



การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์  
จากสาหร่ายผสมนาง โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง

Optimization of Polysaccharide Extraction

from *Gracilaria fisheri* Using Response Surface Methodology

ดาริกา อวะภาค<sup>1</sup> นพรัตน์ มะเห<sup>1\*</sup> และ ดลฤดี พิชัยรัตน์<sup>1</sup>

บทคัดย่อ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนางโดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนองที่มีการวางแผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเพื่อศึกษาผลของปัจจัย 3 ปัจจัย คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำ ระยะเวลาในการสกัด และจำนวนรอบในการสกัดต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ จากการทดลองพบว่า ปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย มีผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ ข้อมูลจากการทดลองที่ได้มีความเหมาะสมกับสมการควอดราติก เนื่องจากให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจสูง ( $R^2 = 0.9140$ ) เมื่อนำสมการทางคณิตศาสตร์ที่ได้มาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบ สามมิติของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้และกราฟโครงร่าง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดคือ จำนวนรอบในการสกัดที่ 3 รอบ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายต่อน้ำที่ 1:35 และระยะเวลาในการสกัดที่ 60 นาที โดยสภาวะดังกล่าวสามารถสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ได้เท่ากับ 63.23 กรัมต่อ 100 กรัม สาหร่าย

<sup>1</sup>สาขาอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ต.ไม้ฝาด อ.สิเกา จ.ตรัง

\* Corresponding Author, E-mail: mnopparat@hotmail.com

## ABSTRACT

Response Surface Methodology (RSM) was used to determine optimum condition for *Gracilaria fisheri* polysaccharides extraction. Box-Behnken experimental design was applied to optimized the ratio of water to algae, extraction time and number of extraction. The results showed that these three factors affected yield of polysaccharide extraction. The experimental data obtained were fitted to quadratic equation because it showed high coefficient of determination ( $R^2 = 0.915$ ). The 3-D response surface plot and the contour plot derived from the mathematical models were applied to determine the optimal conditions. The optimum extraction conditions were as follows: number of extraction 3, ratio of water to algae 1:35, and extraction time 60 minutes. Under the optimal condition, the polysaccharide extraction yield was 63.23 g /100 g algae.

**คำสำคัญ:** วิธีพื้นผิวตอบสนอง พอลิแซคคาไรด์ สาหร่ายผมนาง

**Keywords:** Response surface methodology, Polysaccharide, *Gracilaria fisheri*

## บทนำ

*Gracilaria* spp. เป็นสาหร่ายทะเลสีแดง (red seaweed) ที่อยู่ใน Gracilariaceae family แพร่กระจายอย่างแพร่หลายในเขตร้อนมหาสมุทรแอตแลนติก และเป็นแหล่งผลิตวุ้น (agar) ที่สำคัญ (Lai and Lii, 1997) โดย agar เป็นของผสมของพอลิแซคคาไรด์ที่พบในเซลล์เมทริกซ์ (cell matrix) ของสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) โดยเฉพาะ Gelidiaceae families และ Gracilariaceae families (Armisen and Galactas, 1987) agar ประกอบด้วยองค์ประกอบที่แตกต่างกัน 2 องค์ประกอบคือ agarose และ agaropectin ซึ่ง agarose เป็น neutral polysaccharide ที่มีโครงสร้างเป็นสายโซ่ของหน่วยย่อย disaccharide agarobiose ซึ่งประกอบด้วย D-galactose และ 3,6-L-galactose ส่วน agaropectin เป็น acid polysaccharides ประกอบด้วย sulfate ester, pyruvic acid, D-glucuronic acid และ agarobiose (Araki, 1966).

สาหร่ายกลุ่ม *Gracilaria* เป็นกลุ่มของสาหร่ายทะเลสีแดงที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด โดยมีการนำมาใช้เป็นอาหารปลา และสัตว์น้ำอื่น ๆ (Lewmanomont, 1998; Praiboon et al., 2006) เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ และใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม (Wen et al., 2006; Fitton, 2006) และเป็นแหล่งของ agar คุณภาพสูง (Lewmanomont, 1998; Praiboon et al., 2006) ซึ่ง agar ที่สกัดได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนั้นสาหร่ายกลุ่ม *Gracilaria* ยังประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ (active compound) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อไวรัส (antiviral) ยับยั้งเชื้อรา (antifungal) และยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) (Bansemir et al., 2006) จากการศึกษาของ Mazumder et al. (2002) ซึ่งสกัดพอลิแซคคาไรด์จากสาหร่าย *Gracilaria corticata* พบว่าประกอบด้วย sulfated galactan, methylated

galactan และ pyruvated galactan ซึ่งเป็น agarose โดยหมู่ซัลเฟตอยู่ที่ตำแหน่ง C-4 ของ D-galactose units และที่ตำแหน่ง C-6 ของ L-galactose units หมู่เมทอกซิลอยู่ที่ตำแหน่ง C-6 ของ D-galactose residues และตำแหน่ง C-2 ของ L-galactose residues และเมื่อทดสอบทางชีวภาพพบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้สามารถใช้ในการยับยั้งไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคเริม type 1 และ type 2 ได้ สำหรับสาหร่ายผสมนาง (*Gracilaria fisheri*) เป็นสาหร่ายที่พบทั่วไปในบริเวณภาคใต้และภาคตะวันออกของไทย สาหร่ายผสมนางเป็นแหล่งผลิตวุ้นที่สำคัญทางการค้า นอกจากนั้นการบริโภคอาจนำมาบริโภคในลักษณะของสาหร่ายสด

วิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่เป็นประโยชน์ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหาซึ่งแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่าง ๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดหรือความเหมาะสมต่อผลนั้น (Montgomery, 2001) RSM เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพกับกระบวนการที่มีความซับซ้อน ทำให้ง่ายในการจัดการและการอธิบายผล เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น (Box and Behnken, 1960; Gan and Latiff, 2011) การศึกษาครั้งนี้มีความสนใจศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผสมนาง รวมทั้งการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทำนายปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผสมนางโดยใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนอง

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### วัสดุอุปกรณ์

- 1.สาหร่ายผสมนาง (*Gracilaria fisheri*)
- 2.ฟีนอล (phenol)
- 3.กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid)
- 4.หม้อหนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอสูง (autoclave)
- 5.อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับสกัด
- 6.อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์
- 7.เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

### วิธีการ

#### 1. การทดลองเพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลอง

การทดลองเพื่อหาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนาง โดยการใช้การออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผสมนางกับน้ำ ( $X_1$ ) ระยะเวลาในการสกัด ( $X_2$ ) และจำนวนรอบในการสกัด ( $X_3$ ) ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการ ดังนี้

##### 1.1 การกำหนดระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

การกำหนดระดับของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย โดยพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง การทดลองเบื้องต้น และข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้การทดลอง

ปัจจัย	ระดับ		
	-1	0	1
อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายต่อน้ำกลั่น ( $X_1$ ) (กรัม/กรัม)	1:15	1:25	1:35
ระยะเวลาในการสกัด ( $X_2$ ) (นาที)	20	40	60
จำนวนรอบในการสกัด ( $X_3$ ) (รอบ)	1	2	3

ตารางที่ 2 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง

Std Order	Run Order	Pt Type	Blocks	X1	X2	X3
8	1	2	1	1	0	1
1	2	2	1	-1	-1	0
12	3	2	1	0	1	1
4	4	2	1	1	1	0
15	5	0	1	0	0	0
17	6	0	1	0	0	0
3	7	2	1	-1	1	0
13	8	0	1	0	0	0
6	9	2	1	1	0	-1
14	10	0	1	0	0	0
11	11	2	1	0	-1	1
2	12	2	1	1	-1	0
5	13	2	1	-1	0	-1
16	14	0	1	0	0	0
7	15	2	1	-1	0	1
10	16	2	1	0	1	-1
9	17	2	1	0	-1	-1

## 1.2 การออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน

ในการทดลองสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนางได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 17 หน่วย ดังตารางที่ 2

## 1.3 การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนาง

ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนางตามลำดับการทดลองที่กำหนดไว้ในข้อ 1.2 โดยดัดแปลงวิธีการสกัดจาก Kuda et al. (2005) และ Qi et al. (2005) โดยนำตัวอย่างสาหร่ายแห้ง ผสมน้ำกลั่น สัดส่วนสาหร่ายและน้ำกลั่นตามที่กำหนดไว้ในตารางที่ 1 ทำการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ตามเวลาและจำนวนรอบที่กำหนดไว้ในตารางที่ 1 หลังการสกัดทำการกรองแยกสารที่สกัดได้ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

#### 1.4 การหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนาง

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 1.3 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นในระดับที่เหมาะสม แล้วจึงนำมาหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยดัดแปลงจากวิธี phenol sulfuric acid assay (Dubois et al., 1956) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดในน้ำกลั่น แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไป หมุนเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างส่วนใสมาใช้ในการวิเคราะห์

การศึกษาครั้งนี้ใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน เตรียมสารละลายมาตรฐาน (stock solution) ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้มาเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ โดยใช้ stock solution 50-200 ไมโครลิตร แล้วผสมกับ 2.5% phenol ปริมาตร 950-800 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายตัวอย่าง ดูดสารละลายตัวอย่างมา 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 2.5% phenol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก (conc.  $H_2SO_4$ ) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน

#### 2. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq)

และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

#### 2.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

เป็นการตรวจสอบข้อมูลที่ได้จากการทดลองก่อนนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองต้องเป็นไปตามสมมติฐาน 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ ถ้าหากค่าส่วนตกค้างเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ จะถือว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน

##### 2.1.1 การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติของส่วนตกค้าง

การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติของค่าส่วนตกค้างของข้อมูลโดยพิจารณาการกระจายของค่าส่วนตกค้างจากกราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง หากค่าส่วนตกค้างมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ

##### 2.1.2 การตรวจสอบความเป็นอิสระของส่วนตกค้าง

การตรวจสอบความเป็นอิสระของค่าส่วนตกค้างโดยใช้แผนภูมิการกระจายเพื่อสังเกตลักษณะการกระจายของจุดที่แทนข้อมูลบนแผนภูมิว่ามีรูปแบบอิสระหรือไม่ หากส่วนตกค้างไม่มีรูปแบบที่แน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน

2.1.3 การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนของส่วนตกค้าง

การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนโดยพิจารณาจากแผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย หากส่วนตกค้างมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าส่วนตกค้างมีความเสถียรของความแปรปรวน

## 2.2 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

เป็นการวิเคราะห์ว่าการออกแบบที่ใช้การทดลองมีความเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งในการทดลองทุกครั้งจะต้องมีความผันแปรที่อธิบายไม่ได้หรือความคลาดเคลื่อนเกิดขึ้นเสมอ การออกแบบการทดลองที่ดีจะต้องทำให้เกิดความผันแปรที่อธิบายไม่ได้น้อยที่สุด โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้ (Hu, 1999)

$$\text{สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ} = \frac{\text{ความผันแปรที่อธิบายได้} \times 100}{\text{ความผันแปรทั้งหมด}}$$

## 2.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลองโดยพิจารณาจาก ค่า P-value ของเทอมต่าง ๆ ในตารางของการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ได้เปรียบเทียบกับค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด

## 2.4 การสร้างสมการทำนายปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนาง

การสร้างสมการทำนายปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางโดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางมาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการต่อไปนี้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

## 2.5 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนาง

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบและกราฟโครงร่างของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เทียบกับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผสมนางกับน้ำ ระยะเวลาในการสกัด และจำนวนรอบในการสกัด โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

## 2.6 การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางมากที่สุดโดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer ในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้หาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยและใช้วัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบ (composite desirability: D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบมีค่าอยู่ระหว่าง 0–1 ถ้า D มีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนาง

ในการทดลองสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนางได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผสมนางกับน้ำ ( $X_1$ ) ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $X_2$ ) และจำนวนรอบในการสกัด ( $X_3$ ) โดยมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 17 หน่วยทดลอง เมื่อทำการทดลองสกัดพอลิ-

แช่กาคาไรต์จากสาหร่ายผสมนางตามลำดับการทดลอง และสภาวะที่กำหนดไว้ ผลที่ได้จากการทดลองดังแสดง ในตารางที่ 3

## 2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

### 2.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

เมื่อทำการทดลองสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนางทั้ง 17 หน่วยทดลอง แล้วจึงนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลมี 3 ขั้นตอน คือ (1)

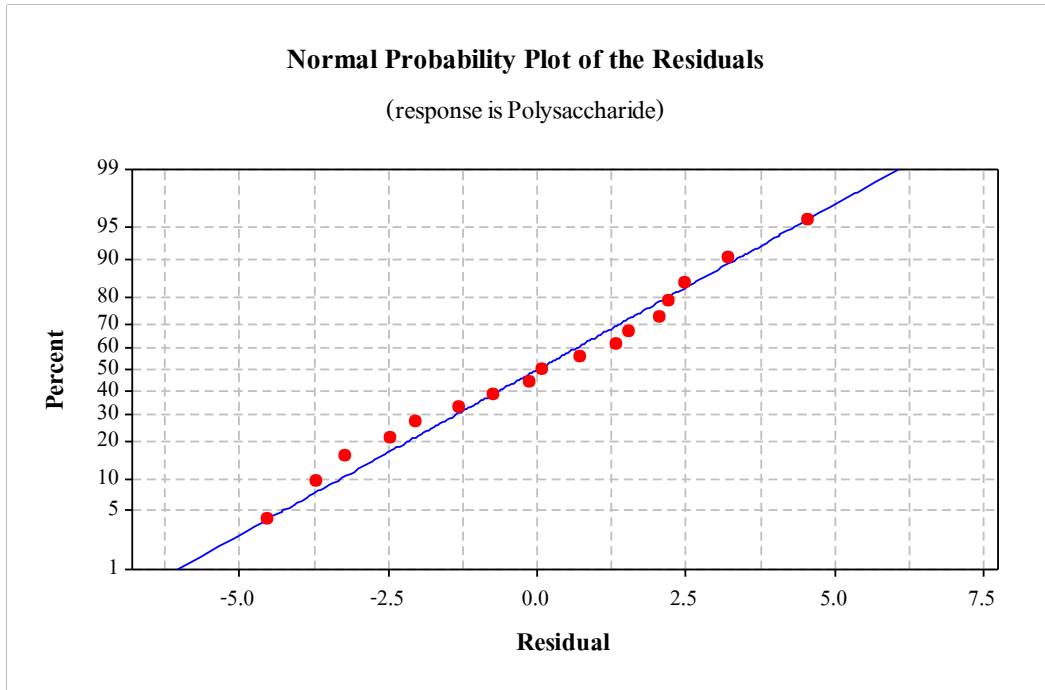
การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ (2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล และ (3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน

#### 2.1.1 การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ

การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ เป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายแบบแจกแจงปกติหรือไม่ จากการพิจารณาการกระจายของค่าส่วนตกค้างในรูปที่ 1 พบว่า มีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่า ส่วนตกค้างจากผลการทดลองของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผสมนางไม่แสดงสิ่งผิดปกติให้เห็น จึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ

ตารางที่ 3 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางของแต่ละหน่วยการทดลอง

ลำดับการทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา			ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัม/100 กรัมสาหร่ายแห้ง)
	อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผสมนางกับน้ำ ( $X_1$ ) (กรัม/กรัม)	ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด ( $X_2$ ) (นาที)	จำนวนรอบในการสกัด ( $X_3$ ) (รอบ)	
1	1:35	40	3	57.80
2	1:15	20	2	22.22
3	1:25	60	3	40.10
4	1:35	60	2	55.33
5	1:25	40	2	39.84
6	1:25	40	2	41.97
7	1:15	60	2	23.33
8	1:25	40	2	41.30
9	1:35	40	1	37.37
10	1:25	40	2	39.62
11	1:25	20	3	11.12
12	1:35	20	2	27.49
13	1:15	40	1	22.13
14	1:25	40	2	36.03
15	1:15	40	3	31.12
16	1:25	60	1	29.07
17	1:25	20	1	13.85



รูปที่ 1 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง

2.1.2 การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล

การตรวจสอบความเป็นอิสระของค่าส่วนตกค้างโดยใช้แผนภูมิการกระจายเพื่อสังเกตลักษณะการกระจายของจุดที่แทนข้อมูลบนแผนภูมิว่ามีรูปแบบอิสระหรือไม่ จากการพิจารณารูปที่ 2 พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพมนางไม่มีรูปแบบที่แน่นอน หรือไม่สามารูประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

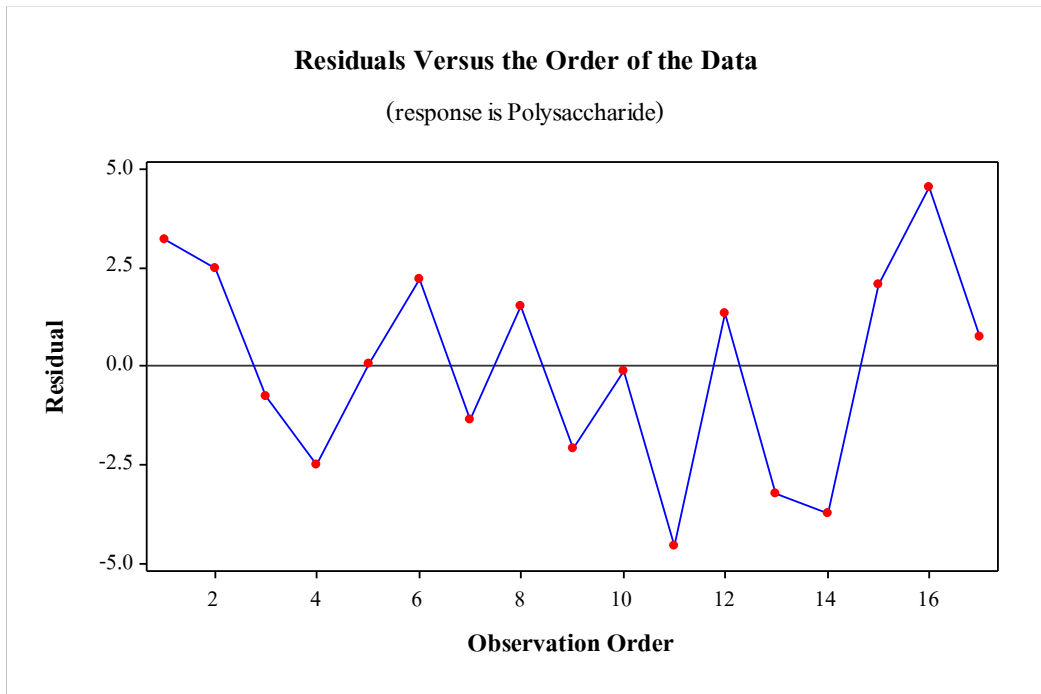
2.1.3 การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน

การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนโดยใช้แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างใน

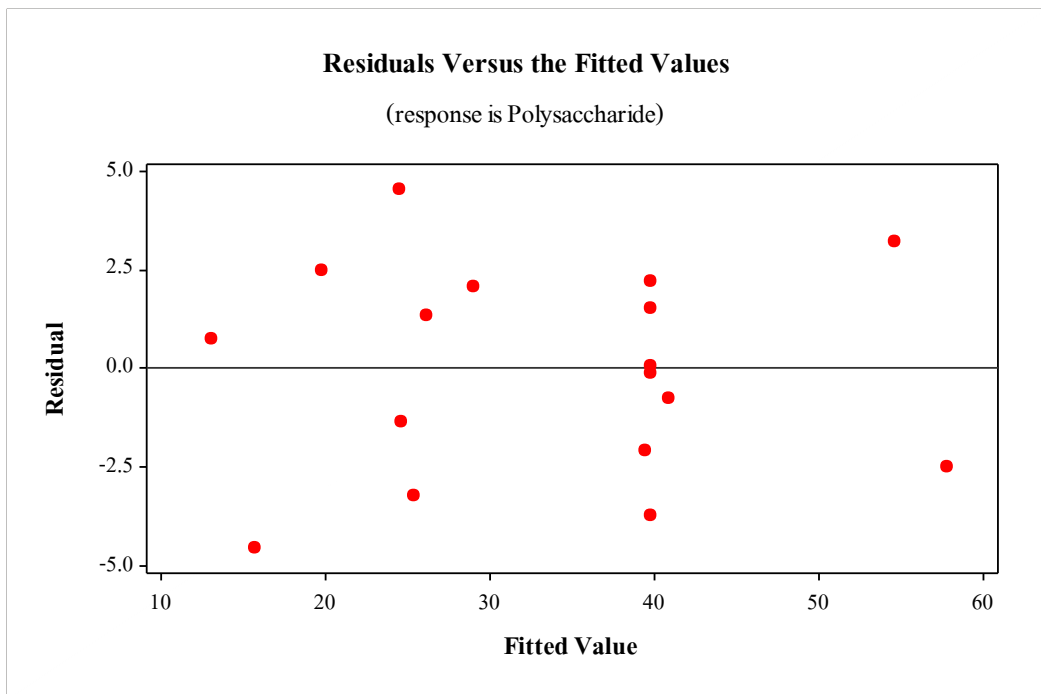
แต่ละระดับของปัจจัย จากการพิจารณารูปที่ 3 พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายพมนางมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน

จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลอง พบว่า ค่าส่วนตกค้างของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีความเสถียรภาพ จึงสรุปได้ว่า ข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน





รูปที่ 2 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูล



รูปที่ 3 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย

## 2.2 ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Sq) เป็นค่าที่ใช้บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย (ประไพศรี และพงษ์ชนัน, 2551) จากผลการวิเคราะห์ estimated regression coefficients for polysaccharide ในตารางที่ 4 จะเห็นว่า ค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 0.915 หมายความว่า ตัวแปรอิสระ (อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายพมวงต่อน้ำ ระยะเวลาในการสกัด และจำนวนรอบในการสกัด) สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม (ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้) ได้ร้อยละ 91.50 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลตอบได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

## 2.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายพมวงที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 5 พบว่า ค่า P-value ของเทอมอันตรกิริยามีค่าเท่ากับ 0.018 และเทอมกำลังสองมีค่าเท่ากับ 0.001 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด แสดงว่ามีส่วนโค้งเกิดขึ้นที่พื้นผิวตอบสนอง (Montgomery, 2001) ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการแบบจำลองกำลังสองสำหรับทำนายปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายพมวง

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนอง

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	40.996	1.887	21.724	0.000
Ratio	9.899	1.679	5.895	0.000
Time	9.144	1.679	5.446	0.000
No of Extraction	4.715	1.679	2.808	0.019
Time*Time	-10.459	2.311	-4.525	0.001
No of Extraction*No of Extraction	-5.447	2.311	-2.357	0.040
Ratio*Time	6.682	2.375	2.814	0.018

S = 4.749, R-Sq = 91.5%, R-Sq (Adj) = 86.4%

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพมวง

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	6	2425.00	2425.00	404.166	17.92	0.000
Linear	3	1630.60	1630.60	543.532	24.10	0.000
Square	2	615.78	615.78	307.888	13.65	0.001
Interaction	1	178.62	178.62	178.623	7.92	0.018
Residual Error	10	225.55	225.55	22.555		
Lack-of-Fit	6	204.36	204.36	34.059	6.43	0.047
Pure Error	4	21.19	21.19	5.299		
Total	16	2650.55				

## 2.4 การสร้างสมการทำนายปริมาณพอลิ-แซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนาง

การสร้างสมการทำนายปริมาณพอลิ-แซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางโดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางในตารางที่ 4 มาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้} = & 40.9963 + 9.8988X_1 + 9.1438X_2 \\ & + 4.7150X_3 - 10.4592X_2^2 - 5.4467X_3^2 \\ & + 6.6825X_1X_2 \end{aligned}$$

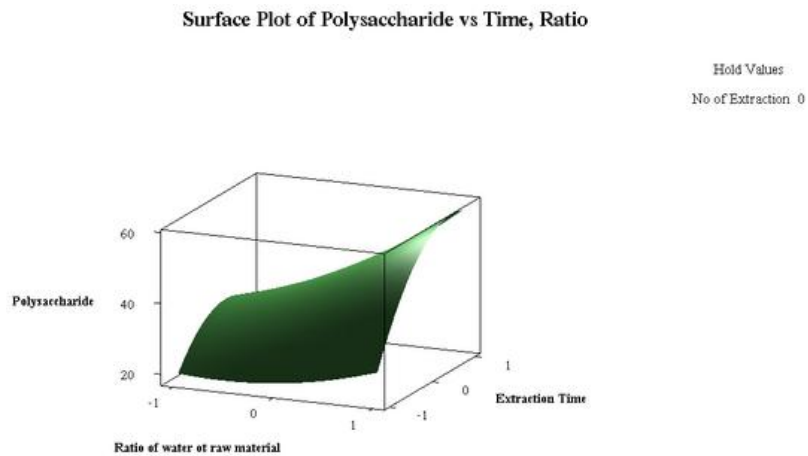
เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) ในตารางที่ 5 พบว่าค่า P-value ของ lack of fit มีค่าเท่ากับ 0.047 ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 0.05 มาก ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณพอลิ-แซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางได้

## 2.5 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนาง

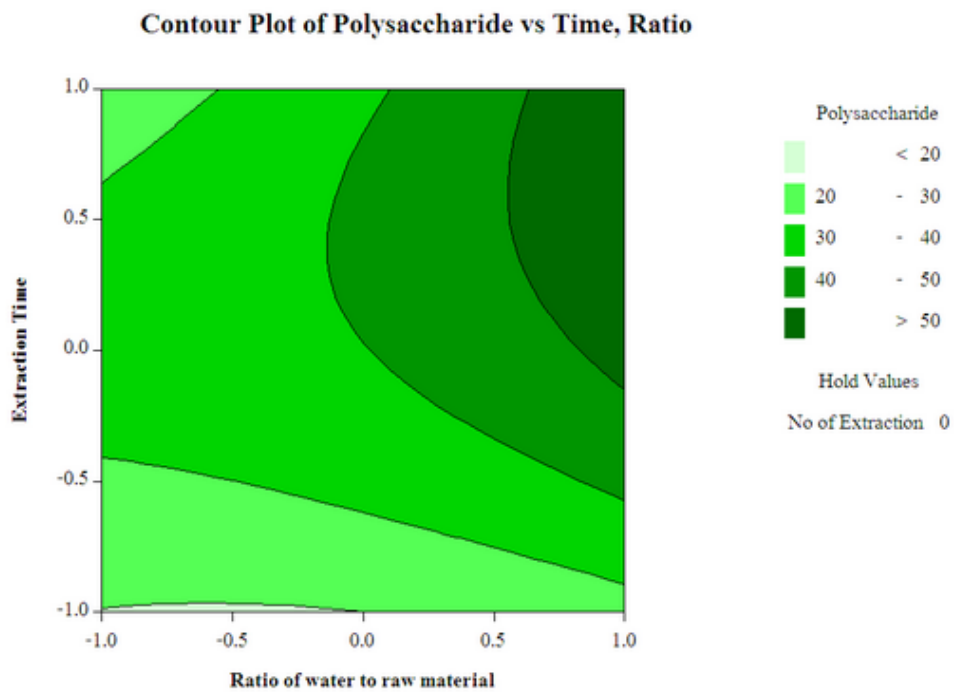
เมื่อได้สมการสำหรับทำนายปริมาณพอลิ-แซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผสมนางแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้และกราฟโครงร่าง (รูปที่ 4-9)

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบปริมาณพอลิ-แซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ในรูปที่ 4 ระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและระยะเวลาในการสกัด โดย

กำหนดให้ระดับของจำนวนรอบในการสกัดอยู่ที่ระดับกลาง พบว่า ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและระยะเวลาในการสกัดอยู่ที่ระดับสูง การที่ปริมาณพอลิ-แซ็กคาไรด์สูงขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากแรงขับเคลื่อนของการถ่ายโอนมวล (driving force for the mass transfer) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น (Bendahou et al., 2007) และ น้ำตาลอิสระในตัวอย่างสาหร่ายสามารถละลายได้มากขึ้นเนื่องจากปริมาณน้ำ (ตัวทำละลาย) ที่มากขึ้นสำหรับระยะเวลาในการสกัดนั้น ถ้าใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น จะส่งผลดีต่อผลผลิตของพอลิ-แซ็กคาไรด์ (Hou and Chen, 2008) เมื่อนำกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบของอิทธิพลร่วมระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและระยะเวลาในการสกัดในรูปที่ 4 มาแสดงในลักษณะกราฟโครงร่างและกำหนดให้ระดับของจำนวนรอบในการสกัดอยู่ที่ระดับกลาง จะเห็นความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและระยะเวลาในการสกัดที่ส่งผลต่อปริมาณพอลิ-แซ็กคาไรด์ที่สกัดได้มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง (non linear effect) ดังรูปที่ 5 โดยที่เส้นโค้งทางขวาสุดของกราฟแสดงถึงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 50 กรัมต่อสาหร่าย 100 กรัม ส่วนเส้นโค้งที่ถัดออกจะแสดงถึงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่เริ่มลดลง คือ 40 30 และ 20 กรัมต่อสาหร่าย 100 กรัม ตามลำดับ

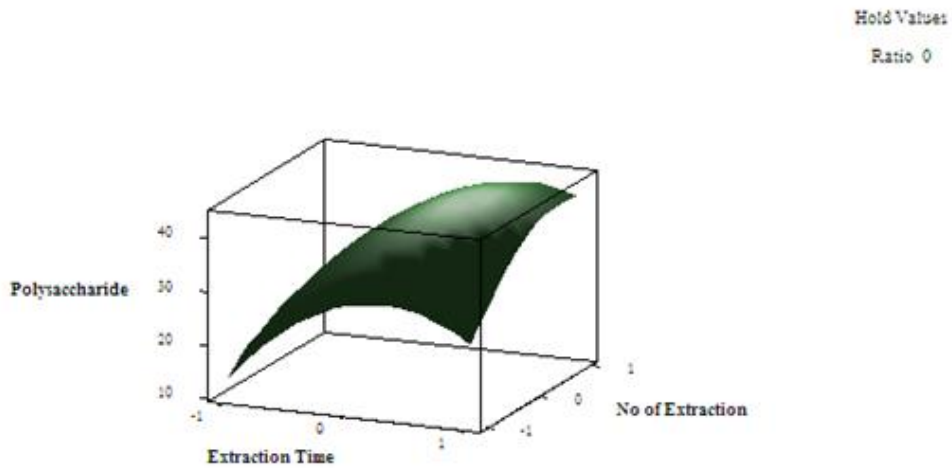


รูปที่ 4 พื้นผิวผลตอบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและระยะเวลาในการสกัด



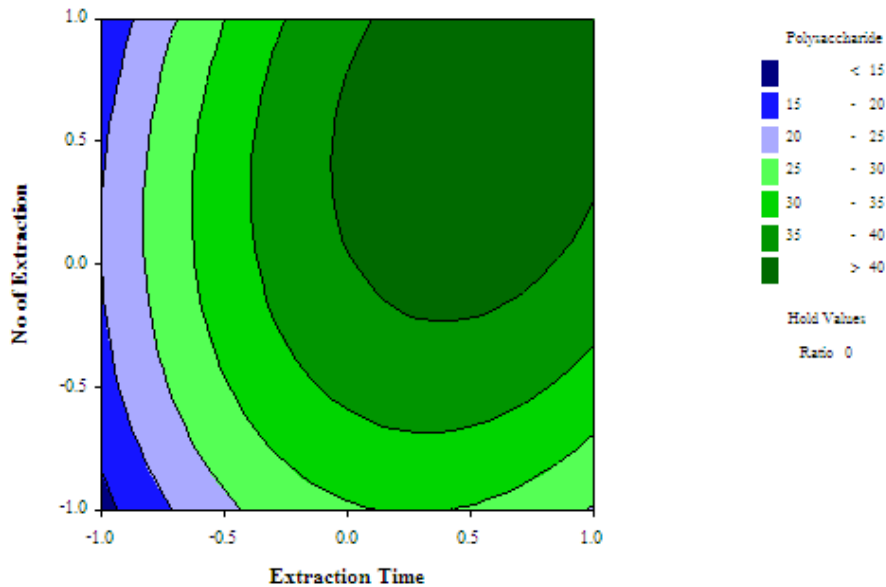
รูปที่ 5 กราฟโครงร่างระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและระยะเวลาในการสกัด

Surface Plot of Polysaccharide vs No of Extraction, Time



รูปที่ 6 พื้นผิวผลตอบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ระหว่างระยะเวลาในการสกัดและจำนวนรอบในการสกัด

Contour Plot of Polysaccharide vs No of Extraction, Time



รูปที่ 7 กราฟโครงร่างระหว่างระยะเวลาในการสกัดและจำนวนรอบในการสกัด

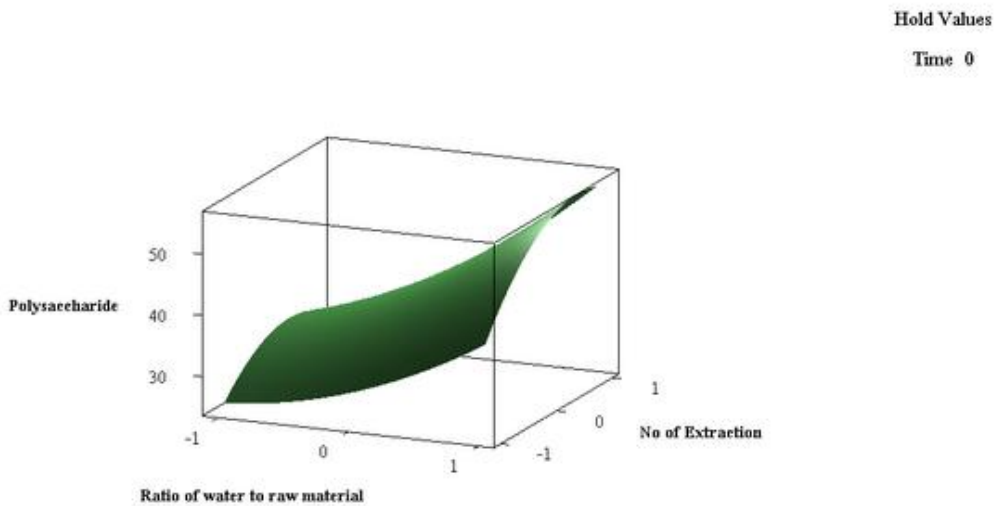
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ในรูปที่ 6 ระหว่างระยะเวลาในการสกัดและจำนวนรอบในการสกัด โดยกำหนดให้ระดับของอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายพม nang กับน้ำอยู่ที่ระดับกลาง พบว่า ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เพิ่ม

มากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการสกัดและจำนวนรอบในการสกัดอยู่ที่ระดับสูง เมื่อนำกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบของอิทธิพลร่วมระหว่างระยะเวลาในการสกัดกับจำนวนรอบในการสกัดในรูปที่ 6 มาแสดงในลักษณะกราฟโครงร่างและกำหนดให้ระดับของอัตราส่วนระหว่าง

สำหรับผมนางกับน้ำอยู่ที่ระดับกลาง จะเห็นความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการสกัดกับจำนวนรอบในการสกัดที่ส่งผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรงเช่นเดียวกันดังรูปที่ 7 โดยที่เส้นโค้งทางขวาสุดของกราฟแสดงถึงปริมาณพอลิ-

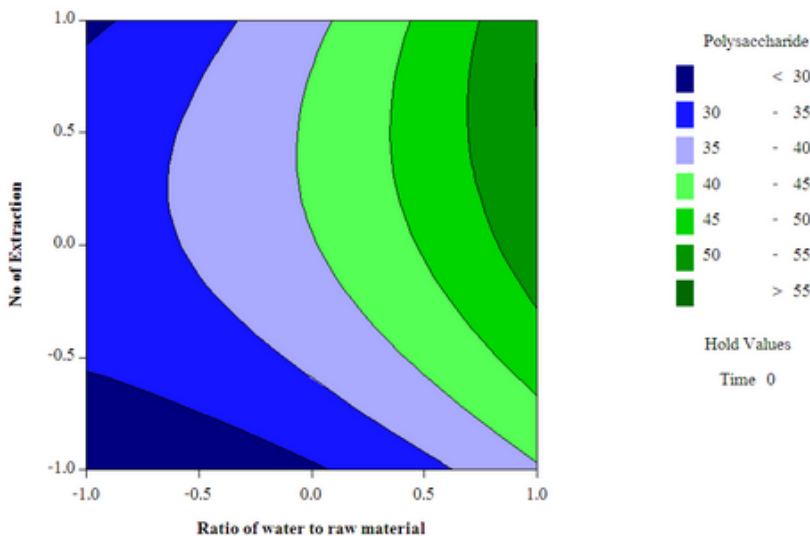
แซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 40 กรัมต่อสาหร่าย 100 กรัม ส่วนเส้นโค้งที่ถัดออกจะแสดงถึงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่เริ่มลดลง คือ 35 30 25 20 และ 15 กรัมต่อสาหร่าย 100 กรัม ตามลำดับ

Surface Plot of Polysaccharide vs No of Extraction, Ratio



รูปที่ 8 พื้นผิวผลตอบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและจำนวนรอบในการสกัด

Contour Plot of Polysaccharide vs No of Extraction, Ratio



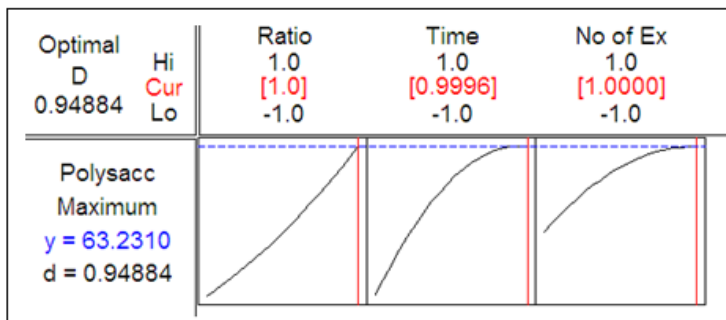
รูปที่ 9 กราฟโครงสร้างระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและจำนวนรอบในการสกัด

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบแทน ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ในรูปที่ 8 ระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและจำนวนรอบในการสกัด โดยกำหนดให้ระดับของระยะเวลาในการสกัดอยู่ที่ระดับกลาง พบว่า ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นเมื่ออัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและจำนวนรอบในการสกัดอยู่ที่ระดับสูง เมื่อนำกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบแทนของอิทธิพลร่วมระหว่างอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและจำนวนรอบในการสกัดในรูปที่ 8 มาแสดงในลักษณะกราฟโครงร่างและกำหนดให้ระดับของระยะเวลาในการสกัดอยู่ที่ระดับกลาง จะเห็นความสัมพันธ์ของอัตราส่วนระหว่างสาหร่ายกับน้ำและจำนวนรอบในการสกัดที่ส่งผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้มีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง เช่นเดียวกันดังรูปที่ 9 โดยที่เส้นโค้งทางขวาสุดของกราฟแสดงถึงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 55 กรัมต่อสาหร่าย 100 กรัม ส่วนเส้นโค้งที่ถัดออกจะแสดงถึงปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่เริ่มลดลง คือ 50 45 40 35 และ 30 กรัมต่อสาหร่าย 100 กรัม ตามลำดับ

### 2.6 การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากสาหร่ายผสมนางมากที่สุดโดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer ในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติซึ่งเป็นฟังก์ชันที่ใช้หาค่าที่เหมาะสมที่สุดของปัจจัยและใช้วัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบแทน (composite desirability: D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบแทนมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้า D มีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์

จากการหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนาง คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผสมนางต่อน้ำที่ 1.0 ระยะเวลาในการสกัดที่ 0.9996 และจำนวนรอบในการสกัดที่ 1.0 ดังรูปที่ 10 เมื่อแปลงเป็นค่าจริงที่ใช้ในการสกัดจะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผสมนางต่อน้ำที่ 1:35 ระยะเวลาในการสกัดที่ 60 นาที และจำนวนรอบในการสกัดที่ 3 รอบ ซึ่งทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 63.23 กรัมต่อ 100 กรัม สาหร่าย โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 0.9488



รูปที่ 10 การวิเคราะห์ระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ใช้ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผสมนาง

## สรุป

จากการประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนางโดยใช้หลักการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน พบว่า ปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผมนางกับน้ำ ( $X_1$ ) ระยะเวลาในการสกัด ( $X_2$ ) และจำนวนรอบในการสกัด ( $X_3$ ) มีผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ โดยทั้ง 3 ปัจจัย มีผลที่เกี่ยวข้องซึ่งกันและกัน ซึ่งสามารถแสดงในรูปของสมการสำหรับทำนายปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายผมนาง คือ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ  $40.9963 + 9.8988X_1 + 9.1438X_2 + 4.7150X_3 - 10.4592X_2^2 - 5.4467X_3^2 + 6.6825X_1X_2$  โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจเท่ากับ 0.915 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer พบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายผมนาง คือ อัตราส่วนระหว่างสาหร่ายผมนางต่อน้ำที่ 1:35 ระยะเวลาในการสกัดที่ 60 นาที และจำนวนรอบในการสกัดที่ 3 รอบ ซึ่งทำให้พอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้เท่ากับ 63.2310 กรัมต่อ 100 กรัมสาหร่าย โดยมีค่าความพึงพอใจรวมเท่ากับ 0.948

## เอกสารอ้างอิง

- ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และ พงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์. (2551). การออกแบบและการวิเคราะห์การทดลอง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ท็อป. 277-280.
- Araki, C. (1966). Some recent studies on the polysaccharide of agarophytes. In Young, E.G. and Maclachan, J.L. (Eds.). Proceedings International Seaweed Symposium 5. London: Pergamon Press. pp. 3-117.
- Armisen, R. and Galactas, F. (1987). Production, properties and uses of agar. In McHugh, D.J. (Ed.). Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO Fisheries Technical Paper 288. Rome: FAO. pp. 1-57.
- Bansemir, A., Blume, M., Schroder, S. and Lindequist, U. (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 252(1): 79-84.
- Bendahou, A., Dufresne, A., Kaddami, H. and Habibi, Y. (2007). Isolation and structural characterization of hemicelluloses from palm of *Phoenix dactylifera* L. *Carbohydrate Polymers* 68: 601-608.
- Box, G. E. P. and Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* 2: 455-475.
- 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(3): 350-356.
- Fitton J. (2006). Antiviral properties of marine algae. Section 9. Advances in applied phycology utilization. In World Seaweed Resources, an Authoritative Reference system. Amsterdam: ETI Bioinformatics.
- Gan, C. Y. and Latiff, A. A. (2011). Extraction of antioxidant pectic-polysaccharide from mangosteen (*Garcinia mangostana*) rind: optimization using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 83: 600-607.
- Hou, X. J. and Chen, W. (2008). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 72: 67-74.



- Hu, R. (1999). Food Product Design: A Computer Aided Statistical Approach. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc. pp 79-80.
- Kuda, T., Tsunekana, M., Goto, H. and Araki, Y. (2005). Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. Journal of Food Composition and Analysis 18: 625-633.
- Lai, M. F. and Lii, C. (1997). Rheological and thermal characteristics of gel structures from various agar fractions. International Journal of Biological Macromolecules 21: 123-130.
- Lewmanomont, K. (1998). The seaweed resources of Thailand. In Critchley, A.T. and Ohno, M. (eds.). Seaweed Resources of the World. Japan International Cooperation Agency. pp. 70-78.
- Mazumder, S., Ghosal, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B. and Ray, B. (2002). Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*). International Journal of Biological Macromolecules 31 (1): 87-95.
- Montgomery, D.C. (2001). Design and analysis of experiments. New York: John Wiley & Sons Inc. pp. 427 -510.
- Praiboon, J., Chirapart, A., Akakabe, Y., Bhumibhamon, O. and Kajiwara, T. (2006). Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. Science Asia 32 Supplement 1: 11-17.
- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Nin, X. and Li, Z. (2005). Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. International Journal of Biological Macromolecules 37: 195-199.
- Wen, X., Peng, C., Zhou, H., Lin, Z., Lin, G., Chen, S. and Li, P. (2006). Nutritional composition and assessment of *Gracilaria lemaneiformis* Bory. Journal of Integrative Plant Biology 48(9): 1047-1053.

