตส เป็นองค์ประกอบหลัก และพบมากในสารจำพวก fucoidan

องค์ประกอบของสารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ศึกษาในครั้งนี้ นั้น อาจกล่าวเบื้องต้นได้ว่าในสารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลฟรุคโตสเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบอื่นๆ ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งนี้เนื่องจากโดยทั่วไปเป็นที่ทราบกันว่าโพลีแซคคาไรด์ในสาหร่ายสีน้ำตาล เป็นสารจำพวกเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide) โดยมีองค์ประกอบประเภทน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสาหร่าย และแม้แต่ในสาหร่ายชนิดเดียวกันยังขึ้นอยู่กับฤดูกาล และระยะของการเจริญเติบโตด้วย ดังที่เคยมีรายงานในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์จาก *Laminaria cichorioides* ซึ่งจะมี

การสะสมสารโพลีแซคคาไรด์ในรูปของ laminaran และ fucoidan สูงสุดในช่วงที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ (Zvyagintseva *et al.*, 2003) และในโครงสร้างของสารโพลีแซคคาไรด์เมื่อทำการแยกลำดับส่วนของสารจะประกอบไปด้วย สารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณซัลเฟตสูง และสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณซัลเฟตต่ำ ดังเช่นที่เคยมีรายงานไว้ในสารสกัดจาก *Undaria pinnatifida* ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 2 ส่วนหลักๆ ได้แก่ สารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณกรดยูริกสูง แต่มีปริมาณซัลเฟตต่ำ และสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณกรดยูริกต่ำ ปริมาณซัลเฟตสูง เช่นเดียวกับสารสกัดจาก *Sargassum stenophyllum* สามารถแบ่งได้ 2 ส่วนหลักเช่นกัน คือส่วนของสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณกรดกลูโรนิกสูง ปริมาณซัลเฟตต่ำ และส่วนของสารโพลีแซคคาไรด์ ที่มีปริมาณกรดกลูโรนิกต่ำ ปริมาณซัลเฟตสูง (Duarte *et al.*, 2001; Hemmingson *et al.*, 2006)

### 3. ผลของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 9 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรียแกรมลบชนิด *Aeromonas hydrophilla*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. harveyi* เชื้อยีสต์ *Candida albicans* และเชื้อรา *Aspergillus niger* ซึ่งพบว่าสารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด SP01 และ CS01 ที่สกัดด้วยวิธี E1 สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ได้เพียงชนิดเดียว แต่ไม่ให้เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ทดสอบ เช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธี E2 สามารถทำการยับยั้งเชื้อยีสต์ *C. albicans* ได้จากสาหร่ายชนิด SP01 และสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากตัวอย่างสาหร่ายชนิดอื่นที่เหลือก็ไม่แสดงผลยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 2 mg/ml เช่นกัน ผลการทดลองนี้ตรงข้ามกับรายงานการศึกษาของ Chotigeat *et al.* (2004) ซึ่งทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารฟุคอยเดนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Sargassum polycystum* และพบว่าให้ผลยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ที่ระดับความเข้มข้น 12.0, 12.0 และ 6.0 mg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณความเข้มข้นที่ใช้นี้น้อยกว่าและสูงกว่าที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ผลการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อพิจารณาจากปริมาณซัลเฟตเพียงอย่างเดียว ยังไม่สามารถสรุปประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ศึกษาได้อย่างชัดเจน แม้ว่าสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากตัวอย่างสาหร่ายทั้ง 6 สกุลนี้ จะมีองค์ประกอบของซัลเฟตในปริมาณสูงในบางชนิดก็ตาม เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีและปริมาณหมู่ซัลเฟตมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารโพลีแซคคาไรด์ (Berteau and Mulloy, 2003) และดังเช่นที่กล่าวอ้างรายงานไว้ข้างต้นว่าโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณซัลเฟตสูงมักมี

คุณสมบัติที่สำคัญในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และดังที่มีรายงานการศึกษาในสาหร่ายสีน้ำตาลหลายชนิดที่ให้สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณซัลเฟตสูง แต่มีผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน (Ponce *et al.*, 2003; Adhikari *et al.*, 2006; Asker *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังเคยมีรายงานการทดสอบน้ำตาลบางชนิดมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วย (Zemek *et al.*, 1985) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดโดยวิธี E1 และ E2 มีปริมาณน้ำตาลน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนของปริมาณสารสกัดหยาบที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นในการทดสอบจำเป็นต้องใช้สารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณมาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานใน *Sargassum polycystum* ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจาก *V. harveyi* ได้ที่ความเข้มข้น 12 mg/ml (Chotigeat *et al.*, 2004) อีกทั้งในสารสกัดหยาบที่สกัดได้นั้น อาจจะมีสารประกอบอื่นๆ ที่ปะปนออกมาด้วย เช่น สารสีของสาหร่าย ที่ทำให้การยับยั้งของเชื้อจุลินทรีย์ในการสกัดทั้ง 2 วิธี ดังที่มีรายงานของ Kaewsrithong *et al.* (2007) ที่ทำการสกัดสาหร่ายโดยใช้ methanol, ethanol และ dichloromethane ในการสกัดสารจำพวก terpenoids, flavonoids และ alkaloids จาก *Padina australis*, *Sargassum polycystum* และ *Turbinaria conoides* ซึ่งสามารถให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus*

นอกจากนี้ ความแตกต่างในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์นี้อาจเป็นผลมาจากตัวอย่างสาหร่ายที่เก็บจากสภาพแวดล้อมต่างกัน ดังเช่น Salvadori *et al.* (2007) รายงานไว้ว่าการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสาหร่ายทะเลแปรผันไปตามสภาพภูมิประเทศที่เก็บตัวอย่าง และความแตกต่างเหล่านี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางนิเวศ เช่น แสงและสารอาหาร (Martí *et al.*, 2004) และ Salvadori *et al.* (2007) ยังกล่าวด้วยว่าความแตกต่างในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับฤดูกาลที่เก็บตัวอย่างสาหร่าย โดยตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลและสีแดงที่เก็บในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วงให้ผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด แต่สาหร่ายสีเขียวให้ผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สูงสุดในตัวอย่างที่เก็บช่วงฤดูร้อน ดังนั้นอาจนำมาใช้สันนิษฐานในการศึกษาครั้งนี้ได้ว่า การที่สารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลเกือบทุกตัวอย่างไม่แสดงผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ อาจเป็นเพราะตัวอย่างสาหร่ายที่ศึกษา เก็บมาในช่วงฤดูร้อน จึงไม่แสดงผลการทดสอบที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาที่ยืนยันความสัมพันธ์และสาเหตุที่แท้จริงของการแปรผันตามฤดูกาลและปัจจัยทางนิเวศกับประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารโพลีแซคคาไรด์ โดยเฉพาะกับการศึกษาในสาหร่ายสีน้ำตาลของไทย และเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้สารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลบางชนิด เช่น *Hydroclathrus clathratus* และ *Colpomenia sinuosa* ที่มีปริมาณซัลเฟตค่อนข้างสูง แต่กลับไม่แสดงผลยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งตรงข้ามกับที่เคยมีรายงานไว้ว่าสาหร่ายที่มี



ปริมาณซัลเฟตสูงจะมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Berteau and Mulloy, 2003) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบยืนยัน เพื่อหาข้อสรุปต่อไป

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

1. สารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) ได้ปริมาณสารสกัดหยาบ มากที่สุดในสาหร่ายชนิด SP03 รองลงมาคือ CS01 และ สาหร่ายที่มีปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ต่ำสุด คือ สาหร่ายชนิด DD02
2. โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2 mol/L ที่อุณหภูมิ 75°C (E2) ได้ปริมาณสารสกัดหยาบมากที่สุดในสาหร่ายชนิด HC01 และน้อยที่สุดในชนิด PA03
3. สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 มีมากกว่าที่ได้จากการสกัดโดยวิธี E1 ในทุกตัวอย่าง
4. โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดในสาหร่ายชนิด PM02 รองลงมาคือ สาหร่ายชนิด PA03 และ PA02 ตามลำดับ และ ต่ำสุดในสาหร่ายชนิด TC02
5. โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 มีคาร์โบไฮเดรตสูงสุดในสาหร่ายชนิด PM02 ขณะที่สาหร่ายชนิด HC01 ให้สารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยที่สุด
6. คาร์โบไฮเดรตในโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยวิธี E1 มีปริมาณสูงกว่าที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2
7. ปริมาณซัลเฟตในสารสกัดโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 มีค่าสูงสุดในสาหร่ายชนิด HC01 และ ต่ำสุดในสาหร่ายชนิด CS01 ในขณะที่การสกัดด้วยวิธี E2 สาหร่ายชนิด CS01 มีปริมาณซัลเฟตสูงสุด และต่ำสุดในสาหร่ายชนิด DD02 โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E2 มีปริมาณซัลเฟตสูงเกือบทุกตัวอย่าง อีกทั้งสาหร่ายสีน้ำตาลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ยังสามารถแบ่งสารโพลีแซคคาไรด์ออกเป็น พวกที่มีปริมาณซัลเฟตในระดับปานกลาง (5-9%) ได้แก่ สารสกัดจากสาหร่ายชนิด *Colpomenia sinuosa*, *Dictyota dichotoma*, *Padina australis* และ

*Padina minor* และกลุ่มที่มีปริมาณซัลเฟตในระดับค่อนข้างสูง (10-18%) ได้แก่ สารที่สกัดจากสาหร่ายชนิด *Sargassum polycystum*, *Hydroclathrus clathratus* และ *Turbinaria conoides*

8. องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากสาหร่ายสีน้ำตาลทั้ง 6 สกุล ทุกตัวอย่างมีน้ำตาลฟรุคโตส เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือ แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส ตามลำดับ แต่ไม่พบน้ำตาลฟรุคโตส ในทุกตัวอย่าง

9. สารโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากตัวอย่างสาหร่ายสีน้ำตาลชนิด SP01 และ CS01 สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ได้เพียงชนิดเดียว และสามารถแสดงผลการยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 2 mg/ml ในการศึกษาครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่า ส่วนใหญ่ตัวอย่างสารสกัดที่ไม่ให้ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ แต่กลับให้ผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยวิธี E1 ซึ่งตรวจพบว่ามี น้ำตาลประเภทแมนโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย

#### ข้อเสนอแนะ

1. สาหร่ายที่มีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาควรจะเป็นสาหร่ายที่มีปริมาณมาก สามารถเก็บผลผลิตได้มาก พบได้ทุกฤดูกาล เช่น สกุล *Sargassum* หรือ *Padina*
2. ควรทำการศึกษาปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และฤดูกาลที่เก็บสาหร่ายร่วมด้วย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสาหร่ายสีน้ำตาล
3. ควรทำการศึกษาโครงสร้างของสารโพลีแซคคาไรด์จากสาหร่ายสีน้ำตาลเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการศึกษาต่อไป
4. นอกจากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งด้านเชื้อจุลินทรีย์แล้ว ยังควรมีการศึกษาทางด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาการแข็งตัวของเลือด เป็นต้น เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพ และพัฒนาการศึกษาของสารโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายทะเลในประเทศไทยให้มีความหลากหลาย

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนภานันท์ ลีวมนันต์. 2527. **สาหร่าย**. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_, ชิดารัตน์ น้อยรักษา และชัชวีร์ แก้วสุริยิต. 2550. **หนังสือชุดเกาะคราม เรื่อง สาหร่ายทะเล บริเวณเกาะครามและเกาะใกล้เคียง**. บริษัทเวิร์ค สแควร์ จำกัด. กรุงเทพฯ.

นัยนา เพชรแท้. 2529. **อนุกรมวิธานของสาหร่ายทะเลที่เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พ้วน เฟ่งเซ้ง. 2535. **ศึกษาองค์ประกอบของชนิดของสาหร่ายทะเลที่พบในปัจจุบันกับที่เคยพบในอดีตที่ อ่าวเพ จ. ระยอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพิน ภูมิภมร. 2523. **การโบไฮเดรตในอาหาร: โพลีแซคคาไรด์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อักษร ศรีเปล่ง. 2529. **สาหร่าย**. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adhikari, U., C. G. Mateu, K. Chattopadhyay, C. A. Pujol, E. B. Damonte and B. Ray. 2006.

Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*.

**Phytochemistry** 67: 2474-2482.

Angulo, Y. and B. Lomonte. 2003. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline

snake venom myotoxic phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochemical pharmacology** 66: 1993-2000.

Asker, M. S. M., S. F. Mohamed, F. M. Ali and O. H. El-Sayed. 2007. Chemical structure and

antiviral activity of water-soluble sulfated polysaccharides from *Sargassum latifolium*.

**Journal of applied sciences research** 3(10): 1178-1185.

- Bansemir, A., M. Blume, S. Schröder and U. Lindequist. 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture** 252: 79-84.
- Becker, D.J., and J.B. Lowe. 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiology** 13: 41R – 53R.
- Berteau, O., and B. Mulloy. 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology** 13: 29R – 40R.
- Bilan, M. I. and A. A. Grachev, N. E. Ustuzhanina, A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev and A. I. Usov. 2002. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* polysaccharides of algae. **Carbohydrate research** 337: 719-730.
- Bold, H. C. and M. J. Wynne. 1978. **Introduction to the Algae**. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, United States of America.
- Chandía, N. P. and B. Matsuhira. 2008. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. **International journal of biological macromolecules** 42: 235-240.
- Chapman, V. J. 1962. **The Algae**. St Martin's Press Inc., New York.
- Chevolot, L., A. Foucault, F. Chaubet, N. Kervarec, C. Siquin, A. M. Fisher and C. Boisson-Vidal. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. **Carbohydrate Research** 319: 154 – 165.
- Chotigeat, W., S. Tongsupa, K. Supamataya and A. Phongdara. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture** 233: 23-30.

- Church, F. C., J. B. Meade, R. E. Treanor and H. C. Whinna. 1989. Antithrombin Activity of Fucoidan. **Journal of biological chemistry** 264. 3618-3623.
- Craigie, J. S., Z. C. Wen and J. P. van der Meer. 1984. Interspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agar from *Gracilaria* spp. **Botanica marina** 27: 55-61.
- Darmstadt, M. E. 1980. **Dyeing Reagents for Thin layer and Paper Chromatography**. B. Grimm Heal Thcare Co. Ltd, Bangkok.
- Dias, P. F., J. M. Siqueira Jr, M. Maraschin, A. G. Ferreira, A. R. Gagliardi and R. Valle. 2008. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sagassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular research** 75: 34-44.
- Duarte, M. E. R., M. A. Cardoso, M. D. Nosedá and A. S. Cerezo. 2001. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate research** 333: 281-293.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical chemistry** 28: 350-356.
- Espeche, M. E., E. R. Fraile and A. M. S. Mayer. 1984. Screening of Argentine marine algae for antimicrobial activity. **Hydrobiologia** 116/117: 525-528.
- Güven, K. C., B. Güvener and E. Güler. 1999. Pharmacological Activities of Marine Algae. pp 67-92. In Akatsuka I. **Introduction to applied phycology**. SPB Academic Publishing bv, The Hague, Netherlands.

- Hemmingson, J. A., R. Falshaw, R. H. Furneaux and K. Thompson. 2006. Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (phaeophyta). **J appl phycol** 18: 185-193.
- Immanuel, G., V. C. Vincybai, V. Sivaram, A. Palavesam and M. P. Marian. 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture** 236: 53-65.
- Jing-wen, M. and T. Wei-ei. 1984. Screening for antimicrobial activities in marine algae from the Qingdao coast, China. **Hydrobiologia** 117: 517-520.
- Kaewsrithong, J., K. Intarak, T. Longpol, V. Chairgulprasert, S. Prasertsongsakun, C. Chotimakorn and T. Ohshima. 2007. Antibacterial activity and bioactive compounds of some brown algae from Thailand, pp 608-613. **The proceedings of JSPS-NRCT international symposium joint seminar 2007 (sufficiency economy philosophy for the sustained development of fishery)**. Kasetsart University, Thailand.
- Kang, J. Y., M. N. A. Khan, N. H. Park, J. Y. Cho, M. C. Lee, H. Fujii and Y. K. Hong. 2008. Antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. **Journal of ethnopharmacology** 116: 187-190.
- Koyanagi, S., N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda and H. Shimeno. 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemical pharmacology** 65: 173-179.
- Lewmanomont, K. and H. Ogawa. 1995. **Common Seaweeds and Seagrasses of Thailand**. Intergrated Promotoin Technology. Co., Ltd., Bangkok.

- \_\_\_\_\_, L. Wongrat and C. Supanwanid. 1995. **Algae in Thailand**. Office of Environmental Policy and Planning. Bangkok.
- Marais, M. F. and J. P. Joseleau. 2001. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydrate research** 336: 155-159.
- Martí, R., M.J. Uriz and X. Turon. 2004. Seasonal and spatial variation of species toxicity in Mediterranean seaweed communities: correlation to biotic and abiotic factors. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 282: 73-85.
- Misra, J. N. 1966. **Phaeophyceae in India**. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi (ICAR).
- Mohsen, A. M. S., S. F. Mohamed, F. M. Ali and O. H. El-Sayed. 2007. Chemical structure and antiviral activity of water-soluble sulfated polysaccharides from *Sargassum latifolium*. **Journal of applied sciences research** 3(10): 1178-1185.
- Nishino, T., A. Fukuda, T. Nagumo, M. Fujihara and E. Kaji. 1999. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Thrombosis research** 96: 37-49.
- Ozawa, T., J. Yamamoto, T. Yamagishi, N. Yamazaki and M. Nishizawa. 2006. Two fucoidans in the holdfast of cultivated *Laminaria japonica*. **Journal of natural medicines** 60: 236-239.
- Pareira, M. S., B. Mulloy§ and P. A. S. Mourão. 1999. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans. **The Journal of biological chemistry** 274: 7656-7667.
- Ponce, N. M. A., C. A. Pujol, E. B. Damonte and M. L. Flores. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydrate research** 338: 153-165.



- Percival, E. and R. H. McDowell. 1967. **Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides**. Academic Press Inc. (London) Ltd. London.
- Rioux, L. E., S. L. Turgeon and M. Beaulieu. 2007. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. **Carbohydrate polymers** 69(3): 742-747.
- Rocha de Souza, M. C., C. T. Marques, C. M. G. Dore, F. R. Ferreira da Silva, H. A. O. Rocha, E. L. Leite. 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J. appl phycol** 19(2): 153-160.
- Rupérez, P., O. Ahrazem and J. A. Leal. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **J. Agric. Food Chem.** 50: 840 – 845.
- Silva, T. M. A., L. G. Alves, K. C. S. de Queiroz, M. G. L. Santos, C. T. Marques, S. F. Chavante, H. A. O. Rocha and E. L. Leite. 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian journal of medical and biological research** 38: 523-533.
- Stahl, E. 1965. **Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook**. Academic Press, New York.
- Usov, A. I., G. P. Smirnova, Z. Kamenarska, St. Dimitrova-Konaklieva, K. L. Stefanov and S. S. Popov. 2004. Polar constituents of brown seaweed *Colpomenia peregrine* (Sauv.) Hamel from the black sea. **Russian journal of bioorganic chemistry** 30(2):161-167.
- Waaland, J. R. 1977. **Common Seaweed**. Pacific scarch Press, Washington.
- Wang, J., Q. Zhang, Z. Zhang and Z. Li. 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International journal of biological macromolecules** 42: 127-132.

- Xue, Z., C. H. Xue and B. F. Li. 2008. Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. **J. Appl. Phycol.** 20: 431 – 436.
- Yeh, S., C. Lee and J. Chen. 2006. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology** 20: 332-345.
- Zemek, J., K. Linek, B. Kadlečiková, Š Kučár and L. Somogyi. 1985. Antimicrobial effect of sugar osazones and anhydro sugars. **Folia Microbiol** 30: 396-399.
- Zhu, W., V. E. C. Ooi, P. K. S. Chan and P. O. Ang Jr. 2003. Isolation and Characterization Of a Sulfated Polysaccharide from the Brow Alga *Sagassum patens* and Determination of its Anti-herpes Activity. **Biochemistry and cell biology** 81(1): 25-33.
- Zvyagintseva, T. N., N. M. Shevchenko, A. O. Chizhov, T. N. Krupnova, E. V. Sundukova and V. V. I sakov. 2003. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. **Journal of experimental marine biology and ecology** 294: 1-13.

ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์

## การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดโพลีแซคคาไรด์

### 1. การวิเคราะห์ปริมาณซัลเฟต (Craigie *et al.*, 1982)

#### 1.1 การเตรียม $\text{BaCl}_2$ gelatin

โดยละลาย gelatin 0.6 g ในน้ำ Milli Q 200 ml ที่อุณหภูมิ 60-70°C ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำออกมาตั้งทิ้งไว้จนสารละลายปรับอุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติม  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ละลายให้เข้ากัน เก็บไว้ได้ 2 เดือนที่อุณหภูมิ 4°C

#### 1.2 การเตรียม standard stock solution

ละลาย  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.27 g ในน้ำ Milli Q ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 50  $\mu\text{gS/ml}$  จากนั้นนำมาเตรียม working solution ที่มี standardization rage ที่ 10, 20, 30, 40 และ 50  $\mu\text{gS/ml}$

#### 1.3 การทำ standard curve

เมื่อเตรียมความเข้มข้นในระดับต่างๆ แล้ว เติมน้ำ Milli Q, 0.5 N HCl และ  $\text{BaCl}_2$  gelatin ลงไป 18, 2 และ 1 ml ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน และนำมาคำนวณหาปริมาณซัลเฟต

สูตรคำนวณหาปริมาณซัลเฟต

$$\%SO_4^{2-} = X \times k \times \text{total Vol. of sample} \times \frac{1}{\text{Sample } (\mu\text{g})} \times 100$$

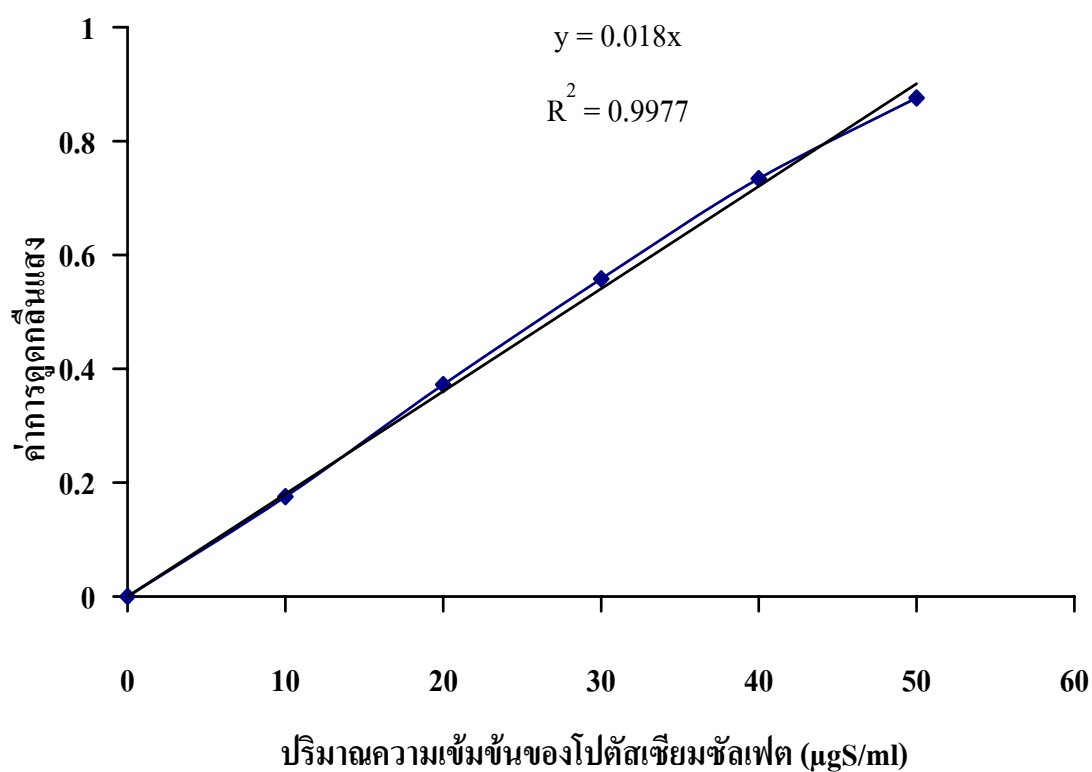
โดย X: ค่าความเข้มข้นซัลเฟตของตัวอย่าง

k: conversion factor มีค่าเท่ากับ 3

total Vol. of sample: ปริมาตรสุดท้ายเมื่อทำการปรับปริมาตร 10 ml

Sample: นน.เริ่มต้นของตัวอย่าง ( $\mu\text{g}$ )

กราฟมาตรฐานของปริมาณโปตัสเซียมซัลเฟต



ภาพผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานปริมาณ โปตัสเซียมซัลเฟต

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Dubois *et al.*, 1956)

### 2.1 การเตรียม 5% phenol reagent

ชั่ง phenol 5 mg แล้วปรับด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ml

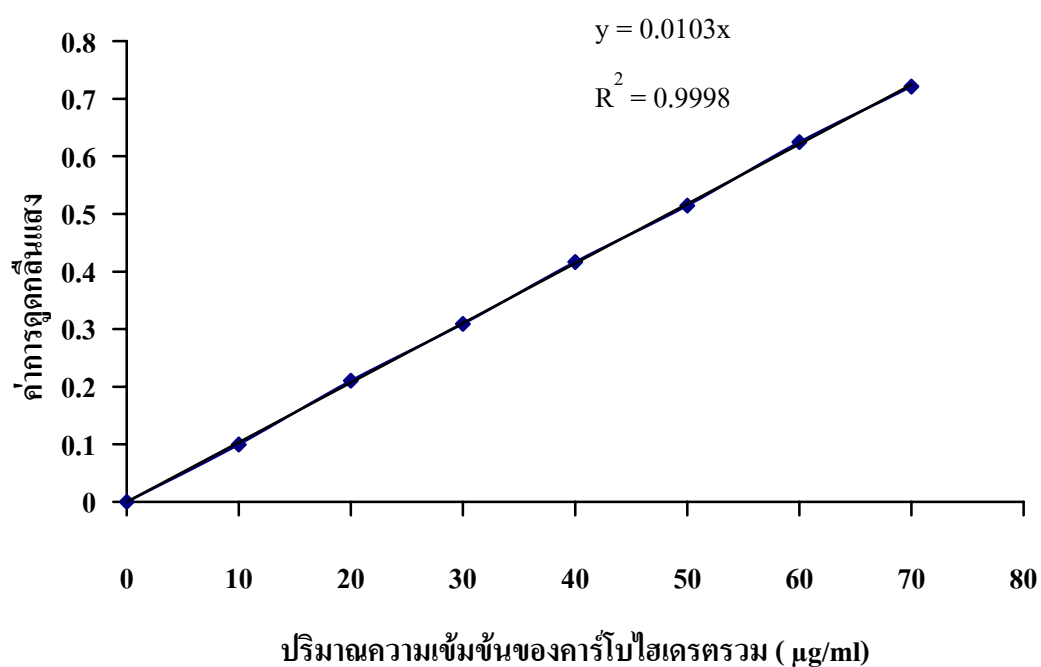
### 2.2 การเตรียม standard stock solution

ละลายน้ำตาลกลูโคส 10 mg จากนั้นปรับให้มีปริมาตร 100 ml สารละลายจะมีความเข้มข้น 0.01% จากนั้น นำไปเจือจางตามความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70  $\mu\text{g/ml}$

### 2.3 การทำ standard curve

นำสารละลายที่ทำการเจือจางในความเข้มข้นต่างๆ แล้วมาอย่างละ 2 ml ในแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง จากนั้นจึงเติม 1 ml ของสารละลาย 5% phenol ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 ml แล้วเข็น้ำที่อุณหภูมิ 20-25  $^{\circ}\text{C}$  ทิ้งไว้ 20 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานของปริมาณคาร์โบไฮเดรต



ภาพผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานปริมาณคาร์โบไฮเดรต



#### ภาคผนวก ข

ข้อมูลการทดลองของสารโพลีแซคคาไรด์

## ข้อมูลผลการสกัด และผลการวิเคราะห์ทางเคมี

**ตารางผนวกที่ ข1** ปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2) CS = *C. sinuosa*, DD = *D. dichotoma*, HC = *H. clathratus*, SP = *S. polycystum*, PA = *P. australis*, PM = *P. minor*, TC = *T. conoides*, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร และ 03 = ระยอง

| ชนิด<br>วิธีสกัด | CS01      | DD02      | HC01       | PA01       | PA02      | PA03      | PM02      | SP01      | SP03       | TC02       |
|------------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| E1 (%)           | 1.81±0.48 | 0.47±0.31 | 1.33±0.28  | 1.44±0.20  | 1.47±0.09 | 1.44±0.05 | 0.66±0.38 | 1.54±0.24 | 1.97±1.15  | 1.13±0.45  |
| E2 (%)           | 4.33±0.18 | 3.87±0.04 | 19.69±0.23 | 11.79±0.19 | 4.06±0.10 | 2.77±0.19 | 5.15±0.08 | 5.06±0.27 | 11.32±0.12 | 10.37±0.15 |

**ตารางผนวกที่ ข2** ปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2) CS = *C. sinuosa*, DD = *D. dichotoma*, HC = *H. clathratus*, SP = *S. polycystum*, PA = *P. australis*, PM = *P. minor*, TC = *T. conoides*, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร และ 03 = ระยอง

| ชนิด<br>วิธีสกัด | CS01       | DD02       | HC01        | PA01       | PA02        | PA03        | PM02       | SP01        | SP03        | TC02       |
|------------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|
| E1 (%)           | 34.55±0.21 | 43.06±0.09 | 38.04±0.10  | 40.07±0.18 | 49.40±0.50  | 51.94±0.08  | 55.95±0.72 | 40.10±0.23  | 40.25±0.24  | 32.15±0.18 |
| E2 (%)           | 36.72±1.53 | 33.95±6.44 | 10.46±19.51 | 33.64±4.54 | 35.10±10.12 | 34.07±12.64 | 44.41±8.16 | 23.91±11.45 | 25.68±10.30 | 21.46±7.56 |

ตารางผนวกที่ ข3 ปริมาณซัลเฟตจากการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2) CS = *C. sinuosa*,

DD = *D. dichotoma*, HC = *H. clathratus*, SP = *S. polycystum*, PA = *P. australis*, PM = *P. minor*, TC = *T. conoides*, 01 = ชลบุรี, 02 = ชุมพร และ 03 = ระยอง

| ชนิด<br>วิธีสกัด | CS01       | DD02      | HC01       | PA01      | PA02       | PA03       | PM02       | SP01       | SP03       | TC02       |
|------------------|------------|-----------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| E1 (%)           | 5.83±0.28  | 7.37±0.54 | 18.10±0.25 | 8.97±0.09 | 7.95±0.43  | 9.10±0.13  | 9.16±0.35  | 11.09±0.17 | 10.33±0.42 | 10.19±0.20 |
| E2 (%)           | 14.22±5.94 | 9.74±1.68 | 13.82±3.02 | 9.88±0.65 | 10.10±1.52 | 11.00±1.35 | 12.75±2.53 | 10.90±0.13 | 11.13±0.56 | 10.25±0.04 |

ตารางผนวกที่ ข4 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ *Candida albicans* จากสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C (E1) และการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ที่อุณหภูมิ 75 °C (E2)

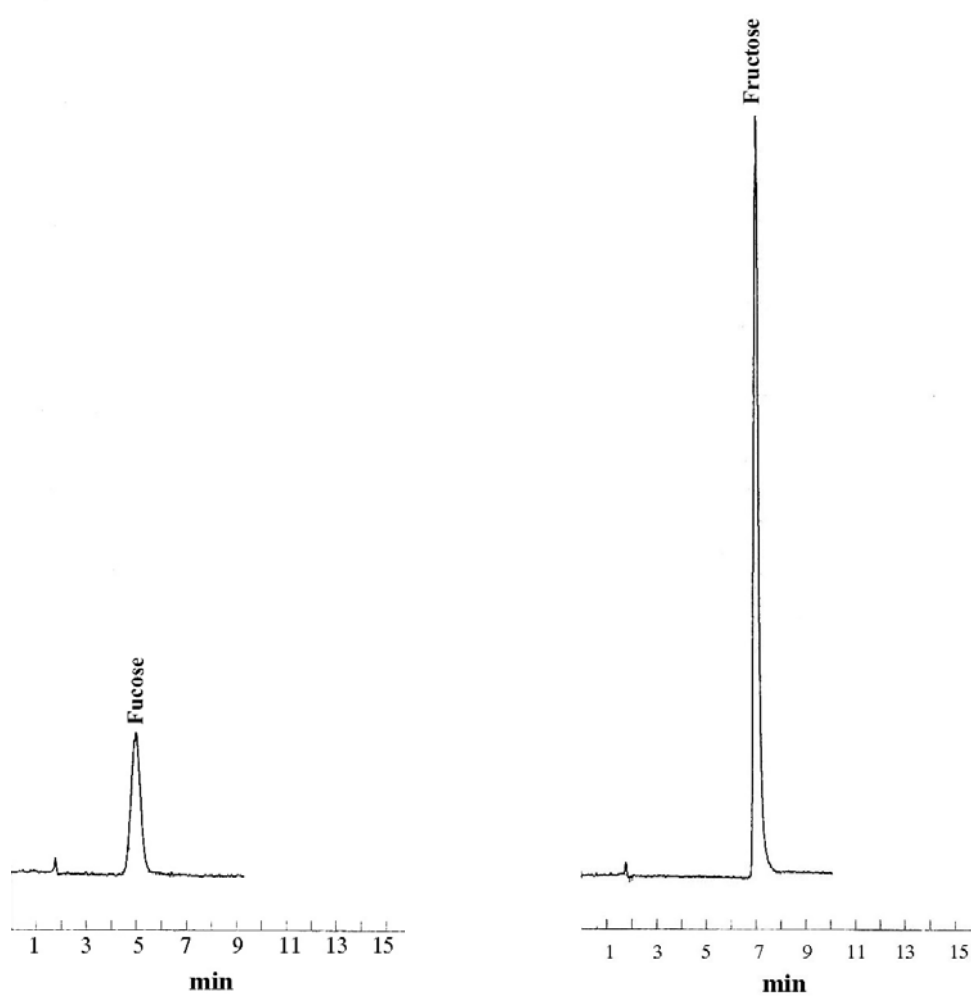
CS = *C. sinuosa*, SP = *S. polycystum* และ 01 = ชลบุรี

| ชนิด<br>วิธีสกัด | CS01        | SP01        |
|------------------|-------------|-------------|
| E1 (mm)          | -           | 0.122±0.004 |
| E2 (mm)          | 0.156±0.035 | 0.123±0.03  |

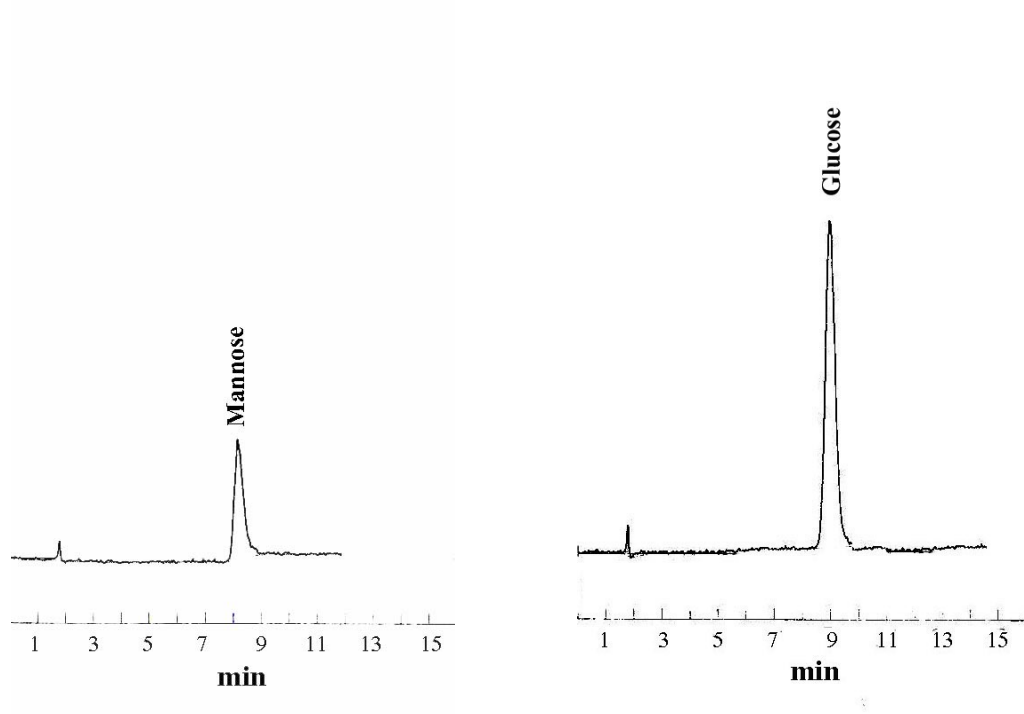
#### ภาคผนวก ค

กราฟน้ำตาตามมาตรฐานที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

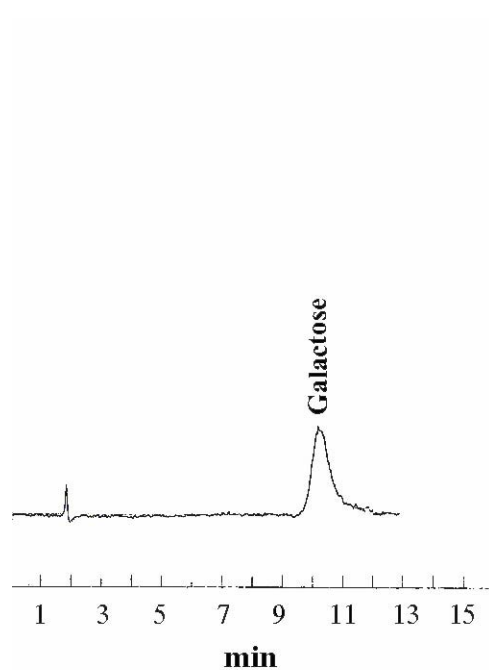
### กราฟน้ำตาลมาตรฐานที่วิเคราะห์จากวิธี HPLC



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟโครมาโตแกรมแสดงน้ำตาลมาตรฐานฟูโคส และฟรุคโตส



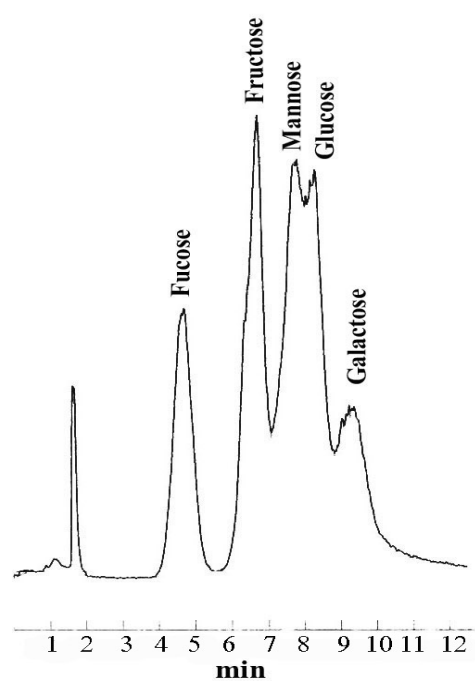
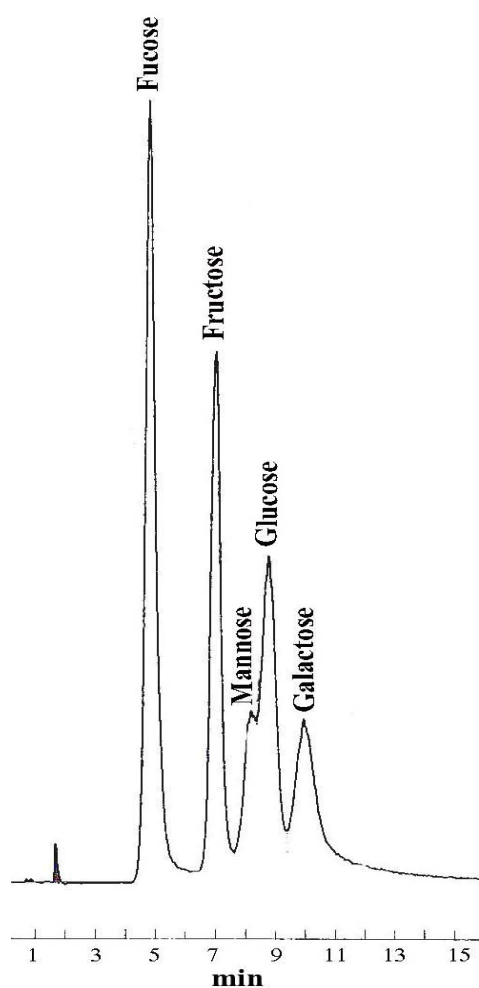
ภาพผนวกที่ ค2 กราฟโครมาโตแกรมแสดงน้ำตาลมาตรฐานแมนโนส และกลูโคส



ภาพผนวกที่ ค3 กราฟโครมาโตแกรมแสดงน้ำตาลมาตรฐานกาแลคโตส

S1

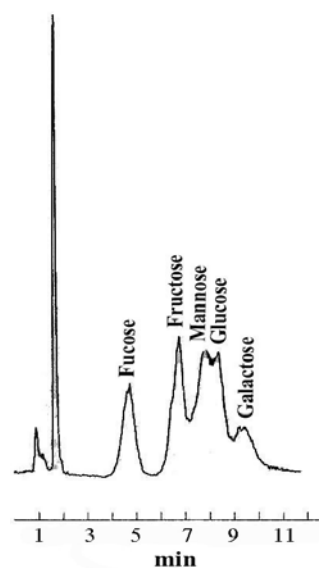
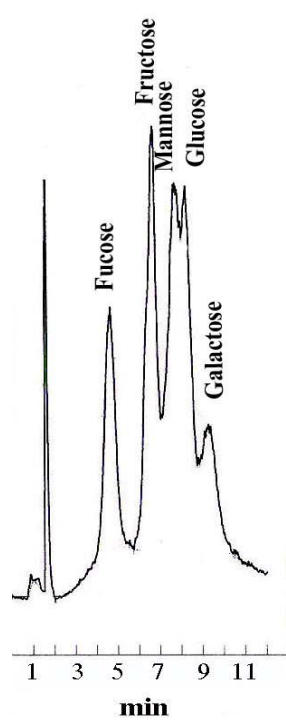
S2



ภาพผนวกที่ ค4 กราฟโครมาโตแกรมน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด; S1 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 2 mg/ml และ S2 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 1 mg/ml

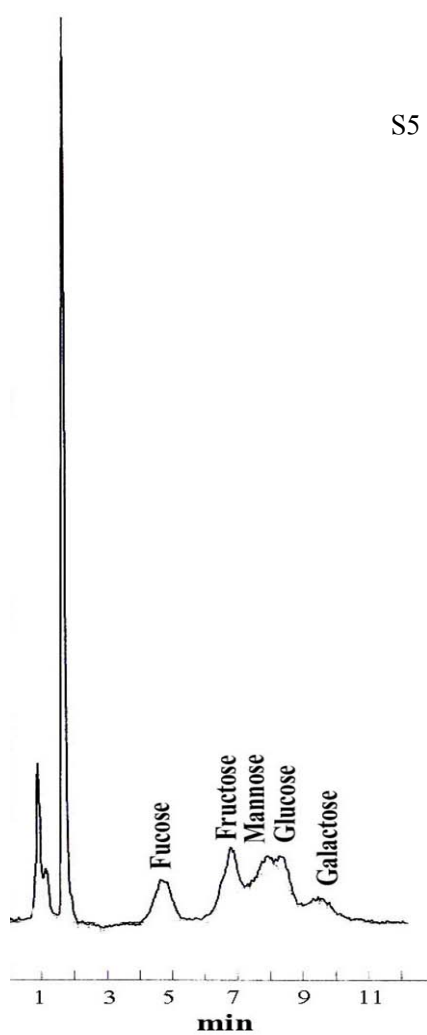
S3

S4



ภาพผนวกที่ ๕ กราฟโครมาโตแกรมน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิด; S3 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 mg/ml และ S4 = น้ำตาลมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 mg/ml





ภาพผนวกที่ ค6 กราฟโครมาโตแกรมน้ำตาลมาตรฐาน 5 ชนิดที่ความเข้มข้น 0.125 mg/ml (S5)

ภาคผนวก ง  
ตารางวิเคราะห์ทางสถิติ

**ตารางผนวกที่ ง1** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของ  
สำหรับแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 5.609          | 6  | 0.935       | 25.688 | 0.000 |
| Within Groups  | 0.837          | 23 | 0.036       |        |       |
| Total          | 6.447          | 29 |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ ง2** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของ  
สำหรับแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 570.979        | 6  | 95.163      | 10.606 | 0.000 |
| Within Groups  | 206.367        | 23 | 8.972       |        |       |
| Total          | 777.346        | 29 |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ ง3** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ระหว่างวิธีสกัด  
ด้วยวิธี E1 และ E2

|                | Sum of Squares | df  | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|-----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 1273.357       | 1   | 1273.357    | 95.852 | 0.000 |
| Within Groups  | 1567.584       | 118 | 13.285      |        |       |
| Total          | 2840.941       | 119 |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ ๔4** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.273          | 1  | 0.273       | 6.319 | 0.066 |
| Within Groups  | 0.173          | 4  | 0.043       |       |       |
| Total          | 0.446          | 5  |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ ๔5** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 58.907         | 1  | 58.907      | 85.325 | 0.001 |
| Within Groups  | 2.762          | 4  | 0.690       |        |       |
| Total          | 61.668         | 5  |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ ๔6** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.001          | 2  | 0.001       | 0.027 | 0.974 |
| Within Groups  | 0.161          | 6  | 0.027       |       |       |
| Total          | 0.162          | 8  |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ ๗** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบโพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|-------|
| Between Groups | 142.666        | 2  | 71.333      | 1463.405 | 0.000 |
| Within Groups  | 0.292          | 6  | 0.049       |          |       |
| Total          | 142.958        | 8  |             |          |       |

**ตารางผนวกที่ ๘** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 1339.361       | 6  | 223.227     | 21.706 | 0.000 |
| Within Groups  | 236.533        | 23 | 10.284      |        |       |
| Total          | 1575.894       | 29 |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ ๙** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบระหว่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 2496.225       | 6  | 416.037     | 520.767 | 0.000 |
| Within Groups  | 18.375         | 23 | 0.799       |         |       |
| Total          | 2514.599       | 29 |             |         |       |

**ตารางผนวกที่ ๑๐** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตระหว่างวิธีการสกัดด้วยวิธี E1 และ E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 2385.812       | 1  | 2385.812    | 33.829 | 0.000 |
| Within Groups  | 4090.493       | 58 | 70.526      |        |       |
| Total          | 6476.305       | 59 |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ ๑๑** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.032          | 1  | 0.032       | 0.589 | 0.486 |
| Within Groups  | 0.219          | 4  | 0.055       |       |       |
| Total          | 0.252          | 5  |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ ๑๒** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 4.682          | 1  | 4.682       | 10.205 | 0.033 |
| Within Groups  | 1.835          | 4  | 0.459       |        |       |
| Total          | 6.517          | 5  |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ 13** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|-------|
| Between Groups | 234.488        | 2  | 117.244     | 1220.021 | 0.000 |
| Within Groups  | 0.577          | 6  | 0.096       |          |       |
| Total          | 235.065        | 8  |             |          |       |

**ตารางผนวกที่ 14** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 3.365          | 2  | 1.682       | 3.007 | 0.125 |
| Within Groups  | 3.357          | 6  | 0.560       |       |       |
| Total          | 6.722          | 8  |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ 15** ค่าทางสถิติระหว่างปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|-------|
| Between Groups | 289.756        | 6  | 48.293      | 211.180 | 0.000 |
| Within Groups  | 5.260          | 23 | 0.229       |         |       |
| Total          | 295.016        | 29 |             |         |       |

**ตารางผนวกที่ 16** ค่าสถิติระหว่างปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายแต่ละชนิดที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 70.402         | 6  | 11.734      | 26.609 | 0.000 |
| Within Groups  | 10.142         | 23 | 0.441       |        |       |
| Total          | 80.544         | 29 |             |        |       |

**ตารางผนวกที่ 17** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของวิธีสกัดด้วยวิธี E1 และ E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 37.083         | 1  | 37.083      | 5.727 | 0.020 |
| Within Groups  | 375.560        | 58 | 6.475       |       |       |
| Total          | 412.643        | 59 |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ 18** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสารรายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.859          | 1  | 0.859       | 8.276 | 0.045 |
| Within Groups  | 0.415          | 4  | 0.104       |       |       |
| Total          | 1.274          | 5  |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ 19** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสารรายชนิด SP กับพื้นที่ 01 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.077          | 1  | 0.077       | 0.201 | 0.677 |
| Within Groups  | 1.536          | 4  | 0.384       |       |       |
| Total          | 1.613          | 5  |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ 20** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสารรายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E1

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------|
| Between Groups | 2.386          | 2  | 1.193       | 17.383 | 0.003 |
| Within Groups  | 0.412          | 6  | 0.069       |        |       |
| Total          | 2.797          | 8  |             |        |       |



**ตารางผนวกที่ ง21** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบปริมาณซัลเฟตของสาหร่ายชนิด PA กับพื้นที่ 01 02 และ 03 ที่สกัดด้วยวิธี E2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 2.099          | 2  | 1.050       | 6.645 | 0.030 |
| Within Groups  | 0.948          | 6  | 0.158       |       |       |
| Total          | 3.047          | 8  |             |       |       |

**ตารางผนวกที่ ง22** ค่าทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig.  |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|-------|
| Between Groups | 0.002          | 2  | 0.001       | 0.419 | 0.676 |
| Within Groups  | 0.013          | 6  | 0.002       |       |       |
| Total          | 0.014          | 8  |             |       |       |

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

|                                |                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อ –นามสกุล                  | นายอรรถชัย คันธะชุมภู                                                                                                                                                                                                                        |
| วัน เดือน ปี ที่เกิด           | วันที่ 5 เมษายน 2524                                                                                                                                                                                                                         |
| สถานที่เกิด                    | จังหวัดเชียงใหม่                                                                                                                                                                                                                             |
| ประวัติการศึกษา                | ระดับปริญญาตรี คณะผลิตกรรมการเกษตร สาขา<br>เทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่                                                                                                                                                     |
| ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน   |                                                                                                                                                                                                                                              |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน           |                                                                                                                                                                                                                                              |
| ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ |                                                                                                                                                                                                                                              |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ           | ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์จากโครงการพัฒนาองค์ความรู้<br>และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพใน<br>ประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุน<br>สนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและ<br>เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT_T<br>650005 |