

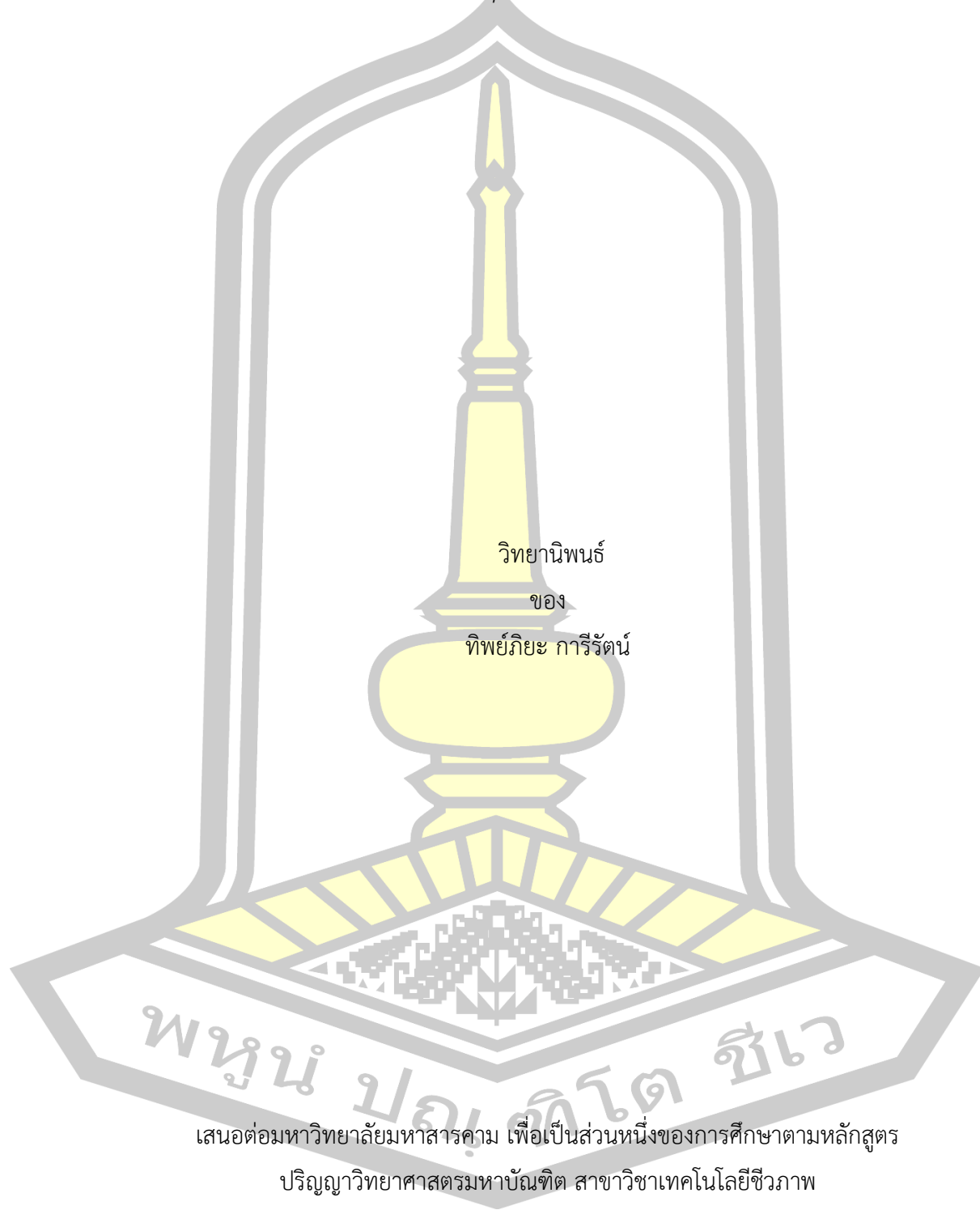
ผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Bacillus tequilensis* PS21

วิทยานิพนธ์
ของ
ทิพย์ภียะ การิรัตน์

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
กันยายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ *Bacillus tequilensis* PS21

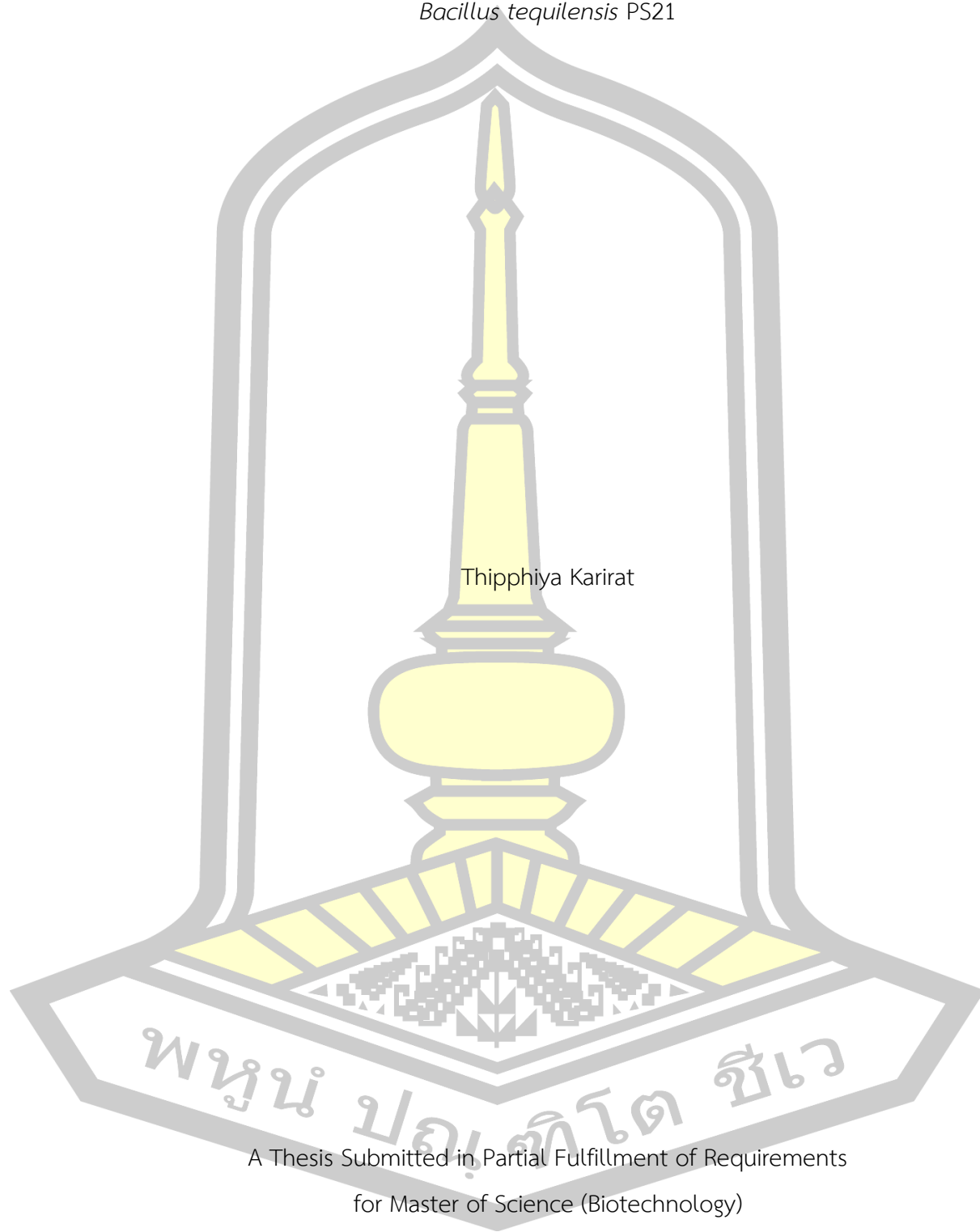


กันยายน 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Effect of riceberry broken rice and soybean meal on the Exopolysaccharide by
Bacillus tequilensis PS21

Thipphiya Karirat



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology)

September 2021

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวทิพย์ภิยะ การิรัตน์
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. สุรัชย์ รัตนสุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม)

.....กรรมการ

(ผศ. ดร. ประภัสสร บุขหมั่น)

.....กรรมการ

(รศ. ดร. อภิเดช แสงดี)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(ผศ. ดร. สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ)

(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของ <i>Bacillus tequilensis</i> PS21		
ผู้วิจัย	ทิพย์ภิยะ การิรัตน์		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม		
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2564

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยแบคทีเรีย *Bacillus tequilensis* PS21 โดยมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ คุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง ได้นำเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology ;RSM) มาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ตามแผนการออกแบบทดลองแบบประสมกลาง (central composite design; CCD) ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 4 ปัจจัย ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน (X_1) แหล่งไนโตรเจน (X_2) อุณหภูมิ (X_3) และพีเอช (X_4) สำหรับปัจจัยแรก คือ แหล่งคาร์บอนใช้ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 3 ระดับ ได้แก่ 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สอง คือแหล่งไนโตรเจนใช้กากถั่วเหลือง 3 ระดับ ได้แก่ 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สามที่ศึกษา คือ อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 5 ระดับ ได้แก่ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส และปัจจัยที่สี่ที่ศึกษา คือ ค่าพีเอชในการเพาะเลี้ยงเชื้อ 5 ระดับ ได้แก่ 4 5 6 7 และ 8 จากผลการทดลอง พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นด้วย สมการรีเกรสชันที่ใช้ทำนายปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทั้ง 3 สมการ มีค่าสัมประสิทธิ์สมการเชิงเส้นที่สูง ($R^2 = 0.96-0.97$) สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้แก่ แหล่งคาร์บอนใช้ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจนใช้ผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ใช้เท่ากับ 39 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเท่ากับ 6.66 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มากที่สุดเท่ากับ 39.82 ± 0.03 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared บ่งบอกถึงการมีอยู่ของหมู่ฟังก์ชันของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน สันฐานวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า มีพื้นผิวเรียบ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค High

Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า ชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เป็นชนิด เฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ กลูโคส และ ซาโลส ในอัตราส่วน 7 : 1 บ่งบอกว่าในทุก ๆ 8 โมโนเมอร์ของน้ำตาลที่มาต่อกัน จะประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส 7 หน่วย และ น้ำตาลซาโลส 1 หน่วย องค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 591.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โปรตีน 25.13 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกรด นิวคลีอิก 86.67 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่า การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 48.02 ± 0.15 เปอร์เซ็นต์ และวิธี FRAP เท่ากับ 1.25 ± 0.04 มิลลิกรัม Fe(II) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งลำไส้ เซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งปากมดลูก ด้วยเทคนิค MTT ผลการวิจัย พบว่า สารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2, เซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29, เซลล์มะเร็งปอด A549 และ เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ที่เวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง มีค่า Emax เท่ากับ 54.16 ± 16.52 , 51.08 ± 0.79 , 34.64 ± 0.31 และ 34.63 ± 8.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รายงานวิจัยนี้แสดงผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดย *Bacillus* sp. สูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้ และเป็นวิธีใหม่ในการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลือง

คำสำคัญ : เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์, วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร, *Bacillus tequilensis*, กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ, การประยุกต์ใช้

พูน ปณ ภิโต ชีเว

TITLE	Effect of riceberry broken rice and soybean meal on the Exopolysaccharide by <i>Bacillus tequilensis</i> PS21		
AUTHOR	Thipphiya Karirat		
ADVISORS	Assistant Professor Vijitra Luangin , Ph.D. Assistant Professor Sirirat Deeseenthum , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biotechnology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2021

ABSTRACT

This work aimed to study the effect of riceberry broken rice and soybean meal on EPS production by *Bacillus tequilensis* PS21, determine to optimize conditions for the production of EPS, physical and chemical, as well as the antioxidant properties. Response surface methodology (RSM) was used to optimize the preparation condition of EPS product by central composite design (CCD) of four-factor, namely carbon source (X_1) nitrogen source (X_2) temperature (X_3), and pH (X_4). The first factor studied, the carbon source was studied using riceberry broken rice powder at 4, 5, and 6% nitrogen sources using soybean meal powder at 1, 2, and 3%, fermentation conditions at different temperatures (25, 30, 35, 40, and 45 °C) and pH (4, 5, 6, 7, and 8). The results showed that the EPS yield increased significantly along with bacteria growth. The two fitted regression equations for the EPS product showed a high regression coefficient value (0.96-0.97). The optimum condition for EPS production is riceberry broken rice powder at 5% and 3% soybean meal powder at a temperature of 39.51 °C and pH 6.66. EPS content 39.82 ± 0.03 g/L. The function of EPS showed that carbohydrate and protein-bound by FTIR analysis and SEM analysis showed the morphology to be a smooth surface, covered with pores. The analysis of sugar composition in crud EPS using HPLC shows that heteropolysaccharide consists of two units with the following molar ratios; glucose (7.4) and xylose (1) Chemical components of this EPS were predominantly carbohydrate (591.19 mg/g DW), protein (25.13 mg/g DW) and nucleic acid (86.67 mg/g DW). The Antioxidant capacity of EPS by DPPH was

48.02±0.15% and FRAP value was 1.25 ± 0.04 mg FeSO₄/g DW. The bioactivity of crude exopolysaccharide on cells availability and cells division of hepatocellular carcinoma HepG2, colon adenocarcinoma HT29, non-small lung adenocarcinoma A549, and human cervical carcinoma HeLa cells by MTT assay. The results showed that the toxicity of crude EPS extracts on the hepatocellular carcinoma HepG2, colon adenocarcinoma HT29, non-small lung adenocarcinoma A549, and human cervical carcinoma HeLa at 48 h incubation were 54.16±16.52, 51.08±0.79, 34.64±0.31 and 34.63±8.66 %, respectively. A higher yield was achieved than in the previous reports by *Bacillus* spp. and a new method to produce bioproducts from agricultural wastes such as broken rice riceberry and soybean meal was discovered in this work.

Keyword : Exopolysaccharide Agro industrial waste *Bacillus tequilensis* Antioxydant activity Application



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภทบัณฑิตศึกษาประจำปี พ.ศ. 2563

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา หลวงอินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ตีศรีธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ รัตนสุข ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิเดช แสงดี กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประภัสสร บุขหมั่น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิรยา ศรีผ่อง ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่อบรมสั่งสอนให้ความรู้ต่อศิษย์

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณนายวรโชติ แสงหา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณเครือข่ายองค์กรชุมชนเครือข่ายอีสาน (E-san Enterprise Agrarian Network) จังหวัดร้อยเอ็ด ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านวัตถุดิบในการวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุกสิ่งด้วยดีตลอดมา ทั้งคำปรึกษากำลังใจ และให้โอกาสทางการศึกษา ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณประโยชน์และคุณค่าจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการอบรมสั่งสอน ทั้งวิชาการ คุณธรรม จริยธรรม แก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ทิพย์ภียะ การิรัตน์

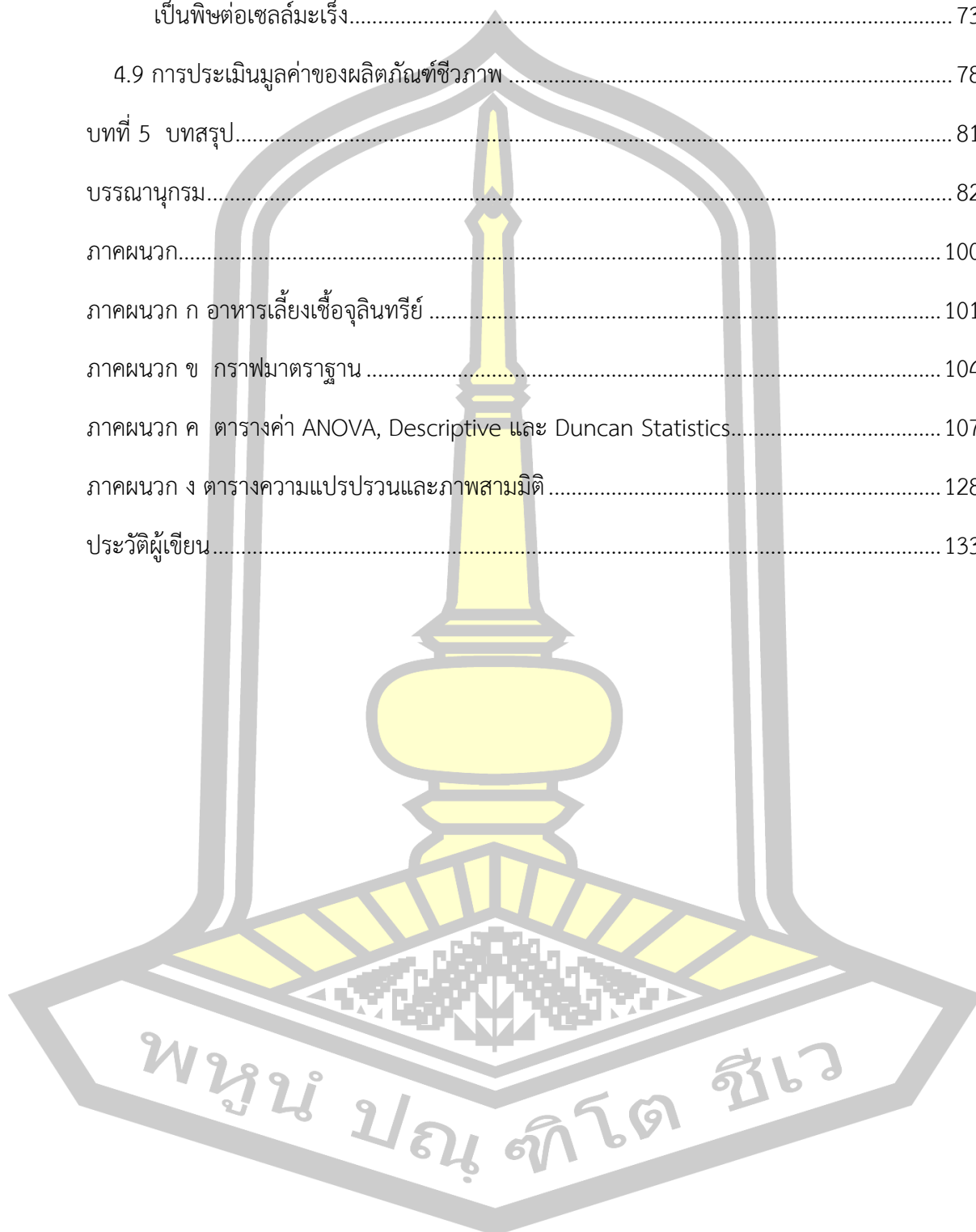
สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ณ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของงานวิจัย.....	3
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry).....	6
2.2 กากถั่วเหลือง (Soybean meal).....	7
2.3 เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS).....	7
2.3.1 โฮโมโพลีแซคคาไรด์ (homopolysaccharide).....	9
2.3.2 เฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide).....	10
2.3.3 แบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	10
2.3.4 การสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	12
2.3.5 การใช้ประโยชน์ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	13

2.4 <i>Bacillus tequilensis</i> และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	16
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	19
2.5.1 ชนิดของจุลินทรีย์	19
2.5.2 แหล่งคาร์บอน (carbon source)	19
2.5.3 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)	20
2.5.4 อุณหภูมิ (Temperature)	20
2.5.5 ค่าพีเอชเริ่มต้น (pH).....	21
2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds)	23
2.7 การทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Designs; CCD)	23
2.8 การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology).....	26
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	29
3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย.....	30
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	33
3.2.1 แบคทีเรีย <i>B. tequilensis</i> PS21	33
3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย	35
3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง.....	35
3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร	35
3.4.2 การเพาะเลี้ยง	36
3.4.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ <i>B. tequilensis</i> PS21	36
3.4.3.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อ ค่าพีเอช และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	36
3.4.3.2 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ระหว่างกระบวนการหมัก	36
3.4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)	37

3.4.6 การสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์หยาบและการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต้น	39
3.4.7 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	39
3.4.7.1 การศึกษาหองค์ประกอบทางเคมีในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	39
3.4.7.2 การศึกษาหองค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วย High Performance Liquid Chromatography	40
3.4.7.3 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม อินฟราเรด	40
3.4.7.4 การศึกษาลักษณะของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยการสแกนด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	40
3.4.6 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	41
3.4.6.1 วิธี DPPH	41
3.4.6.2 วิธี FRAP	41
3.4.7 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการมีชีวิตรอดของ เซลล์มะเร็ง	41
3.4.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง	41
3.4.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง	42
3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล	43
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ	44
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	45
4.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ <i>B. tequilensis</i> PS21	52
ด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM)	52
4.3 การศึกษาหองค์ประกอบทางเคมีในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	64
4.4 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด	65
4.5 การศึกษาหองค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วย HPLC	67
4.7 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	71

4.8 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและความ เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง.....	73
4.9 การประเมินมูลค่าของผลิตภัณฑ์ชีวภาพ	78
บทที่ 5 บทสรุป.....	81
บรรณานุกรม.....	82
ภาคผนวก.....	100
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	101
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน	104
ภาคผนวก ค ตารางค่า ANOVA, Descriptive และ Duncan Statistics.....	107
ภาคผนวก ง ตารางความแปรปรวนและภาพสามมิติ	128
ประวัติผู้เขียน.....	133



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	10
ตารางที่ 2 โพลีแซคคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม	15
ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	21
ตารางที่ 4 แผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ของตัวแปรอิสระ (Independent variables)	24
ตารางที่ 5 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย.....	30
ตารางที่ 6 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ <i>B. tequilensis</i> PS21 ที่แยกได้จากคีเฟอร์นม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง	34
ตารางที่ 7 สิ่งทดลองตามแผนการทดลองแบบ CCD โดยมีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และพีเอช เป็นปัจจัยที่ศึกษา	38
ตารางที่ 8 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดย	45
ตารางที่ 9 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดย <i>Bacillus</i> spp.....	51
ตารางที่ 10 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ผงกากถั่วเหลือง อุณหภูมิ และค่าพีเอช ต่อการผลิต	52
ตารางที่ 11 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ผงกากถั่วเหลือง อุณหภูมิ และค่าพีเอช ต่อการเจริญของ	54
ตารางที่ 12 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ <i>B. tequilensis</i> PS21 ..	57
ตารางที่ 13 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดจากเชื้อ <i>B. tequilensis</i> PS21 ที่ 72 ชั่วโมง.....	59
ตารางที่ 14 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง.....	59
ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ <i>B. tequilensis</i> PS21	64
ตารางที่ 16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	70
ตารางที่ 17 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากสภาวะที่เหมาะสมโดย	72

ตารางที่ 18 ค่าการรอดชีวิต (Cell viability) ของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อเซลล์มะเร็ง	76
ตารางที่ 19 ต้นทุนการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และราคาเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทางการตลาด.....	80
ตารางที่ 20 Descriptive ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	108
ตารางที่ 21 ANOVA ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์...	109
ตารางที่ 22 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัดหยาบ.....	109
ตารางที่ 23 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดหยาบ	110
ตารางที่ 24 Descriptive ขององค์ประกอบชีวเคมีจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	110
ตารางที่ 25 ANOVA ขององค์ประกอบชีวเคมีจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	112
ตารางที่ 26 Duncan ขององค์ประกอบของน้ำตาลรีดิวซ์จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	113
ตารางที่ 27 Duncan ขององค์ประกอบของน้ำตาลทั้งหมดจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	113
ตารางที่ 28 Duncan ขององค์ประกอบของโปรตีนจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	114
ตารางที่ 29 Duncan ขององค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	114
ตารางที่ 30 Descriptive ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	115
ตารางที่ 31 ANOVA ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	119
ตารางที่ 32 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	120
ตารางที่ 33 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	121
ตารางที่ 34 Duncan การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	123
ตารางที่ 35 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	124
ตารางที่ 36 Descriptive ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Emax) จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	126
ตารางที่ 37 ANOVA ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Emax) จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	126

ตารางที่ 38 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Emax) จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
..... 127

ตารางที่ 39 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ B. tequilensis PS21 129

ตารางที่ 40 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ B. tequilensis PS21 130

ตารางที่ 41 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ B. tequilensis PS21 131



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry).....	6
ภาพที่ 2 กากถั่วเหลือง (Soybean meal).....	7
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	9
ภาพที่ 4 การจำแนกประเภทของแบคทีเรียเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	9
ภาพที่ 5 โยโมโพลีแซคคาไรด์และเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์.....	10
ภาพที่ 6 วิธีสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก.....	13
ภาพที่ 7 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก B. tequilensis.....	17
ภาพที่ 8 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดย B. tequilensis	18
ภาพที่ 9 จุดของการออกแบบการทดลองแบบ CCD 3 ปัจจัย	24
ภาพที่ 10 การแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรในรูปกราฟสามมิติ	27
ภาพที่ 11 ลักษณะของเชื้อ B. tequilensis PS21 บนอาหารแข็งที่มีการเติมผงข้าวไรซ์เบอร์รี่	34
ภาพที่ 12 การตกตะกอนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเอทานอล	37
ภาพที่ 13 ผลิตภัณฑ์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้งของ B. tequilensis PS21 ที่เพาะเลี้ยงในผงข้าวหัก ไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลืองในปริมาณแตกต่างกัน (A: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 4 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์, B: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ และ C: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 6 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์)	47
ภาพที่ 14 การเจริญของ B. tequilensis PS21 และค่าพีเอชในการหมัก 72 ชั่วโมง.....	48
ภาพที่ 15 ผลการตอบสนองระหว่างผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลือง (A), ระหว่างผง	56
ภาพที่ 16 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	62
ภาพที่ 17 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	63
ภาพที่ 18 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์.....	63

ภาพที่ 19 การวิเคราะห์ FTIR ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สกัดหยาบ ด้วย <i>B. tequilensis</i> PS21 เพาะเลี้ยงใน ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 39.51	66
ภาพที่ 20 การวิเคราะห์ HPLC ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สกัดหยาบ ด้วย <i>B. tequilensis</i> PS21 เพาะเลี้ยงใน ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 3 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 39.51	67
ภาพที่ 21 ลักษณะของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สกัดหยาบที่ผลิตโดย <i>B. tequilensis</i> PS21 เพาะเลี้ยง ใน ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 39.51 องศาเซลเซียส และค่า พีเอช 6.66 โดยการสแกนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	69
ภาพที่ 22 ผลของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยใช้สารสกัดที่ความ เข้มข้น 0-1600 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร A; มะเร็งตับ B; มะเร็งลำไส้ C; มะเร็งปอด D; มะเร็งปาก มดลูก ที่เวลาการบ่ม 24-48 ชั่วโมง โดยวิธี MTT ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ การทดลอง 3 ซ้ำ.....	75
ภาพที่ 23 กราฟของสารมาตรฐานโทรลลิกซ์ (Trolox).....	105
ภาพที่ 24 กราฟของสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	105
ภาพที่ 25 กราฟของสารมาตรฐานกลูโคส.....	106
ภาพที่ 26 กราฟของสารมาตรฐานโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน	106



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันโลกมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วของเสียเพิ่มขึ้นทุกวันในปริมาณมากซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและมนุษย์เป็นอย่างมาก ทุกภาคอุตสาหกรรมจึงมีความต้องการลดปัญหาของเสียและการนำไปใช้ประโยชน์จากของเสียอย่างปลอดภัยผ่านการรีไซเคิลขยะ ซึ่งอุตสาหกรรมมีการปล่อยของเสียออกมาจำนวนมากในกระบวนการผลิตสินค้าส่งออกภายในและภายนอกประเทศ และมีผลพลอยได้เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตที่ยากต่อการกำจัดและมีต้นทุนที่สูง ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาการนำของเสียหรือผลพลอยได้มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เพื่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรที่มีมากและเพิ่มมูลค่าให้กับของเสียหรือผลพลอยได้ ดังนั้นของเสียหรือผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสามารถเป็นทางเลือกที่ดีในการตอบสนองต่อความต้องการใช้ประโยชน์จากของเสียและลดปัญหาของเสียที่มีจำนวนมากในปัจจุบัน ข้าวไรซ์เบอร์รี่เป็นหนึ่งในพันธุ์ข้าวที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในประเทศไทย เพราะมีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระสูงให้แก่ผู้บริโภค (Wang et al., 2010) ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากผลผลิตข้าวเปลือกประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 1,200-1,800 ตันต่อฤดูเก็บเกี่ยว) ข้าวหักเป็นข้าวที่มีความยาวสั้นลงมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ข้อดีของข้าวหัก ได้แก่ ขนาดที่เล็กและสามารถย่อยได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามย่อมมีข้อเสียคือไม่นิยมนำมาใช้กันทั่วไปในการบริโภค แต่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงสัตว์ หรือวัตถุดิบสำหรับชุบชั้น ขนมขบเคี้ยว ก๋วยเตี๋ยวจีน ที่จำหน่ายในราคาต่ำประมาณ 20 บาทต่อกิโลกรัม เพื่อที่จะสามารถใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้และสามารถช่วยเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรไทยได้อย่างเต็มเปี่ยม นักวิจัยจึงหาแนวทางใหม่ในการเปลี่ยนผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม เช่น ส่วนประกอบในเครื่องสำอาง อาหารที่มีประโยชน์ พรไบโอติก และยา เป็นต้น เป็นที่น่าสนใจคือมีแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้จากของเสียทางการเกษตร เช่น กากน้ำตาล กากน้ำตาลหัวบีทรูท กากน้ำตาลจากอ้อย (Han & Watson, 1992; Küçüka et al., 2010; Razack & Thangavelu, 2013) และน้ำมะพร้าว (Seesuriyachan et al., 2011) อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการศึกษาถึงการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และฐานข้อมูล Pubmed แสดงผลงานวิจัยในประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์น้อยมาก เพียง 17 ผลงานเท่านั้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าองค์ความรู้เกี่ยวกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทยนั้นยังมีน้อย จึงค่อนข้างยากต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณมากเพื่อใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม

จากรายงานการจัดจำแนกแบคทีเรียในก้อนคีเฟอร์ในประเทศไทยสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากน้ำตาลได้ (Luang-in et al., 2018; Luang-in & Deeseenthum, 2016) และ พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีสารต้านอนุมูลอิสระ และสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Luang-in et al., 2018) เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides; EPSs) ถูกผลิตโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่หลากหลาย ทำให้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่ซ้ำกันและซับซ้อน แต่มีคุณสมบัติทางเคมีที่น่าสนใจจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่หลากหลาย อาจนำไปสู่การค้นพบคุณสมบัติอันแปลกใหม่ที่สามารถใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าได้ เช่น เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ 프리ไบโอติก โพลีเมอร์ชีวภาพในบรรจุภัณฑ์ ไบโอบีโพลีเมอร์ในการขนส่งยา เครื่องสำอาง พลาสติกชีวภาพ และอุตสาหกรรมเภสัชกรรม การเกษตรและการแพทย์

ในประเทศไทยมีรายงานการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกได้จากคีเฟอร์นม (Luang-in & Deeseenthum, 2016) และพบว่าสารนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Luang-in et al., 2018) แต่ในกระบวนการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ยังมีต้นทุนสูง เนื่องมาจากค่าอาหารเลี้ยงเชื้อ และเอทานอลที่ใช้สกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตที่ต่ำกว่า 1 กรัมต่อลิตร หากมีการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม อาจจะได้ผลผลิต 10 กรัมต่อลิตรก็ได้

ปัจจุบันนี้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology; RSM) และการออกแบบการทดลองร่วมแบบส่วนผสมกลาง (Central composite design; CCD) ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งวิธีนี้เป็น การนำสมการทางคณิตศาสตร์และการคำนวณทางสถิติมาใช้ในการสร้างแบบจำลองเชิงประจักษ์ (empirical model) เพื่อนำไปสู่ข้อมูลที่ใช้ในการทดลองมาอธิบายอันตรกิริยา (interaction) ของตัวแปรต้นหลายตัวแปรที่ส่งผลต่อตัวแปรตามซึ่งมีข้อดีที่เหนือกว่าการออกแบบโดยใช้วิธีดั้งเดิม คือสามารถศึกษาอันตรกิริยาของตัวแปรต้นหลายตัวแปรได้ในเวลาเดียวกันจึงช่วยลดความผิดพลาดจากการศึกษาที่ละปัจจัยของวิธีดั้งเดิมได้ และเป็นที่รับการยอมรับว่าเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาความเหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม และด้านเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างมาก (Liang et al., 2012) ในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นว่า การใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus brevis* E25 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ในช่วง 10 ถึง 35 กรัมต่อลิตร ซึ่งการแปรผันของอุณหภูมิระยะเวลาในการบ่มเชื้อแบคทีเรีย และค่าพีเอช มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Ermiş et al., 2020) นอกจากนี้ยังพบว่า วิธีการพื้นผิวตอบสนองถูกนำไปใช้เพื่อหาสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 ในสภาวะที่เหมาะสมการคาดการณ์ว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ สูงสุดคือ 107.5 กรัมต่อลิตร และ

ชีวมวลที่คาดการณ์ไว้คือ 1.92 กรัมต่อลิตร (Manochai et al., 2014) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ศึกษาผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อแบคทีเรีย *B. tequilensis* PS21 โดยมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ คุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ได้นำเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) มาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ตามแผนการออกแบบการทดลองร่วมแบบส่วนผสมกลาง (central composite design, CCD) โดยใช้โปรแกรม Design – Expert Version 7.00

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาปริมาณของข้าวหักข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองที่ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
- 1.2.2 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลือง
- 1.2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
- 1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 ศึกษาปริมาณของข้าวหักข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองที่ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
- 1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยศึกษาการแปรผันแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอช และอุณหภูมิ
- 1.3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
- 1.3.4 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของงานวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ที่มาจากรัสตุเหลือใช้ทางการเกษตร และสภาวะในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่ ค่าพีเอช และอุณหภูมิ

- สมมุติฐาน :**
1. ปริมาณของข้าวหักข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
 2. สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
 3. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

กรอบแนวคิดของงานวิจัย

รายงานวิจัยก่อนหน้านี้มีการศึกษาเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. tequilensis* PS21 มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี อย่างไรก็ตามการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. tequilensis* PS21 เบื้องต้นยังคงใช้อาหารสังเคราะห์ และเติมแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นหากมีการศึกษาหาแหล่งของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกที่เป็นผลพลอยได้หรือวัสดุเหลือทิ้ง จากการเกษตร และนำมาใช้ทดแทนในการเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. tequilensis* PS21 จะช่วยลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของสินค้าทางการเกษตร และยังช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

ตัวแปรต้น

1. แหล่งคาร์บอน
 - ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่
2. แหล่งไนโตรเจน
 - กากถั่วเหลือง
3. อุณหภูมิ
4. พีเอช

ตัวแปรตาม

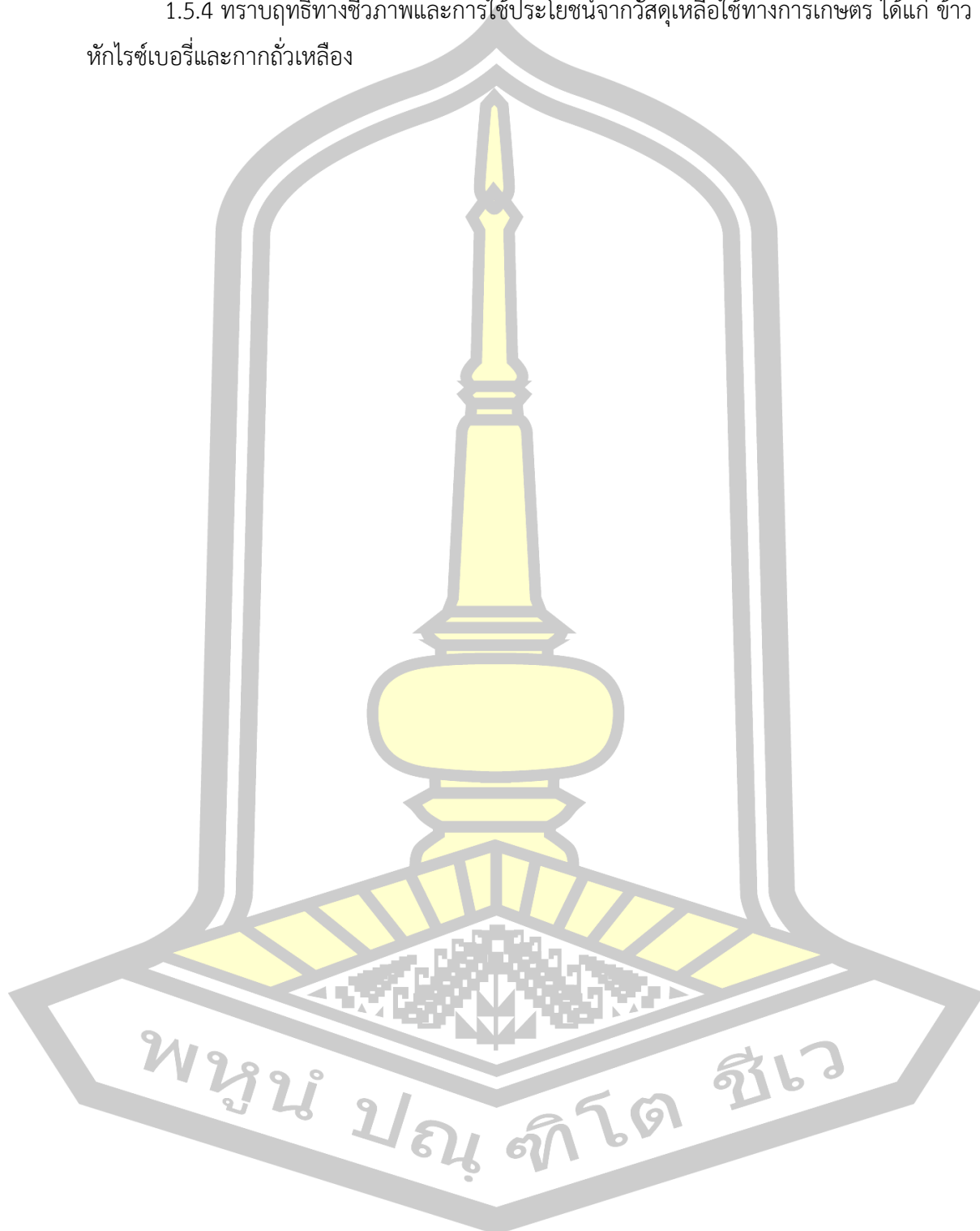
1. ผลผลิตของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
2. สภาวะที่เหมาะสมการผลิต
3. คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี
4. ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

- 1.5.1 ทราบปริมาณข้าวหักข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
- 1.5.2 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

1.5.3 ทราบคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมี

1.5.4 ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ข้าว
หักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลือง



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* L. จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae อยู่ในวงศ์ย่อย Bambusoideae (ภาพที่ 1) เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์จากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว โดยความร่วมมือของคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2557) เป็นหนึ่งในพันธุ์ข้าวที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในประเทศไทย เพราะมีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระสูงให้แก่ผู้บริโภค (Wang et al., 2010)



ภาพที่ 1 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry)
(ถ่ายภาพโดย ทิพย์ภียะ การิรัตน์)

ข้าวหัก (broken) หมายถึงเมล็ดข้าวหักที่มีความยาวตั้งแต่ 2.50 ส่วนขึ้นไป แต่ไม่ถึงความยาวของต้นพืช และรวมถึงเมล็ดข้าวที่แตกเป็นซีกที่มีเนื้อเหลืออยู่ไม่เกินร้อยละ 80 ของเมล็ด (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2560)

ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากผลผลิตข้าวเปลือกประมาณ 20-30% (ประมาณ 1,200-1,800 ตันต่อฤดูเก็บเกี่ยว) ข้าวหักเป็นข้าวที่มีความยาวสั้นลงมากกว่า 20% (Sutherland, 1999) ในรายงานก่อนหน้านี้สารสกัดข้าวหักแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Roseline, 2013; Tan et al., 2015) ข้อดีของข้าวหัก ได้แก่ ขนาดที่เล็กและสามารถย่อยได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตาม มีข้อเสียคือไม่นิยมนำมาใช้กันทั่วไปในการบริโภคและใช้เป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงสัตว์

(Luang-in et al., 2018) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และน้ำมันรำข้าวไรซ์เบอร์รี่จากกระบวนการผลิตข้าวอินทรีย์ในประเทศไทย มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในเครื่องสำอางเพื่อบำรุงเส้นผมและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลพลอยได้ทางการเกษตร

2.2 กากถั่วเหลือง (Soybean meal)

กากถั่วเหลือง (Soybean meal, SBM) คือ ผลพลอยได้ที่ได้จากการสกัดถั่วเหลือง มีลักษณะเป็นเกล็ดเล็ก ๆ มีสีเหลือง หรือสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 2) ซึ่งกากถั่วเหลืองมาจากถั่วเหลืองที่มีความน่าสนใจ โดยกากถั่วเหลืองแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ กากถั่วเหลืองรวมเปลือก (dehulled soybean meal) และกากถั่วเหลืองไม่รวมเปลือก (non dehulled soybean meal) กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญในอาหารสัตว์ปีกและเป็นหนึ่งในส่วนผสมที่มีคุณภาพที่ดีเพราะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด (Park et al., 1992)



ภาพที่ 2 กากถั่วเหลือง (Soybean meal)
(ถ่ายภาพโดย ทิพย์ภียะ การิรัตน์)

2.3 เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS)

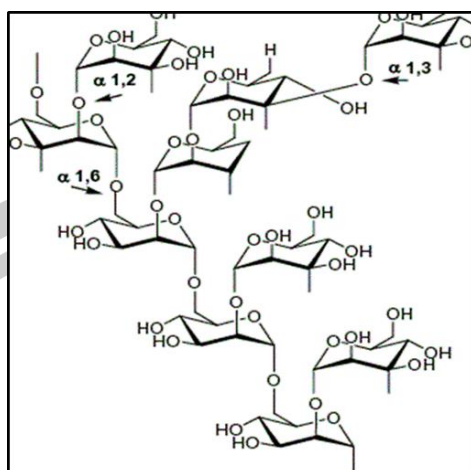
เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ คือ โพลีแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์สร้างหรือผลิตขึ้นในขณะที่มีการเจริญและขับออกมาภายนอกผนังเซลล์ (ภาพที่ 3) มีลักษณะเป็นเมือก (slime) หรือยังคงติดอยู่กับผนังเซลล์ในลักษณะของแคปซูล (capsule) (Razack & Thangavelu, 2013; Vuyst & Degeest, 1999) ซึ่งแคปซูลหรือสารเมือกเป็นโครงสร้างของแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมนมในการเพิ่มความหนืดให้แก่ผลิตภัณฑ์ เช่น โยเกิร์ตหรือโยเกิร์ตพร้อมดื่ม (drinking yogurt) เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มักมีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากกว่า 10^6 ดาลตัน ซึ่งเป็นโพลีเมอร์คาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ที่เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของโพลีเมอร์

นอกเซลล์ที่อยู่รอบ ๆ เซลล์จุลินทรีย์ องค์ประกอบของโพลีเมอร์เหล่านี้รวมถึงน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ เช่น กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส ซึ่งเป็นโมโนเมอร์ทั่วไป (Nichols et al., 2005; Sutherland, 2001) โดยที่โมเลกุลของน้ำตาลจะต่อกันแบบซ้ำ ๆ ระหว่าง 3 – 7 หน่วย

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3) และจุลินทรีย์สกุลเดียวกันแต่แตกต่างกันที่สายพันธุ์ก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกัน เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อาจประกอบไปด้วย โมโนแซคคาไรด์ชนิดเดียวกันที่มาเชื่อมต่อกันเรียกว่า โฮโมโพลีแซคคาไรด์ (homopolysaccharides) หรือประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์สองชนิดหรือมากกว่านั้นมาต่อกัน เรียกว่าเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ (heteropolysaccharides) (Kumar et al., 2011) ซึ่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย (Singh et al., 2012) กล่าวว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งอาร์เคีย แบคทีเรีย ยีสต์ รา และสาหร่าย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มมีโซไฟล์ (mesophilic) เทอร์โมฟิลิก (thermophilic) และกลุ่มแฮโลฟิลิก (halophilic) ซึ่งแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มมีโซไฟล์ได้แก่ Lactic acid bacteria (LAB) *Bacillus* sp., *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, และ *Streptococcus* sp. ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ดีที่สุด แบคทีเรียกลุ่มเทอร์โมฟิลิก เช่น *Thermococcus*, *Sulfolobus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermococcus litoralis* และแบคทีเรียกลุ่มแฮโลฟิลิก *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronococcus*, และ *Halobacterium*

จากการศึกษาของ Van den Berg et al (1995) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจะเป็นตัวช่วยป้องกันตัวเองจากความแห้งแล้ง การถูกกิน (phagocytosis) จากโปรโตซัวเพื่อการเกาะกับพื้นผิวอื่นและเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของเชื้อเองด้วย แคปซูลจะเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ เช่น เด็กซ์ทริน (dextrin) เด็กซ์แทรน (dextran) หรือ ลีวาน (levan)

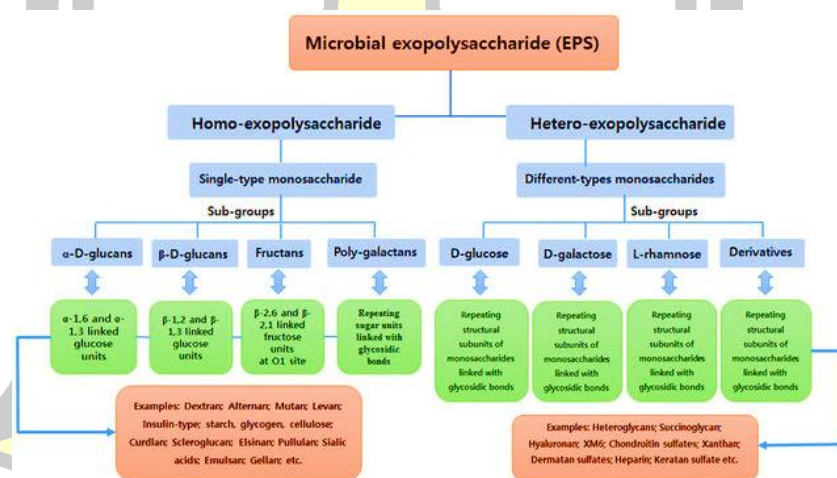
การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์เป็นการผลิตโดยอาศัยกระบวนการหมักในอาหารและการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะมีชนิดหรือความหลากหลายและลักษณะเฉพาะตัวมากกว่าโพลีแซคคาไรด์จากพืชหรือสาหร่าย โดยที่ความหลากหลายจะขึ้นกับชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีน้ำตาลถึง 200 ชนิด



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ที่มา: (Cimmino et al., 2016)

ชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ตามชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท (ภาพที่ 4) ดังนี้



ภาพที่ 4 การจำแนกประเภทของแบคทีเรียเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

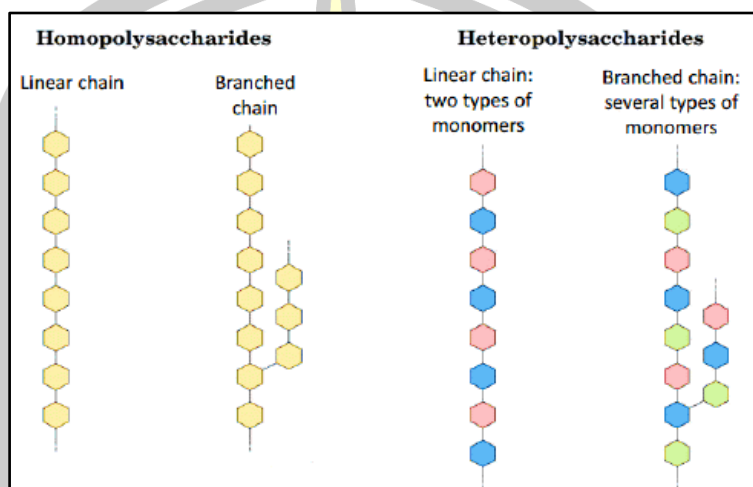
ที่มา: (Bajpai et al., 2016)

2.3.1 โฮโมโพลีแซคคาไรด์ (homopolysaccharide)

โฮโมโพลีแซคคาไรด์ เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน เช่น เซลลูโลส แป้ง คอร์แลน พลูแลน และ เดกซ์แทรน เป็นต้น (Sutherland, 1999) (ภาพที่ 5) โดยการสร้างโพลีแซคคาไรด์ประเภทนี้ได้รับการสนับสนุนว่าเกิดการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่มีความซับซ้อน

2.3.2 เฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ (heteropolysaccharide)

เฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่างชนิดกันมาเชื่อมต่อกัน เช่น แชนแทนกัม เจลแลน เพกทิน เฮมิเซลลูโลส อัลจิเนต เป็นต้น



ภาพที่ 5 โฮโมโพลิแซคคาไรด์และเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์

ที่มา : (Sanlibaba & Çakmak, 2016)

2.3.3 แบคทีเรียที่ผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์

แบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ ได้แก่

Pseudomonas aeruginosa, *Erwinia*, *Ralstonia*, และ *Azotobacter vinelandii* เป็นต้น ซึ่งเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จะปกป้องเชื้อแบคทีเรียจากความเครียดจากสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ปกป้องเซลล์จากสารต้านจุลชีพ แอนติบอดี และแบคทีเรียโอฟาจหรือเพื่อยึดติดกับแบคทีเรียอื่น ๆ (Subair et al., 2015)

ตารางที่ 1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์

ประเภท	จำนวนสิ่งพิมพ์	ชนิด (กิจกรรม / การทำงาน)	อ้างอิง
<i>Acetobacter</i>	9	<i>Acetobacter xylinum</i> (food additive)	(Couso et al., 1982)
<i>Acinetobacter</i>	47	<i>Acinetobacter</i> Sea-9 bacterium (anti-acne)	(Karlapudi et al., 2016)
<i>Enterobacter</i>	16	<i>Enterobacter</i> sp. YG4 (reduces uranium induced nephrotoxicity) <i>Enterobacter</i> A47 (bioplastic)	(Nagaraj et al., 2015) (Torres et al., 2014) (Pau-roblot et al., 2013)

		<i>Enterobacter ludwigii</i> Ez-185-17 (bioremediation) <i>Enterobacter cloacae</i> P2B (bioremediation) <i>Enterobacter cloacae</i> TU (bioemulsifier)	(Mohan & Anju, 2012) (Hua et al., 2010)
<i>Enterococcus</i>	30	<i>Enterococcus faecium</i> BDU7 (antioxidant) <i>Enterococcus faecium</i> MC13 (antibiofilm) <i>Enterococcus faecalis</i> DU10 (bio-adsorbent)	(Abdhul et al., 2014) (Kanmani et al., 2013) (Venkatesh et al., 2016)
<i>Bacillus</i>	184	<i>Bacillus tequilensis</i> PS21 (antioxidant, anti-tyrosinase) <i>Bacillus velezensis</i> KY47130 (bio-flocculants) <i>Bacillus anthracis</i> PFAB2 (antioxidant, emulsifier) <i>Bacillus paralicheniformis</i> SR14 (cytoprotection, antioxidant) <i>Bacillus licheniformis</i> (bioremediation) <i>Bacillus</i> sp. ZBP4 <i>Bacillus subtilis</i>	(Luang-in et al., 2018) (Moghannem et al., 2018) (Banerjee et al., 2018) (Cheng et al., 2017) (Upadhyay et al., 2017) (Ergene & Ayşe, 2017) (Razack & Thangavelu, 2013)
LAB	335	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 20079 (immunomodulatory)	(Deeb et al., 2018)

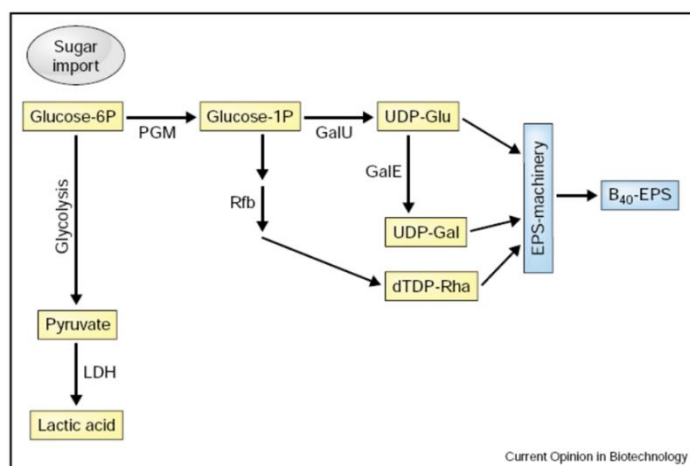
		<i>Lactobacillus paraplantarum</i> BGCG11 (anti-inflammatory)	(Cimmino et al., 2016)
		<i>Pediococcus parvulus</i> 2.6 (prebiotic)	(Pecikoza & Djoki, 2018)
		<i>Lactobacillus plantarum</i> BR2 (functional food)	(Sasikumar et al., 2017)
		<i>Lactobacillus acidophilus</i> 20079 (anti-cancer)	(Deeb et al., 2018)

2.3.4 การสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของโมโนเมอร์และการมีการขนส่งออกนอกเซลล์ การสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก สามขั้นตอน คือ การขนส่งสารตั้งต้นคาร์บอน การสังเคราะห์สารโพลีแซคคาไรด์ภายในเซลล์ และการส่งออกนอกเซลล์ (ภาพที่ 6) ดังต่อไปนี้

1. นำสารตั้งต้นคาร์บอนเข้าสู่เซลล์หรือไซโทพลาสซึม โดยน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นที่มีองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์
2. การสังเคราะห์น้ำตาล โดยน้ำตาลจะเข้าไปจับกับหมู่ฟอสเฟต จากนั้นจะมีการกระตุ้นหรือต่อกันของน้ำตาลในหน่วยซ้ำ ๆ โดยมีเอนไซม์เข้ามาเกี่ยวข้อง เมื่อน้ำตาลต่อกันในหน่วยซ้ำ ๆ จะเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอร์ไรเซชัน
3. โพลีแซคคาไรด์ภายในเซลล์จะถูกขับออกมาภายนอกเซลล์จึงเป็นอันสิ้นสุดการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

พหุบัน ปณ จิต ชีเว



ภาพที่ 6 วิธีสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก

ที่มา: (Kleerebezem & Hugenholtz, 2003)

ในการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะเกิดอยู่กับชนิดของน้ำตาลที่จุลินทรีย์ใช้ ในกรณีของโฮโมโพลีแซคคาไรด์ (เดกซ์แทรน, ลีวาน, และมิวแทน ฯลฯ) การเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันเกิดขึ้นได้ด้วยเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (glycosyltransferase, GTs) ที่สามารถเคลื่อนย้ายจากหน่วยโมโนแซคคาไรด์ไปเป็นโพลีแซคคาไรด์ โดยการเพิ่มความยาวของสายโพลีแซคคาไรด์ ในกรณีของเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์กับโมโนเมอร์ เกิดจากการรวมของหน่วยโมโนเมอร์ซ้ำที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมผ่านการทำงานของเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรสโดยเฉพาะ มีการเคลื่อนย้ายอย่างต่อเนื่องของน้ำตาลไปยังตัวนำพาไลโฟฟิลิก (lipophilic carrier) และน้ำตาลจะถูกเคลื่อนย้ายไปนอกเซลล์ ทำปฏิกิริยาโพลีเมอไรซ์ด้วยการปลดปล่อยโพลีเมอร์และการปรับเปลี่ยนทางเคมีในตอนท้าย ได้แก่ ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาอะเซทิลเลชัน (acetylation) หรือปฏิกิริยาพรีนิลเลชัน (prenylation) และการเติมฟอสเฟตหรือซัลเฟต จะดำเนินไปภายใต้การควบคุมเอนไซม์และระดับยีน ตัวอย่างการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในกรณีเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์พบในแบคทีเรียกรดแลคติก (Bajpai et al., 2016)

2.3.5 การใช้ประโยชน์ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ปัจจุบันมีการศึกษาโพลีแซคคาไรด์อย่างกว้างขวาง และพบว่าโพลีแซคคาไรด์สามารถสังเคราะห์ได้จากหลายแหล่ง ทั้ง พืช สาหร่าย และจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นทางเลือกในการผลิตทางอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ทั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์หรือสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตได้ง่ายกว่า ทำให้สามารถควบคุมคุณภาพของโพลีแซคคาไรด์ที่ต้องการผลิตให้คงที่ โดยมีคุณสมบัติที่หลากหลายของโพลีแซคคาไรด์เหล่านี้เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ใน

อุตสาหกรรมหลายแบบ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยา อุตสาหกรรมปิโตรเลียม การใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรือแม้แต่ในทางสิ่งแวดล้อม เป็นต้น ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ของโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2)

โพลีแซคคาไรด์เป็นสารที่ใช้เติมลงในอาหารเพื่อช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เพิ่มความคงตัว ปรับปรุงลักษณะที่ปรากฏของอาหารหลายชนิด และป้องกันการไหลเยิ้มของเจล (Van den Berg et al., 1995) โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากพืชโดยส่วนใหญ่นำมาใช้ในอาหารและใช้เอนไซม์ช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติ เช่น เซลลูโลส แป้ง เพกติน แอลจิเนต และ คีราจีแนน แต่เนื่องจากเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะกับสารแต่ละชนิด จึงได้มีการนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในอาหารเนื่องจากเป็นสารที่มีความหนืดสูง แม้จะใช้ในความเข้มข้นต่ำและมีคุณสมบัติเหมือนพลาสติก (Becker, 1998) โดยเด็กซ์แทรนเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเป็นตัวแรกที่เกิดจากแบคทีเรีย

แลกติกเด็กซ์แทรนถูกค้นพบในปี 1880 ในอ้อย หรือ ไซรับจากหัวบีท (beet syrups) ถูกนำมาใช้ในการผลิตเจล (Crescenzi, 1995) ความแตกต่างของโครงสร้างทำให้เด็กซ์แทรนมีคุณสมบัติละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ จึงนำมาใช้ในการผลิตลูกกวาด หมากฝรั่งและเจลลี่ เด็กซ์แทรนจะช่วยป้องกันการไหลเยิ้มของเจล ไอศกรีม และเป็นส่วนผสมในการทำขนมฟูตติ้ง

แซนแทนกัมเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย กลูโคส แมนโนส กรดกลูโคโรนิก ผลิตจากจุลินทรีย์ในปี 1969 ได้รับการยอมรับให้สามารถนำมาใช้ในอาหารได้ถึงแม้ว่าแซนแทนกัมจะผลิตจาก *Xanthomonas campestris* ซึ่งก่อโรคในพืชแต่แซนแทนกัมก็ได้รับการยอมรับสามารถนำมาใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม ลูกกวาด ซอส ขนมหั้ว น้ำผลไม้และอาหารสัตว์ หรือใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสี และอุตสาหกรรมสิ่งทอ ต้นทุนการผลิตแซนแทนกัมค่อนข้างถูกเนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ คือ กลูโคส อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถเปลี่ยนเป็นโพลิเมอร์ได้สูงเพียง 60-70 เปอร์เซ็นต์ (Sutherland, 1998)

จากรายงานของ Van den Berg et al (1995) คัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 600 สายพันธุ์จากไส้กรอก พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลกติก 30 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ *Lactobacillus sake* O-1 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดแซนแทนกัมที่มีความหนืดสูงและให้ผลผลิตสูง (1.4 กรัมต่อลิตร) เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สามารถนำไปใช้กับอาหารได้หลายชนิด โดย Low et al (1998) พบว่า *Streptococcus thermophilus* MR1-C และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* MR-1R ที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตเนยแข็งสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ ซึ่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *S. thermophilus* MR1-C อยู่ในรูปแคปซูลมีคุณสมบัติในการละลายน้ำและโครงสร้างของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ประกอบด้วย

ดี-กลูโคส แอล-แรมโนส และแอล-ฟรุกโทส ในอัตราส่วน 5:2:1

จากรายงานของ Kitazawa et al (1991) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *Lactococcus lactissus* sp. cremoris KVS20 สามารถยับยั้งมะเร็งมดลูกชนิด Sacoma-180 ได้เมื่อทดสอบโดยการฉีดเข้าช่องท้องของสัตว์ทดลองโดยการยับยั้งนั้นมีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เนื่องจากการยับยั้งจะได้ผลเมื่อทดสอบในหนูทดลอง (*in vivo*) เท่านั้น โดยไม่พบการยับยั้งเมื่อทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) เช่นเดียวกับการทดลองของ Ods et al. (1983) ที่พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactobacillus helveticus* ssp. *jurgurtti* ช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็งซึ่งได้ทำการทดลองในหนูโดยฉีดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ให้กับหนู เมื่อครบ 9 วัน สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งมดลูกได้ 144 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เป็น 40 หรือ 80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้สูงถึง 233 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* SBT 0495 สามารถกระตุ้นการผลิตแอนติบอดี ในหนูและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ลิมโฟไซต์ T และไซโตไคน์ได้อีกด้วย (Laws et al., 2001)

ตารางที่ 2 โพลีแซคคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

โพลีแซคคาไรด์	องค์ประกอบ	แหล่งที่มา	ลักษณะคุณสมบัติ	การประยุกต์
แซนแทน	กลูโคส แมนโนส กรดกลูคิวโรนิก	<i>Xanthanomonas</i> spp.	เป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ มีความหนืดสูง และมีความเสถียรในช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่กว้าง	อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมเครื่องสำอางแลทยา อุตสาหกรรมเกษตร
อัลจิเนต	กรดกลูคิวโรนิก กรดแมนนูโรนิก	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Azotobacter</i> spp.	เป็นพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำมีสมบัติก่อเจลได้มีสมบัติเกิดฟิล์มได้	อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา เช่น แผ่นปิดแผล สมานแผล

เซลล์ูโลส	กลูโคส	<i>Alphaproteobacter</i> <i>Betaproteobacteria</i> <i>Gammaproteobacteria</i> Gram-positive bacteria <i>Acetobacter</i> spp.	มีโครงสร้างเป็น ผลึกมีความแข็งแรง สูง และไม่ละลาย ในตัวทำละลาย ส่วนใหญ่	อุตสาหกรรม อาหาร (เส้นใยอาหาร) วัสดุทางการแพทย์ เช่น แผ่นสมาน แผล หลอดเลือด เทียม
เคอร์ดีแลน	กลูโคส	<i>Agrobacterium</i> spp. <i>Rhizobium</i> spp. <i>Cellulomonas</i> spp.	มีสมบัติก่อเจลได้ ไม่ละลายน้ำ มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	อุตสาหกรรม อาหาร อุตสาหกรรมทาง เภสัช ใช้การกำจัดโลหะ หนัก
เจลแลน	กลูโคส แรมโนส กรดกลูคิวโรนิก- อะซิเตต	<i>Sphingomonas</i> spp.	เป็นพอลิเมอร์ที่ ชอบน้ำ มีความ เสถียรในช่วงพีเอช ที่กว้าง มีสมบัติก่อ เจลได้	อุตสาหกรรม อาหารและยา อุตสาหกรรม อาหารสัตว์

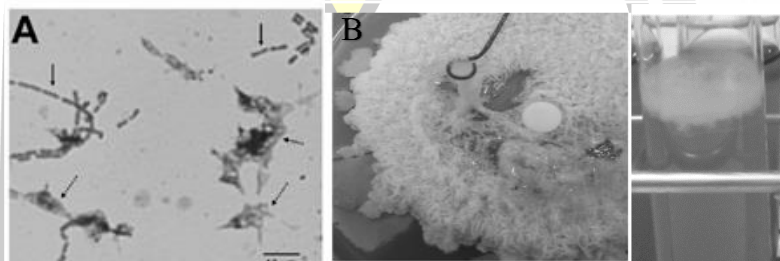
ที่มา: (Torres et al., 2014)

2.4 *Bacillus tequilensis* และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

บาซิลลัส (แท่ง) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง อยู่ในไฟลัม Firmicutes สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลล่า ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic) และเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจน (facultative) บาซิลลัสเป็นแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (thermoduric bacteria) ที่สร้างเอนโดสปอร์ (spore forming bacteria) โดยสปอร์แบคทีเรียของบาซิลลัสจะทนต่อความร้อน ทนต่อแสง สารเคมี และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ ได้ดี ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จึงทำให้บาซิลลัสเป็นโปรไบโอติกที่ให้แหล่งคาร์บอนในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ (Rani et al., 2016) โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่า *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถผลิตแอลฟา-อะไมเลส ได้ในปริมาณที่เพียงพอ (Singh et al., 2011)

การย่อยแบ่งจากเชื้อ *Bacillus tequilensis* (EGB3) ที่แยกได้จากลำไส้ของไส้เดือนดิน มีความสามารถในการย่อยสลายแบ่งทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ

จากการศึกษาของ (Luang-in & Deeseenthum (2016) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แยกได้จากจากคิเฟอร์นม ประเทศไทย พบว่า เชื้อที่แยกได้มีทั้งหมด 85 ไอโซเลท ซึ่งในการคัดแยกครั้งนี้มี *B. tequilensis* PS21 ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ภาพที่ 7)



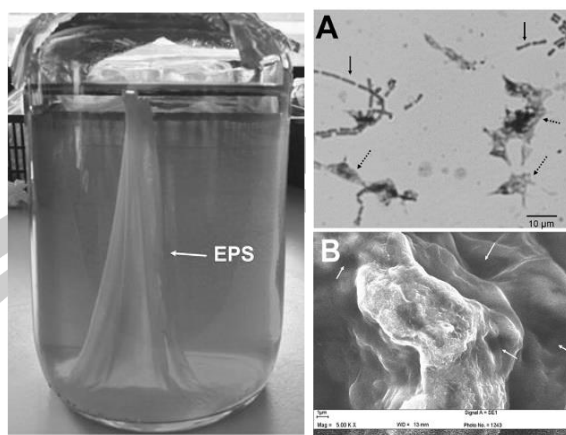
ภาพที่ 7 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. tequilensis*

(A: ลักษณะของแบคทีเรีย และ B: การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรีย)

ที่มา: (Luang-in & Deeseenthum, 2016)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ Luang-in et al (2018) พบว่า *B. tequilensis* PS21 ที่แยกได้จากนมคิเฟอร์ไทยสามารถสร้างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้จากน้ำตาลแลคโตส (ภาพที่ 8) แต่มีข้อจำกัดของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยแบคทีเรียสำหรับการใช้งานในภาคอุตสาหกรรมถึงแม้ว่าจะมีสายพันธุ์บางชนิดที่นำมาใช้ในการผลิตในภาคอุตสาหกรรม เช่น *Xanthomonas campestris*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Sphingomonas elodea* เป็นต้น เนื่องจากเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่มีความหลากหลาย ดังนั้นจึงเป็นแหล่งผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ มากมาย

พหุบัน ปณ จิต ชีเว



ภาพที่ 8 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดย *B. tequilensis*

(A: ลักษณะของแบคทีเรีย และ B: ลักษณะเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรีย)

ที่มา: (Luang-in et al., 2018)

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ngampuak et al (2018) ศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากถั่วหมักพื้นบ้านไทย พบว่า มี 14 สายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนีเหนียว และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเข้มข้น 2 % (W/V) พบว่า มีแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ LY4/9 LY4/15 LY7/16 และ LY8/3 ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูง (มากกว่า 20.00 กรัมต่อลิตร) จากผลการทดลองดังกล่าว พบว่า โพลีเมอร์ที่เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตได้เป็นสลิวานโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย น้ำตาลฟรุกโตสเพียงชนิดเดียว และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปตรวจสอบพบว่า สายพันธุ์ LY4/9 และ LY8/3 เป็น *B. tequilensis* ขณะที่ LY4/15 และ LY7/16 เป็น *Bacillus subtilis* โดยทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคและปลอดภัย สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้

จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Salama et al (2018) ศึกษาการผลิตสลิวานจาก *B. tequilensis* พบว่า การผลิตสลิวานจาก *B. tequilensis* สามารถผลิตได้ 130 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำสลิวานที่ไปศึกษาลักษณะทางเคมี ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นฟรุกโตส หลังจากนั้นสลิวานซูโครสที่ผลิตจาก *B. tequilens* ถูกตรึงโดยการจับกับโควาเลนต์บนเค-คาราจีแนนและเม็ดเจลเซลลูโลสเมธิลคาร์บอกซี ซึ่งทำการแช่เม็ดเจลสองขั้นตอน โดยเม็ดเจลถูกแช่ในพอลิเอทิลีนอิมินและแช่ด้วยกลูทารอลดีไฮด์ ซึ่งออกแบบการทดลองแบบเต็มรูป (full factorial) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสลิวานเครส

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Rani et al (2016) ศึกษาคุณสมบัติทางฟิสิกส์เคมีและทางชีวภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ชนิดใหม่ โดย *B. tequilensis* FR9 ที่แยกได้จากไก่ พบว่า การวิเคราะห์ด้วย HPLC มีโมโนแซคคาไรด์ด้วยกัน 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส อาราบิ

โนส และไซโลส วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วย FTIR พบ หมู่คาร์บอกซิล และไฮดรอกซิล การวิเคราะห์ด้วย NMR พบว่า มีแอลฟาและเบต้าดีกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์

การผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ประการ คือ ชนิดของจุลินทรีย์ และค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ ค่าพีเอช และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น

2.5.1 ชนิดของจุลินทรีย์

การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำมาผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ มีเกณฑ์คือ เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพในการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์สูงในระยะเวลาสั้น สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี เช่น ทนความร้อน ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดหรือด่าง ทนต่อสภาวะขาดแคลนอาหารได้ และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น แหล่งคาร์บอนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (น้ำตาลชนิดต่าง ๆ) และแหล่งคาร์บอนที่ไม่เป็นคาร์โบไฮเดรต (อะซิเตท ไพรูเวท ซัคซิเนต และฟอสเฟต) และให้ผลพลอยได้อื่นที่ไม่ต้องการในปริมาณต่ำ

2.5.2 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ของจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก โดยเป็นแหล่งพลังงาน และเป็นองค์ประกอบหลักของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรุคโตส กาแลกโทส แมนโนส ไซโลส และอะราบินอส น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น แล็กโทส มอลโทส และซูโครส น้ำตาลเชิงซ้อน เช่น แป้ง และแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล เป็นต้น และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล น้ำเสียจากอุตสาหกรรมน้ำตาล หางนม ของเสียจากน้ำมันและไขมัน ไฮโดรไลเซทหัวผักกาด เปลือกมันฝรั่ง น้ำมะพร้าว เป็นต้น (Pirog et al., 2016)

รายงานก่อนหน้านี้ของ Gilani et al (2011) พบว่า การผลิตแซนแทนกัม โดย *Xanthomonas campestris* PTCC 1473 ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากคาเลชชีสเวย์ (30 กรัมต่อลิตร) ส่งผลต่อการผลิตแซนแทนได้ 16.7 กรัมต่อลิตร

รายงานก่อนหน้านี้ของ (Nery et al., 2013) พบว่าเชื้อ *X. campestris* 1866 สามารถผลิตแซนแทนกัมได้ 10.3 กรัมต่อลิตร โดยใช้เปลือกโกโก้เป็นแหล่งคาร์บอน

2.5.3 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ของจุลินทรีย์ หากปริมาณของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งแหล่งไนโตรเจนสามารถแยกได้จากแหล่งที่มา 2 แหล่ง ได้แก่ แหล่งอินทรีย์ เช่น สารสกัดเนื้อ สารสกัดยีสต์ ทรีปโตน เปปโตน ไฮโดรไลเซทถั่วเหลือง และซอโยตัน แหล่งอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Moghannem et al (2018) โดยศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. velezensis* KY471306 ใช้กากน้ำตาลจากอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า การใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันและปริมาณที่แตกต่างกันส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Song et al (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. licheniformis* KS-17 ที่แยกได้จากกิมจิ พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 125 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 30 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ โดยไม่มีแหล่งฟอสเฟต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 8.5 เป็นเวลา 5 วัน ภายใต้การปรับสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 27.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยง 7 วัน ภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานผลิตได้ 12 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่า 2.3 เท่าและใช้เวลาสั้นกว่าการเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้หาสภาวะที่เหมาะสม

2.5.4 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในกระบวนการหมัก โดยอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Van den Berg et al (1995) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดย *Lactobacillus sake* 0-1 ทำการทดลองหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch culture fermentation) อัตราการผลิตสูงสุด 1.4 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่ไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พีเอช 5.8 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำลง โดยเลี้ยงที่ 10 องศาเซลเซียส พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นจาก 600 มิลลิกรัม จาก 20 องศาเซลเซียส เป็น 700 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และเมื่อแปรผันแหล่งน้ำตาลที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการกระบวนการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

2.5.5 ค่าพีเอชเริ่มต้น (pH)

ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องมีการควบคุมก่อนกระบวนการหมัก เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตโพลีแซคคาไรด์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลโดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์

มีรายงานก่อนหน้านี้ของ Ergene & Ayşe (2017) พบว่า ค่าพีเอชแตกต่างกันในการเลี้ยง *Bacillus* sp. ZBP4 ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากค่าพีเอชมีบทบาทต่อการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในระดับยีน ซึ่งค่าพีเอชมีผลต่อเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Valepyn et al (2012) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์และคุณสมบัติเบื้องต้นในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524 พบว่า อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ความเข้มข้นของเอทานอล ค่าพีเอช อุณหภูมิ และองค์ประกอบของอาหารที่ต่างกันมีผลต่อการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์และการเจริญของแบคทีเรีย *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524

ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จึงขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และพีเอช ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Cerning et al., 1994; Sutherland, 1999) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

จุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	ผลผลิต (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
<i>Lactobacillus confusus</i> TISTR 1498	Coconut water	35	5.5	12.2	(Seesuriyachan et al., 2011)
<i>Bacillus velezensis</i> KY471306	Sugarcan molasses	30	7	4.7-7.6	(Moghannem et al., 2018)

	Yeast extract				
<i>Bacillus</i> sp. ZBP4	Molasses Tryptone	45	5	1.07	(Ergene & Ayşe, 2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sugarcan Molasses Rice bran	37	-	4.86 2.14	(Razack & Thangavelu, 2013)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Wastewater	30	7	42.4	(Sellami et al., 2015)
<i>Paenibacillus jamilae</i>	Two-Phase Olive-Mill Waste	30	7	2	(Morillo et al., 2006)

กระบวนการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยแบคทีเรียในปริมาณมาก ๆ นั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงต้นทุนในการผลิตและคุณค่าต่อผลผลิต ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับกระบวนการผลิต เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิต และสามารถผลิตให้ได้ในปริมาณสูงและรวดเร็ว ดังนั้นปัจจัยที่ควรคำนึงถึง คือ แหล่งคาร์บอน และ แหล่งไนโตรเจน ที่แบคทีเรียสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ เนื่องจากกระบวนการผลิตแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีราคาสูง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่สามารถทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาสูง ผลพลอยได้หรือของเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับกระบวนการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มาก และเป็นปัญหาในการกำจัด

วัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ โดยต้องหาวิธีการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในด้านต่าง ๆ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อนำมาใช้ประโยชน์เป็นแหล่งอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ กากน้ำตาล กากน้ำตาลหัวผักกาด กากข้าวโพด ข้าวหัก เปลือกผลไม้ กากมันปะหลัง กากถั่วเหลือง รำข้าว หางนม ฟางข้าว และซังข้าวโพด ใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) ก่อนที่จะนำเข้าสู่กระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียเพื่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

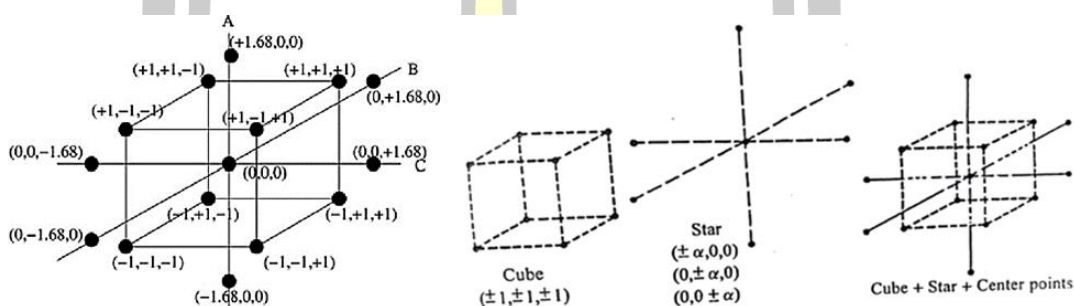
2.6 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ สารที่มีการใช้งานทางชีวภาพ หรือสารที่มีกิจกรรมทางชีวภาพ (Guaadaoui et al., 2014) สารที่ได้จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิต ได้แก่ คน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง มีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ มีฤทธิ์ต่อพืชและสัตว์ ซึ่งสารออกฤทธิ์นั้นจะต้องไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์ หรือมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด นอกจากนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยังเป็นองค์ประกอบของสารอาหารที่มีความพิเศษ (Extranutritional) ที่มีปริมาณน้อยในอาหาร ซึ่งมีการค้นพบว่าโครงสร้างทางเคมีและหน้าที่แตกต่างกัน (Kris-etherton et al., 2003) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในอาหารมีความสามารถในการปรับกระบวนการเผาผลาญและส่งผลในการส่งเสริมสุขภาพที่ดีขึ้น เช่น กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระการยับยั้งหรือการเหนี่ยวนำของเอนไซม์ การยับยั้งกิจกรรม การเหนี่ยวนำ และยับยั้งการแสดงออกของยีน (Galanakis, 2021)

2.7 การทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Designs; CCD)

การออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง (Central composite design; CCD) เป็นการออกแบบการทดลองโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ที่เป็นรูปแบบการทดลองที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา หรือสร้างตัวแบบในลักษณะของโพลิโนเมียลดีกรี 2 (Second-order or Quadratic Model) (ประไพศรี สุกตน์ ณ อยุธยา, 2551) และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรต่าง ๆ โดยเมื่อตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งเพิ่มหรือลดค่า ตัวแปรอื่นอาจเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรงทำให้ต้องมีการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (quadratic relationship) การออกแบบการทดลองแบบ CCD นี้สามารถแยกการทดลองออกเป็น ส่วน ๆ ตามลำดับคือ การทดลองส่วนของแฟกทอเรียล (Factorial Portion) และจุดศูนย์กลาง (Center Point) ก่อน จากนั้นจึงสร้างสมการตัวแบบเชิงเส้นตรง สำหรับกรณีศึกษาปัจจัย 2 ระดับ และพยากรณ์ส่วนของจุดศูนย์กลาง (Center Point) ถ้าสมการในรูปเส้นตรงไม่เหมาะสมจะทดลองเพิ่มในจุดแกน (Axial Portion) จะได้สมการโพลิโนเมียลดีกรี 2 หรือ Quadratic Model ข้อเสียของแผนการทดลองแบบ CCD คือเหมาะสำหรับกรณีศึกษา

ปัจจัยเชิงปริมาณ ดังนั้นในกรณีที่มีปัจจัยเชิงคุณภาพ (Qualitative Factor) จะต้องมีการปรับแผนการทดลอง โดยเฉพาะกรณีที่มีปัจจัยเชิงคุณภาพมากกว่า 1 ปัจจัย จำเป็นต้องใช้การทดลองแฟกทอเรียลบางส่วน หรือ การออกแบบ D-Optimal การทดลองแบบ CCD เป็นการทดลองที่ 3 ระดับ (นิยมแทนด้วยสัญลักษณ์ -1, 0, +1) กล่าวคือ ต้องศึกษาไปตัวแปรละ 3 ค่า (ภาพที่ 9) แต่แทนที่จะปรับตัวแปรแบบ Full Combination หรือ Full Factorial กลับเลือกบาง Runs หรือบางสถานะการทดลองที่จำเป็น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อการสร้างแบบจำลองทางสถิติ โดย Model ที่ได้จะยังคงมีทั้ง Main Effect, Interaction และ Quadratic Terms โดยใช้ทรัพยากรไม่มากจนเกินไป

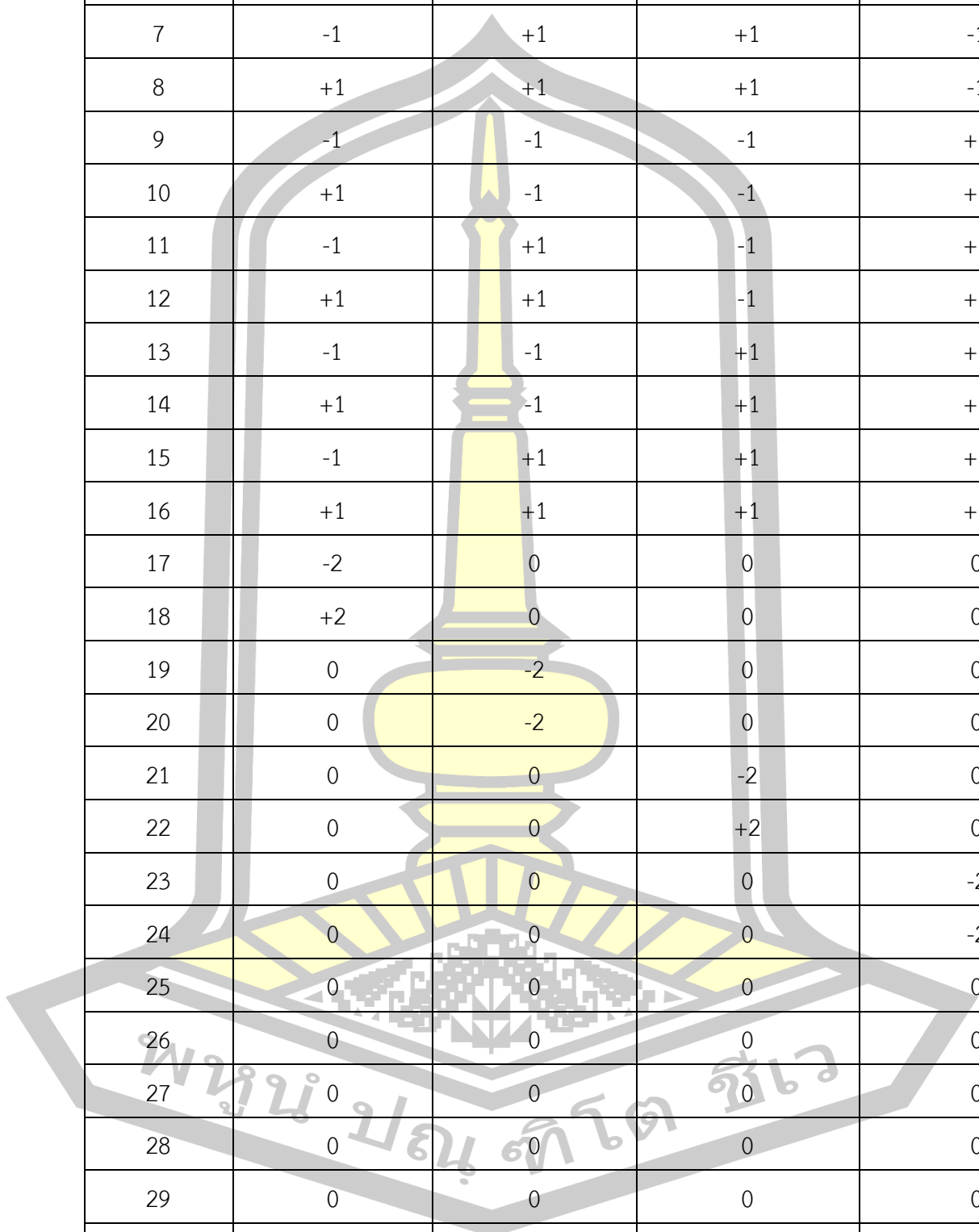


ภาพที่ 9 จุดของการออกแบบการทดลองแบบ CCD 3 ปัจจัย

ที่มา: Draper & Lin (1990)

ตารางที่ 4 แผนการทดลองประกอบศูนย์กลาง (Central Composite Design, CCD) ของตัวแปรอิสระ (Independent variables)

สิ่งทดลอง	ระดับความแปรปรวน			
	ปัจจัยที่ 1	ปัจจัยที่ 2	ปัจจัยที่ 3	ปัจจัยที่ 4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1



6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	-2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	-2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

ที่มา: (Song et al., 2007)

2.8 การวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

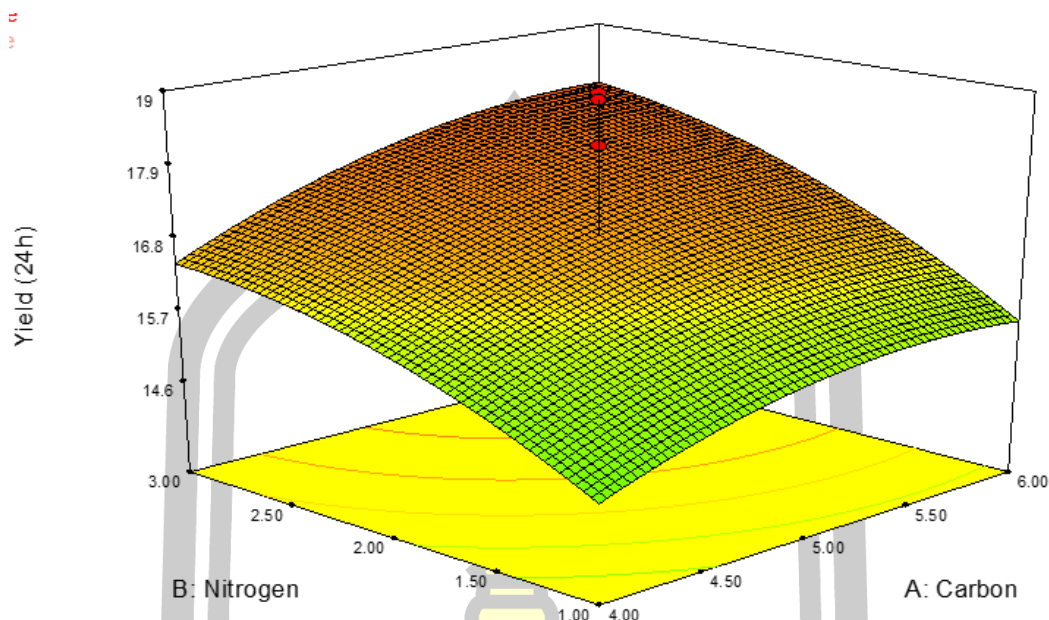
การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง ผิวตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว หรือผลตอบสนองต่อพื้นผิว (Response Surface Methodology: RSM) เป็นวิธีที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหาซึ่งแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่าง ๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดหรือความเหมาะสมต่อผลนั้น (Montgomery et al., 1991; Montgomery et al., 1991) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ Multiple regression analysis ซึ่งหากตัวแปรใดมีผลต่อค่าการตอบสนองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตัวแปรนั้นจะปรากฏอยู่ในสมการกำลังสอง (Second order model) ตัวอย่างดังสมการ

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \dots\dots\dots \text{สมการที่ 1}$$

กำหนดให้	Y	คือ	ค่าตอบสนอง
	b_0	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของโมเดลทดลอง
	b_i	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของ linear effect
	b_{ii}	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของ square effect
	b_{ij}	คือ	ค่าสัมประสิทธิ์ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร
	X_i, X_j	คือ	ตัวแปรอิสระ

เมื่อทำการประมวลผลทางสถิติจะได้กราฟโครงร่าง (contour plot) และกราฟพื้นผิวตอบสนอง (surface plot) เพื่อช่วยในการประมวลผลระหว่างปัจจัยร่วม (ภาพที่ 10) เป็นตัวอย่างของการแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรในรูปกราฟิกสามมิติ

พหุ ประสิทธิภาพ



ภาพที่ 10 การแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรในรูปกราฟิกสามมิติ

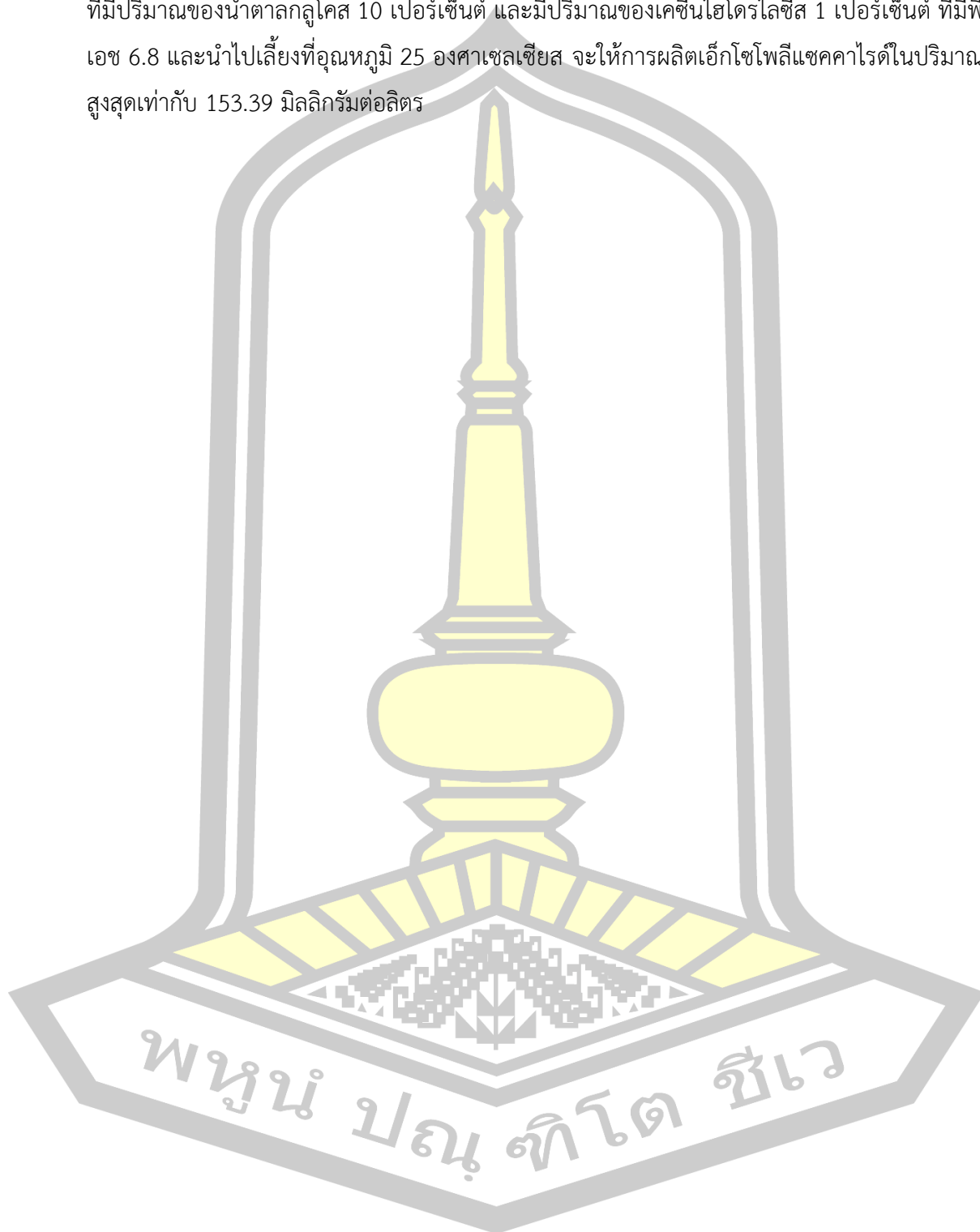
(ภาพจากโปรแกรม Design – Expert Version 7.00 โดยผู้วิจัย)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Seesuriyachan et al (2012) ใช้การออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง แบบ CCD ในการศึกษาผลของปริมาณของเกลือ ปริมาณของน้ำตาลซูโครส และระยะเวลาของการเลี้ยงต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *L. confusus* TISTR1498 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วย อาหารที่มีปริมาณของเกลือ 4.97 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณของน้ำตาลซูโครส 136.5 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 86.36 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 40.79 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ในรายงานก่อนหน้านี้ของ Moghannem et al (2018) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Bacillus velezensis* KY471306 โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองวางแผนการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบินเคน โดยศึกษาปัจจัยของสารอาหาร และสภาพแวดล้อม ประกอบด้วย กากน้ำตาล ยีสต์ สกัด และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. velezensis* KY471306 คือ ปริมาณกากน้ำตาลเท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณยีสต์สกัดเท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

มีรายงานก่อนหน้านี้ของ Prathima et al (2014) ได้ศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *L. lactis* NCDC 191 โดยการมีการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยมีปัจจัยการศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิของการเลี้ยง พีเอช ปริมาณของน้ำตาลกลูโคส และปริมาณของเค

ซีนไฮโดรไลซิส (Casein hydrolysate) พบว่า การเลี้ยง *L. lactis* NCDC 191 ในอาหาร DP whey ที่มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณของเคซีนไฮโดรไลซิส 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีพีเอช 6.8 และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะให้การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 153.39 มิลลิกรัมต่อลิตร



บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ คุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และพีเอช ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus tequilensis* PS21 เพื่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 5 ส่วน ดังต่อไปนี้

- 3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย
- 3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย
- 3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย
- 3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง
- 3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล
- 3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

พูน ปณ ภิโต ชีเว

3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

ตารางที่ 5 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

ลำดับที่	รายการ อาหาร และ สารเคมี	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
1	Tryptic Soy Broth (TSB)	Difco / BBL / BD / USA
2	Mineral Salt Medium (MSM)	Himedia / India
3	De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)	Himedia / India
4	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
5	โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
6	คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
7	ซีลีเนียม (Se)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
8	กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid; DNS)	Sigma-Aldrich; St. Louise, MO, USA
9	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
10	กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
11	กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	Fluka / USA
12	กรดซัลฟิวริก	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
13	เมทานอล (CH_3OH)	BDH (Poole, UK)
14	เอทานอล (C_2H_5OH)	BDH (Poole, UK)
16	2,4,6-ไตร(2-ไพริดีล)-1,3,5-ไตรอะซีน (TPTZ)	Fluka Chemical Co.
17	กรดไตรคลอโรอะเซติก	Sigma-Aldrich; St. Louise, MO, USA

ตารางที่ 5 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย (ต่อ)

ลำดับที่	รายการ อาหาร และ สารเคมี	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
18	2,2-ไดฟีนิล-1-พิกิลไฮดราซิลไฮเดรต (DPPH)	Fluka Chemical Co.
19	โทร็อกซ์ (Trolox)	Fluka Chemical Co.
20	เฟอร์รัส ซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem Pty Ltd,
21	เฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	BDH (Poole, UK)
22	โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
23	ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	BDH Prolabo, UK
24	กรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8$)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
25	โซเดียมอะซิเตรต ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
26	โพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand
26	โบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA)	
27	กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA)	Sigma-Aldrich; St. Louise, MO, USA
28	น้ำตาลกลูโคส	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
29	โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem Pty Ltd, Australia and New Zealand

พหุบัน ปณ จิต ชีเว

ตารางที่ 5 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย (ต่อ)

ลำดับที่	รายการวัสดุและเครื่องมือ	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
1	ขวดเก็บตัวอย่าง (Duran Bottle)	Duran made / Germany
2	หลอดทดลอง (Tube)	Pyrex / USA
3	บีกเกอร์ (Beaker)	Pyrex / USA
4	ไมโครปิเปต (Micropipette)	Finnpipette F1 / Thermo scientific / Finland
5	ทิป (Tip)	Finn / Thermo scientific / Finland
6	เข็มฉีดยา (Needle)	Finn / Thermo scientific / Finland
7	ลูป (Loop)	Finn / Thermo scientific / Finland
8	จานเพาะเลี้ยง (Petri Plates)	Finn / Thermo scientific / Finland
9	ฟลาสก์ (Flask)	Pyrex / USA
10	หลอดไมโครเซ็นติฟิว (eppendorf)	Finn / Thermo scientific / Finland
11	Vivaspin 10 kDa MWCO membrane ultrafiltration	Sartorius; Göttingen, Germany
12	ตู้เก็บตัวอย่าง (-20 องศาเซลเซียส)	Panasonic / Thailand
13	เพลต 96 หลุม (96 well plate)	Cole-parmer / USA
14	เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Mettler Toledo FiveEASY™Plus / FEP20
15	ตู้เป่าเชื้อ (Laminar air flow)	ยูเนี่ยน ซายน์ เทคโนโลยี จำกัด
16	เครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclaves)	เวลด์ไวต์ เทค ไทย จำกัด
17	ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Binder / Germany
18	เครื่องบ่มเขย่า (Shaking Incubators)	LSI-1005R / LabTech / Korea
19	เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)	Buchi R-114 / Switzerland
20	เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Universal 320R / Germany
21	เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	Products from Scientific Industries / USA
22	เครื่องอ่านค่าไมโครเพลท (Microplate reader)	M965 / mastertech/ Taiwan

ตารางที่ 5 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย (ต่อ)

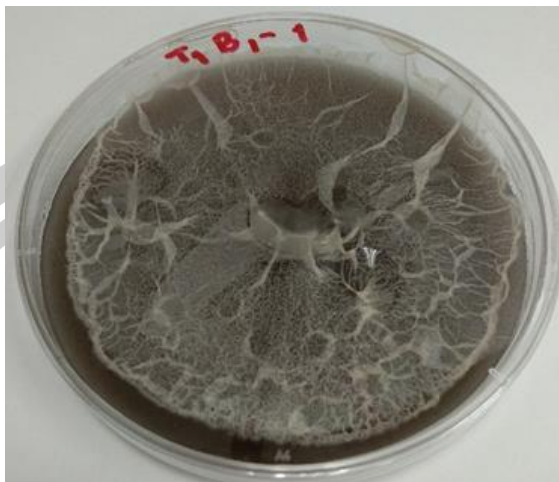
ลำดับที่	รายการวัสดุและเครื่องมือ	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
23	เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drier)	Heto PowerDry PL3000 / Czech Republic
24	ตู้นมเพาะเชื้อภายใต้แก๊สคาร์บอน (CO ₂ Incubator)	Binder / Germany
25	เครื่องชั่งแบบละเอียด	Presica 25A / Switzerland
26	Spectrum GX Fourier transform infrared (FTIR) microscope	PerkinElmer Inc.; Waltham, MA, USA
27	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	Leo/1450 Carl Zeiss; Göttingen, Germany
28	เครื่อง HPLC	(LC-20 AD, RID-10A refractive index detector, Shimadzu; Tokyo, Japan) พร้อมกับติดตั้ง Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 แบคทีเรีย *B. tequilensis* PS21

แบคทีเรีย *B. tequilensis* PS21 ที่แยกได้จากคีเฟอร์นม ประเทศไทย โดยการเก็บรักษาแบคทีเรีย *B. tequilensis* PS21 ที่ใช้ในการทดลองจะเก็บในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ที่มีกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ที่ตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส) สำหรับการเตรียมแบคทีเรียเพื่อใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะนำแบคทีเรียจากตู้แช่แข็ง (อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส) มาทำการเพาะเลี้ยงเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นโดยนำเชื้อมาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ผลการทดลองเบื้องต้น พบว่า *B. tequilensis* PS21 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (ตารางที่ 6; ภาพที่ 11) แต่อย่างไรยังส่งผลให้ผลผลิตที่ต่ำ ดังนั้นจึงดำเนินการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ให้ผลผลิตมากกว่านี้ จึงได้ดำเนินการวิจัยในครั้งนี้



ภาพที่ 11 ลักษณะของเชื้อ *B. tequilensis* PS21 บนอาหารแข็งที่มีการเติมผงข้าวไรซ์เบอร์รี่

ตารางที่ 6 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ *B. tequilensis* PS21 ที่แยกได้จากคิเฟอร์นม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง

Sample	Antioxidant activities			EPS (g/L)
	DPPH	ABTS	FRAP	
	($\mu\text{g AEAC /g DW}$)	($\mu\text{g AEAC /g DW}$)	($\text{mg FeSO}_4 / \text{g DW}$)	
RBR 2.5%	135.34 $\pm$ 3.30 ^B	238.81 $\pm$ 1.19 ^B	3.31 $\pm$ 0.33 ^B	1.30
RBR 5%	137.61 $\pm$ 2.51 ^A	237.78 $\pm$ 3.31 ^C	3.05 $\pm$ 0.90 ^C	2.28
RBR 10%	126.06 $\pm$ 5.06 ^C	245.16 $\pm$ 0.72 ^A	6.65 $\pm$ 0.51 ^A	2.70

อักษร A, B, C... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA in CRD) หรือ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

หมายเหตุ RBR คือ ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่

3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยปัจจัยทั้งหมด 2 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ซึ่งปัจจัยแรก คือ แหล่งคาร์บอนจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่แปรผันปริมาณ 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สองคือ แหล่งไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองที่แปรผันปริมาณเป็น 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาปัจจัยเหล่านี้ที่ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์นำไปสู่การหาสถานะที่เหมาะสม โดยออกแบบและวางแผนการทดลองประสมกลาง (central composite design; CCD) กำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -2, -1, 0, +1 และ +2 โดยปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และพีเอช ซึ่งปัจจัยแรก คือ แหล่งคาร์บอนจากข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่แปรผันปริมาณเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สอง คือ แหล่งไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองซึ่งแปรผันปริมาณเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สาม คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แปรผันออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส และปัจจัยที่สี่ คือ ค่าพีเอชในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แปรผันออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 4 5 6 7 และ 8 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำมาสร้างสมการการจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วย Polynomial regression analysis และประเมินหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) โดยใช้โปรแกรม Design – Expert Version 7.00

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร

การปรับสภาพข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ได้จากเครือข่ายองค์กรชุมชน เครือข่ายอีสาน (E-san Enterprise Agrarian Network) จังหวัดร้อยเอ็ด โดยใช้เครื่องบดข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ให้ละเอียดเป็นผง จากนั้นนำผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ได้จากการบดละเอียดมากรองด้วยตะแกรงร่อนสแตนเลส ขนาด 200 เมช เก็บไว้เพื่อนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยง *B. tequilensis* PS21 และนำมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณโปรตีน และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปรับสภาพกากถั่วเหลืองด้วยวิธีการทางกายภาพ โดยกากถั่วเหลืองที่ได้จากร้านขายอาหารสัตว์ อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งใช้เครื่องบดกากถั่วเหลืองให้ละเอียดเป็นผง จากนั้นนำผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ได้

จากการบดละเอียดมากรองด้วยตะแกรงร่อนสแตนเลส ขนาด 200 เมส เก็บไว้ในที่แห้งเพื่อนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยง *B. tequilensis* PS21

3.4.2 การเพาะเลี้ยง

นำแบคทีเรีย *Bacillus tequilensis* PS21 ที่แยกได้จากคีเฟอร์นม มาเพาะเลี้ยงเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้เชื้อสต็อกแช่แข็ง (-50 องศาเซลเซียส) ต่อเชื้อลงในอาหารเหลว TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร จนได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ก่อนที่จะถ่ายลงหัวเชื้อเริ่มต้น 3 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลือง ที่มีค่าพีเอช 7 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง

3.4.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21

ศึกษาผลกระทบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน คือ ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่แปรผันปริมาณเป็น 4 5 และ 6 เพอร์เซ็นต์ และมีการแปรผันกากถั่วเหลืองเป็น 1 2 และ 3 เพอร์เซ็นต์ นำข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ผสมกับกากถั่วเหลือง ทั้งหมด 9 ทริทเมนต์ จากนั้นผสมกับน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้พีเอช 7 นำไปนิ่งมาเชื้อ 15 นาที ที่ 110 องศาเซลเซียส ถ่ายนำหัวเชื้อแบคทีเรียที่มีการเลี้ยงข้ามคืน 3 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อข้าวหักและกากถั่วเหลือง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.4.3.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อ ค่าพีเอช และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ระหว่างกระบวนการหมัก เก็บตัวอย่างระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แบคทีเรีย การหาอัตราการเจริญของเชื้อด้วยการ spread plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รายงานผลการเจริญในหน่วย (Log CFU/mL) นอกจากนี้ยังมีการวัดค่าพีเอชของเชื้อแบคทีเรีย

3.4.3.2 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ระหว่างกระบวนการหมัก

นำแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมเอทานอลเย็นในปริมาตรสองเท่า (RCI Labscan Ltd.; Bangkok, Thailand) ลงในส่วนใส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่า หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะได้ตะกอน

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ นำไปล้างด้วยเอทานอล 2 ครั้ง นำไปชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยให้น้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 12 การตกตะกอนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเอทานอล

3.4.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM)

ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยออกแบบและวางแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD) ปัจจัยที่ศึกษาหรือตัวแปรอิสระ (Independent variable) ที่สนใจทั้งหมด 4 ปัจจัย ($k=4$) ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (X_1) แหล่งไนโตรเจน (X_2) อุณหภูมิ (X_3) และพีเอช (X_4) ซึ่งปัจจัยแรก คือ แหล่งคาร์บอนจากผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่แปรผันปริมาณเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สอง คือ แหล่งไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองซึ่งแปรผันปริมาณเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สาม คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แปรผันออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส และปัจจัยที่สี่ คือ ค่าพีเอชในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แปรผันออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 4 5 6 7 และ 8 ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง การสร้างสิ่งทดลองตามแผนและออกแบบการทดลองแบบประสมกลาง ใช้โปรแกรม Design – Expert Version 7 ได้สิ่งทดลองทั้งหมด 26 สิ่งทดลอง โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยจาก 30 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 7) ซึ่งประกอบด้วยจุดที่อยู่บนแกน Coordinate (Axial point) 4 จุด จุดที่อยู่บนแกนหลัก 4 จุด (Vertices) และจุดศูนย์กลาง (Center point) 5 จุด แต่ละจุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อเปรียบเทียบการแปรผันของข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาสร้างสมการการจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วย Polynomial regression analysis และประเมินหา

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM)
โดยใช้โปรแกรม Design – Expert Version 7.00

ตารางที่ 7 สิ่งทดลองตามแผนการทดลองแบบ CCD โดยมีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ
และพีเอช เป็นปัจจัยที่ศึกษา

สิ่งทดลอง	ระดับความแปรปรวน			
	X ₁ ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (%)	X ₂ ผงกากถั่วเหลือง (%)	X ₃ ค่าพีเอช	X ₄ อุณหภูมิ (°C)
1	1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1	-1
3	0	2	0	0
4	-2	0	0	0
5	-1	-1	-1	-1
6	1	-1	1	-1
7	0	0	0	0
8	-1	1	-1	-1
9	1	1	1	1
10	1	1	-1	1
11	-1	-1	1	1
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	-2	0	0
15	0	0	0	0
16	0	0	-2	0
17	0	0	2	0

18	1	-1	1	1
19	-1	-1	-1	1
20	1	-1	-1	1
21	-1	1	1	-1
22	1	1	1	-1
23	1	1	1	-2
24	0	0	-1	-2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0

3.4.6 การสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์หยาบและการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต้น

นำแบคทีเรียไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมเอทานอลเย็นในปริมาตรสองเท่า (RCI Labscan Ltd; Bangkok, Thailand) ลงในส่วนใส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่า หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะได้ตะกอนเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากนั้นนำไปล้างด้วยเอทานอล 2 ครั้ง นำไปชั่งน้ำหนักสด และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยให้น้ำหนักคงที่ เพื่อหาน้ำหนักเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ จากนั้นนำเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้ง (100 มิลลิกรัม) นำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร และเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก 20 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (Sigma-Aldrich; St. Louise, MO, USA) เพื่อกำจัดโปรตีนที่มีการปนเปื้อน ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้ Vivaspin 10 kDa MWCO membrane ultrafiltration (Sartorius; Göttingen, Germany) และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จะได้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้ง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักและเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

3.4.7 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

3.4.7.1 การศึกษาหองค์ประกอบทางเคมีในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ดำเนินการตามวิธีของ Luang-in et al (2018) โดยใช้วิธี Lowry ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้ง 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำปราศจากไอออน) โดยใช้โบวีนซีรัมอัลบูมินเป็นสารมาตรฐาน (Bovine Serum Albumin; BSA)

ปริมาณกรดนิวคลีอิกของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ จะถูกวัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (A260 และ A280) และวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตตามวิธีการดubin-ซัลฟิวริก โดยใช้เครื่อง M965 microplate reader (Metertech; Taipei, Taiwan) (Dubois et al., 1956)

3.4.7.2 การศึกษาหาองค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วย

High Performance Liquid Chromatography

เพื่อตรวจสอบหาองค์ประกอบของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยชั่งเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้ง 100 มิลลิกรัม ผสมกับกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Tri Fluoro Acetic; TFA) 2 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปย่อยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ส่วนที่ผ่านการย่อยจะถูกทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 นอร์มอล และกรองผ่านเยื่อกรอง 0.22 ไมโครเมตร ไฮโรไลซิสจากตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (LC-20 AD, RID-10A refractive index detector, Shimadzu; Tokyo, Japan) พร้อมกับติดตั้ง Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) คอลัมน์วิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตที่ 63 องศาเซลเซียส ตามที่รายงานก่อนหน้านี้ (Luang-in et al., 2018; Ran et al., 2014) เฟสเคลื่อนที่ใช้กรดซัลฟิวริก 0.005 โมลาร์ ที่อัตราไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 40 นาทีต่อตัวอย่าง ชนิดของน้ำตาลในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ถูกจำแนกโดยใช้น้ำตาลมาตรฐาน โมโนแซคคาไรด์ที่ซื้อมาจาก Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ปริมาณน้ำตาลสามารถหาได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาล

3.4.7.3 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม

อินฟราเรด

ดำเนินการตามวิธีของ Luang-in et al (2018) ทำการหาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ Spectrum GX Fourier transform infrared (FTIR) microscope (PerkinElmer Inc.; Waltham, MA, USA) ที่คณะศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย โดยบดตัวอย่างเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้ง (1 มิลลิกรัม) แล้วสแกน โดย FTIR จาก 400 ถึง 4000 cm^{-1}

3.4.7.4 การศึกษาลักษณะของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยการสแกนด้วยกล้อง

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ดำเนินการตามวิธีของ Luang-in et al (2018) ใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยใช้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้ง (2 มิลลิกรัม) เคลือบด้วยทองคำหนา 30 นาโนเมตร ก่อนนำไป

ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Leo/1450 Carl Zeiss; Göttingen, Germany) ที่แรงดันไฟฟ้าเร่ง 5 กิโลวัตต์ ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.4.6 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

3.4.6.1 วิธี DPPH

ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang et al (2016) ปีเปตสาร 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายเมทานอล 100 มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นปีเปตตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate เติมสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร บ่มสารผสมที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader spectrophotometer โดยค่าที่ได้จะถูกคำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงในหน่วยของมิลลิกรัม Trolox ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (mg Trolox/g DW) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.6.2 วิธี FRAP

ดัดแปลงจากวิธีการของ Wei et al (2011) เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent โดยผสม acetate buffer (pH 3.6) 300 มิลลิโมลาร์ กับสารละลาย 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ Ferric chloride solution 20 มิลลิโมลาร์ ให้เข้ากัน เก็บโดยปราศจากแสง และเตรียมสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นปีเปตตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate ผสมกับ FRAP reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร microplate reader spectrophotometer คำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ในหน่วย หน่วยมิลลิกรัม Fe(II) ต่อกรัม น้ำหนักแห้ง (mg Fe(II)/g DW) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสาร FeSO_4 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.7 ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง

3.4.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa ATCC® CCL-2 (human cervical carcinoma) เซลล์มะเร็งตับ HepG2 ATCC® HB-8 0 6 5™ (human hepatocellular carcinoma) เซลล์มะเร็งปอด A549 ATCC® CCL-185™ (human non-small lung adenocarcinoma A549) และเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 ATCC® HTB-38™ (human colon adenocarcinoma) ได้มาจาก American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA) เซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดถูกเพาะเลี้ยงอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

ที่ผสม ด้วย Fetal bovine serum ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ L-glucose 4500 มิลลิกรัมต่อลิตร L-glutamine 4 มิลลิโมลาร์ penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในฟาล์กเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วันจนกว่าเซลล์จะได้ 80 เปอร์เซ็นต์ confluency จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) พีเอช 7.4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร 1 ครั้ง ชะเซลล์ให้หลุดจากฟาล์กด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin-EDTA) ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตรวจนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) โดยใช้ Hemocytometer และทำการย้อมสีเซลล์ด้วยทริปแทนบลู (Trypan blue) เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งปากมดลูก เซลล์มะเร็งตับ เซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งลำไส้ ถูกนำมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) หลักการคือการตรวจการทำงานของเอนไซม์ สาร MTT จะเข้าไปในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตและจะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียให้อยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (Formazan) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สีม่วงอยู่ภายในเซลล์ที่มีชีวิต แล้วทำการละลายผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน ด้วยสารละลายไดเมทิลซัลโฟลิกไซด์ และวัดค่าการดูดกลืนแสง ใช้ความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับฟอร์มาซาน การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT ถูกทำการทดลองใน ไมโครเพลต 96 หลุม ซึ่งทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ปิเปิดเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa เซลล์มะเร็งตับ HepG2 เซลล์มะเร็งปอด A549 และเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 7.5×10^3 เซลล์ต่อหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ (ชุดควบคุมลบ) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เติมน้ำสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงไปในทุกหลุม บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นทำการแทนที่สารสกัดที่มีสารละลาย MTT ด้วยไดเมทิลซัลโฟลิกไซด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิเปิดขึ้นลงเพื่อทำการละลายผลิตภัณฑ์ของ

ฟอร์มาซานให้อยู่ในรูปสารละลายสีม่วง นำไปวัดระดับการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านค่าไมโครเพลท ทำการลบค่าสัญญาณของ Blank ก่อนที่จะคำนวณหาค่าความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเป็นค่า Emax (maximum cytotoxicity (%))

$$\text{Emax} = \frac{(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) \times 100}{A_{\text{Control}}}$$

3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

ขั้นตอนในการเก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือน พฤษภาคม 2562 ถึง เดือน พฤษภาคม 2564 โดยมีขั้นตอนในการดำเนินการ ดังนี้

1. เตรียมวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และกากถั่วเหลือง โดยนำข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และกากถั่วเหลืองมาบดให้ละเอียด และกรองด้วยตะแกรงร่อนสแตนเลส ขนาด 200 เมส เก็บไว้ในที่แห้งเพื่อนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

2. ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ โดยการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ โดยใช้ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้น แปรผันระดับของสารตั้งต้นเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บข้อมูลตามแผนการทดลองแบบ CRD จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบสมมติฐานโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว

3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์นำไปสู่การหาสภาวะที่เหมาะสม โดยออกแบบและวางแผนการทดลองแบบประสมกลางกำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -2, -1, 0, +1 และ +2 โดยปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และพีเอช ซึ่งปัจจัยแรก คือ แหล่งคาร์บอนจากผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ปัจจัยที่สอง คือ แหล่งไนโตรเจนจากกากถั่วเหลือง ปัจจัยที่สาม คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และปัจจัยที่สี่ คือ ค่าพีเอชในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างสมการการจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วย Polynomial regression analysis และประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง

4. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ ทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางชีวเคมีในเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ ศึกษาหาองค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วย

HPLC ศึกษาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด และศึกษา ลักษณะของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยการสแกนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

5. การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดยศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP เก็บข้อมูลตามแผนการทดลองแบบ CRD จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบสมมติฐานโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว

6. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง ด้วยเทคนิค MTT 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) เก็บข้อมูลตามแผนการทดลองแบบ CRD จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทดสอบสมมติฐานโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

1. สถิติพื้นฐาน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. การวิเคราะห์หาข้อมูลเพื่อทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 20 สถิติที่ใช้ คือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA in CRD) หรือ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)
3. วิเคราะห์หาข้อมูลเพื่อทดสอบสมมติฐาน สร้างสมการการจำลองทางคณิตศาสตร์ด้วย Polynomial regression analysis และประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) โดยใช้โปรแกรม Design – Expert Version 7.00

พหุบัน ปณ จิต ชีเว

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาอัตราการเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21

การศึกษากาการเจริญ และการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *B. tequilensis* PS21 ซึ่งนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และผงกากถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้นในการผลิต ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ประกอบด้วย ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และผงกากถั่วเหลือง มีการแปรผัน 3 ระดับ คือ ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ ต่อนาที พีเอช 7 เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 และภาพที่ 12

ตารางที่ 8 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดย *B. tequilensis* PS21 ที่แยกได้จากคีเฟอร์นม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง

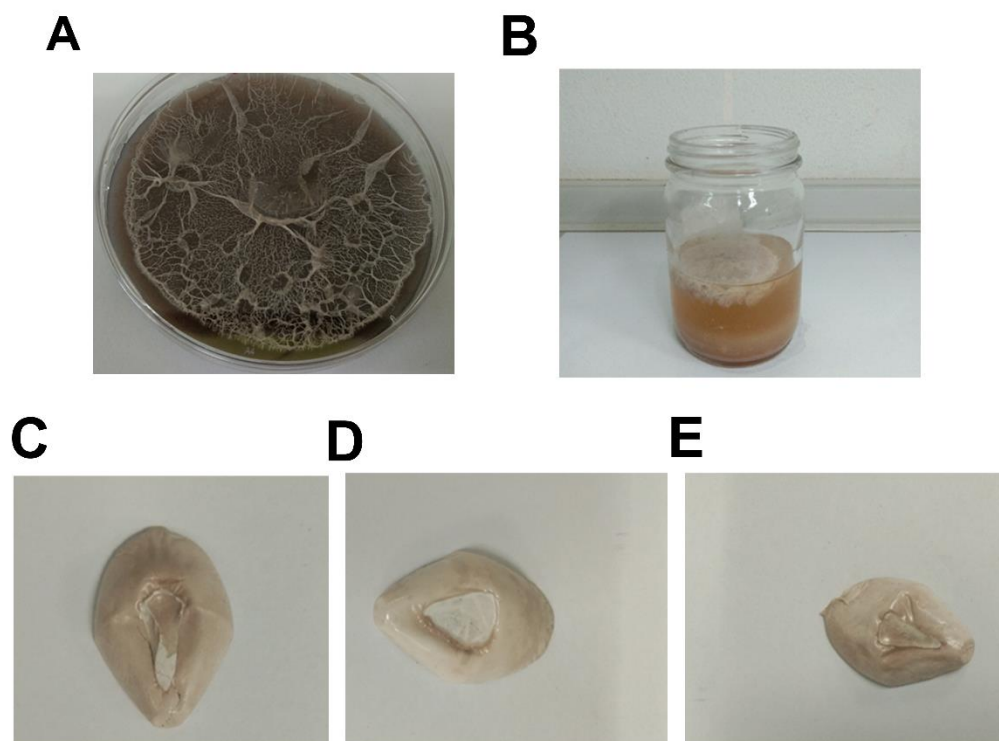
Treatment	EPS content (g/L)		
	Time of fermentation (h)		
	24	48	72
RBR 4% SBM 1%	4.63±0.04 ^{C,f}	16.00 ± 0.07 ^{B,f}	21.70± 0.04 ^{A,e}
RBR 4% SBM 2%	7.96±0.01 ^{C,e}	20.83±0.04 ^{B,bc}	25.00± 0.00 ^{A,bc}
RBR 4% SBM 3%	9.63±0.09 ^{B,de}	26.43±0.08 ^{A,a}	27.47±0.05 ^{A,a}
RBR 5% SBM 1%	10.90±0.23 ^{C,de}	17.80±0.10 ^{B,e}	23.97±0.20 ^{A,cd}
RBR 5% SBM 2%	10.86±0.56 ^{B,d}	18.26±0.57 ^{AB,d}	25.67±0.23 ^{A,b}
RBR 5% SBM 3%	15.27 ±0.30 ^{B,b}	19.93±0.50 ^{B,cd}	28.47±0.07 ^{A,a}
RBR 6% SBM 1%	10.90 ±0.31 ^{C,d}	18.29±0.32 ^{B,e}	22.90±0.13 ^{A,e}

RBR 6% SBM 2%	13.37±0.17 ^{C,c}	19.90±0.17 ^{B,de}	25.39±0.26 ^{A,bc}
RBR 6% SBM 3%	19.07±0.1 ^{C,a}	21.43±0.10 ^{B,b}	28.07±0.03 ^{A,a}

อักษร A, B, C... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และอักษร a, b, c... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA in CRD) หรือ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

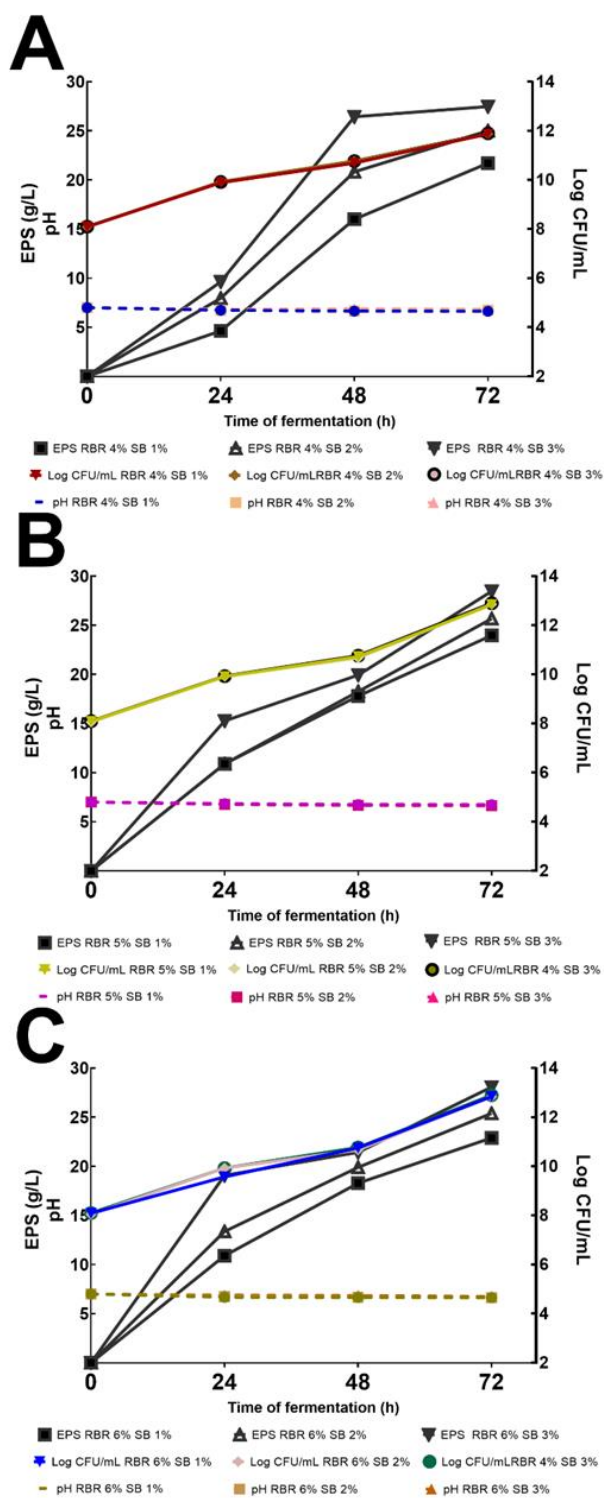
หมายเหตุ RBR คือผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ และ SBM คือกากถั่วเหลือง

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ *B. tequilensis* PS21 เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นไปพร้อมกับการเจริญของเซลล์ ในขณะที่ค่าพีเอชลดลงเรื่อย ๆ ตามระยะเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ความแตกต่างของปริมาณข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต (4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณของปริมาณกากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต (1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการเพาะเลี้ยงที่เวลา 72 ชั่วโมง จะเห็นว่าแหล่งน้ำตาลมีความจำเป็นต่อการเจริญ เช่นเดียวกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากให้พลังงานที่จำเป็นสำหรับทั้งสองกระบวนการ องค์ประกอบพื้นฐานของวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร เช่น ไนโตรเจน คาร์บอนและแร่ธาตุ อาจส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ผลการวิจัยของ Lee & Lucey (2004) และ Smiderle et al (2012) ศึกษาผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และชีวมวลจะเกี่ยวข้องกับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ต่างกัน พบว่า ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อาจขึ้นอยู่กับปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ประเภทวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรต่าง ๆ ที่ใช้องค์ประกอบทางอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต มีรายงานว่า การเจริญและการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะขึ้นอยู่กับประเภทของสารตั้งต้นและเชื้อจุลินทรีย์ (Park et al., 1992) และผลิตภัณฑ์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้ง (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 ผลิตรัณฑ์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แห้งของ *B. tequilensis* PS21 ที่เพาะเลี้ยงในผงข้าวหัก ไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลืองในปริมาณแตกต่างกัน (A: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 4 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์, B: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ และ C: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 6 เปอร์เซ็นต์ และผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์)





ภาพที่ 14 การเจริญของ *B. tequilensis* PS21 และค่าพีเอชในการหมัก 72 ชั่วโมง

(A: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 4 เปอร์เซ็นต์ B: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์
และ C: ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 6 เปอร์เซ็นต์)

จากภาพที่ 14 แสดงการเจริญของ *B. tequilensis* PS21 และค่าพีเอชในกระบวนการผลิต เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ 72 ชั่วโมง เมื่อเกิดการเผาผลาญภายในเซลล์จะทำให้เซลล์มีการเจริญ ซึ่งเป็นไปตามการสังเคราะห์ทางชีวภาพของชีวมวลและการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เป็นไปตามวิธีการเผาผลาญ แบคทีเรียมีการใช้สารตั้งต้นในการการเจริญและผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งส่งผลให้เกิดกรดในระหว่างกระบวนการหมักทำให้ค่าพีเอชลดลงเรื่อย ๆ เมื่อระยะเวลาในกระบวนการหมักเพิ่มขึ้น จากรายงานของ Pace (1981) พบว่า ค่าพีเอชมีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มากกว่า การเจริญ และ Lawson et al (1978) รายงานว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อยู่ในช่วง 6-7 นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนจะทำหน้าที่ในการเจริญซึ่งจะทำหน้าที่เป็น แหล่งพลังงานที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์และการขับเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ออกมานอกเซลล์ (Santi et al., 2008) ดังนั้นค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องควบคุมในระหว่าง กระบวนการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ในขณะที่แหล่งอาหารแตกต่างกันและปริมาณที่ต่างกันจะมีบทบาทต่อการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เช่นกัน

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ngampuak et al (2018) ศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากถั่วหมักพื้นบ้านไทย พบว่า มี 14 สายพันธุ์ที่มีลักษณะโคโลนี เหนียว และนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) พบว่า มี แบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ LY4/9 LY4/15 LY7/16 และ LY8/3 ที่สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูง (มากกว่า 20.00 กรัมต่อลิตร) จากผลการทดลองดังกล่าว พบว่า โพลีเมอร์ที่เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ผลิตสลิวนโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย น้ำตาลฟรุคโตสเพียงชนิดเดียว และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวไปตรวจสอบพบว่า สายพันธุ์ LY4/9 และ LY8/3 เป็น *B. tequilensis* ขณะที่ LY4/15 และ LY7/16 เป็น *Bacillus subtilis* โดยทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค และปลอดภัย สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้ ซึ่งยืนยันได้ว่า *B. tequilensis* ปลอดภัย ในการนำมาผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

มีรายงานก่อนหน้านี้ของ Salama et al (2018) พบว่า การผลิตสลิวนจาก *B. tequilensis* สามารถผลิตได้ 130 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่สูงกว่ารายวิจัย ฉบับนี้ จากนั้นนำสลิวนที่ไปศึกษาลักษณะทางเคมี ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นฟรุคโตส หลังจากนั้นสลิวนซูเครสที่ผลิตจาก *B. tequilensis* ถูกตรึงโดยการจับกับโควาเลนต์บนเค-คาราจีแนนและเม็ดเจล เซลลูโลสเมธิลคาร์บอกซี ซึ่งทำการแช่เม็ดเจลสองขั้นตอน โดยเม็ดเจลถูกแช่ในพอลิเอทิลีนอิมินและ แช่ด้วยกลูทารอลดีไฮด์ ซึ่งออกแบบการทดลองแบบเต็มรูป (full factorial) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ในการตรึงสลิวนเครส และรายงานก่อนหน้านี้ของ Ogidi et al (2020) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากของเหลือทิ้งจากกระบวนการทางเกษตรที่แตกต่างกัน พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคา

ไรต์จาก *P. pulmonarius* ใช้เปลือกถั่วลิสง 20 กรัมต่อลิตร ส่งผลต่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุดเท่ากับ 5.60 กรัมต่อลิตร

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดย *Bacillus* spp. (ตารางที่ 9) ใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกันสถานะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แตกต่างกัน จะเห็นว่าจากรายงานของ (Asgher et al., 2019) Moghannem et al (2018) พบว่า แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด คือ กากน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 4.2 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด คือ สารสกัดจากยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร สถานะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ใช้อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 7 และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะขึ้นอยู่กับการกระตุ้นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณมากหรือจำกัดปริมาณแหล่งคาร์บอนซึ่งจะส่งผลต่อการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (Vuyst & Degeest, 1999) จากรายงานก่อนหน้านี้ของของ Ergene & Ayse (2017) พบว่า การใช้กากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุด 426 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น และรายงานก่อนหน้านี้ของของ Razack & Thangavelu (2013) พบว่า กากน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 4.86 กรัมต่อลิตร และรำข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 2.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งสถานะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ใช้อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 48 ชั่วโมงในขณะที่รายงานวิจัยฉบับนี้ ใช้ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 28.47 กรัมต่อลิตร ซึ่งสถานะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 7 และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียของรายงานวิจัยฉบับนี้สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากกว่ารายงานก่อนหน้านี้ เมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ 9 พบว่า รายงานวิจัยฉบับนี้ใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่ต่ำกว่า สถานะและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่น้อยกว่าเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยในตารางที่น่าอ้างอิง สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากกว่า และเมื่อคิดต้นทุนการผลิตต่อผลผลิตพบว่ารายงานวิจัยฉบับนี้มีการคุ้มทุนมากกว่า จะเห็นว่าในตารางการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากรายงานฉบับอื่นมีการใช้สารตั้งต้นในการผลิต ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่มาก แต่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณที่น้อยกว่า อาจจะสืบเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกันจึงทำให้การผลิตที่แตกต่างกันออกไปหรือแม้แต่น้ำเลี้ยงเดียวกันแต่สารตั้งต้นแตกต่างกันก็สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แตกต่างกัน ดังนั้นการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แบคทีเรีย สารตั้งต้นและสถานะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อสังเคราะห์

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ตารางที่ 9 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ โดย *Bacillus* spp.

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	ปริมาณ EPS (กรัมต่อลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)	อ้างอิง
<i>Bacillus tequilensis</i> PS21	RBR 5% SB 3%	37	7	28.47	72	This study
<i>Bacillus velezensis</i> KY471306	Sugarcane molasses 12% Yeast extract 6 g/L	30	7	4.7-7.6	120	(Moghannem et al., 2018)
<i>Bacillus</i> sp. ZBP4	Molasses 40 g/L Tryptone 5 g/L	45	5	1.07	24	Ergene & Ayşe, 2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sugarcane Molasses 2% Rice bran 5%	37	-	4.86 2.14	48	(Razack & Thangavelu, 2013)
<i>Bacillus tequilensis</i> PS21	Lactose 80 g/L Tryptone 17 g/L	37	7	0.089	72	(Luang-in et al., 2018)

4.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 ด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM)

การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 ได้ถูกออกแบบและวางแผนการทดลองแบบประสมกลาง (central composite design; CCD) ซึ่งกำหนดค่าสูงสุดและต่ำสุดเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -2, -1, 0, +1 และ +2 โดยปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 4 ปัจจัย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และพีเอช ซึ่งปัจจัยแรกที่ศึกษา คือ แหล่งคาร์บอนจากผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ที่แปรผันปริมาณเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 4 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สอง คือ แหล่งไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองซึ่งแปรผันปริมาณเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่สาม คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแปรผันออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส และปัจจัยที่สี่ คือ ค่าพีเอชในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแปรผันออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 4 5 6 7 และ 8 ดังนั้นในการศึกษานี้จะประกอบไปด้วยสิ่งทดลองทั้งหมด 26 สิ่งทดลอง โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยจาก 30 สิ่งทดลอง ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 อยู่ในช่วง 13.40 – 38.70 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ผงกากถั่วเหลือง อุณหภูมิ และค่าพีเอช ต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ *B. tequilensis* PS21 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สิ่งทดลอง	ระดับความแปรปรวน				ค่าการตอบสนอง ปริมาณ EPS (กรัมต่อลิตร)
	X ₁ ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (%)	X ₂ ผงกากถั่วเหลือง (%)	X ₃ ค่าพีเอช	X ₄ อุณหภูมิ (°C)	
1	1	-1	-1	-1	21.30
2	-1	-1	1	-1	21.30
3	0	2	0	0	38.50
4	-2	0	0	0	34.20
5	-1	-1	-1	-1	20.00
6	1	-1	1	-1	19.80
7	0	0	0	0	38.70
8	-1	1	-1	-1	21.00

9	1	1	1	1	30.00
10	1	1	-1	1	27.80
11	-1	-1	1	1	25.00
12	0	0	0	0	36.40
13	0	0	0	0	37.10
14	0	-2	0	0	22.30
15	0	0	0	0	38.50
16	0	0	-2	0	13.40
17	0	0	2	0	21.2
18	1	-1	1	1	21.8
19	-1	-1	-1	1	24.80
20	1	-1	-1	1	21.60
21	-1	1	1	-1	25.00
22	1	1	1	-1	21.50
23	1	1	1	-2	21.10
24	0	0	-1	-2	19.30
25	0	0	0	0	38.70
26	0	0	0	0	37.50

จากตารางที่ 10 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่า การแปรผันของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และค่าพีเอชแตกต่างกัน ส่งผลให้ผล ปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น การผลิต เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะเพิ่มขึ้นไปพร้อมกับการเจริญของเซลล์ ในขณะที่ค่าพีเอชลดลงเรื่อย ๆ (ตารางที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบการแปรผันของข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาสร้างสมการการจำลองทาง คณิตศาสตร์ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยพหุนาม (Polynomial regression analysis) และการ ประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนองดัดแปลงรูปแบบสมการ ถดถอยของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่เหมาะสมแสดงดังสมการต่อไปนี้

$$EPS = +37.82 - 1.98 * A + 3.35 * B + 1.16 * C + 3.45 * D - 1.02 * A * B - 0.61 * A * C - 1.39 * A * D + 0.75 * B * C + 2.23 * B * D + 0.25 * C * D - 2.16 * A^2 - 1.99 * B^2 - 5.26 * C^2 - 3.18 * D^2$$

จากสมการสังเกตได้ว่าตัวแปร X_1 , X_2 , X_3 และ X_4 มีอิทธิพลทางบวก (มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก) ต่อค่าตอบสนอง (Y) กล่าวคือ หากเพิ่มค่าของตัวแปรอิสระดังกล่าว จะทำให้ค่าปริมาณการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จะมีค่าสูงขึ้นตามไปด้วย

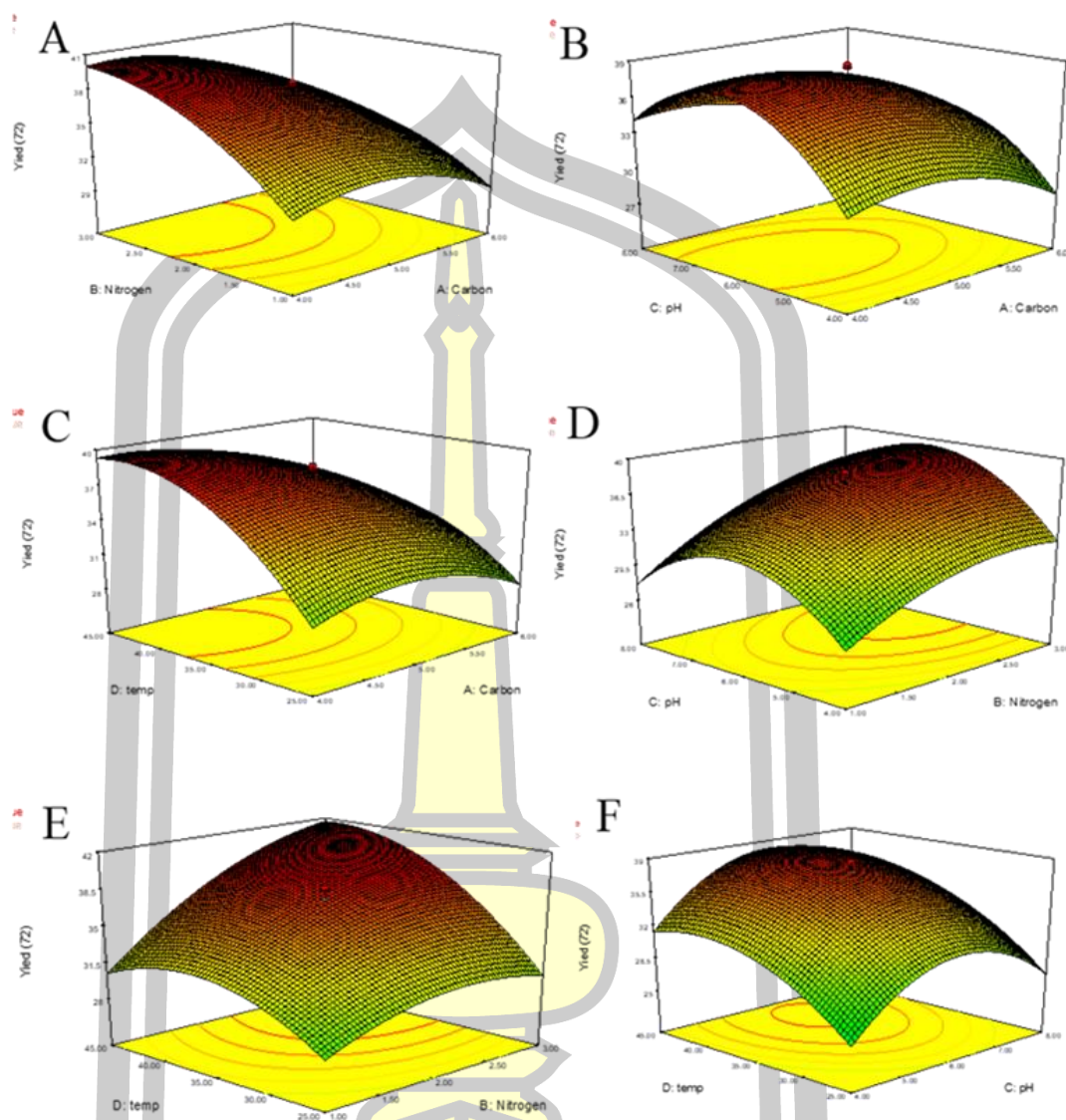
ตารางที่ 11 ผลของผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ ผงกากถั่วเหลือง อุณหภูมิ และค่าพีเอช ต่อการเจริญของ *B. tequilensis* PS21 ในการหมัก 72 ชั่วโมง

สิ่ง ทดลอง	ระดับความแปรปรวน				ค่าการตอบสนอง การเจริญ (Log CFU/mL)
	X_1 ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ (%)	X_2 ผงกากถั่วเหลือง (%)	X_3 ค่าพีเอช	X_4 อุณหภูมิ (°C)	
1	1	-1	-1	-1	10.82
2	-1	-1	1	-1	10.15
3	0	2	0	0	12.86
4	-2	0	0	0	12.84
5	-1	-1	-1	-1	10.35
6	1	-1	1	-1	9.73
7	0	0	0	0	12.86
8	-1	1	-1	-1	10.48
9	1	1	1	1	10.48
10	1	1	-1	1	10.21
11	-1	-1	1	1	12.00
12	0	0	0	0	12.86
13	0	0	0	0	12.86
14	0	-2	0	0	10.90
15	0	0	0	0	12.68
16	0	0	-2	0	9.52
17	0	0	2	0	10.42
18	1	-1	1	1	12.19

19	-1	-1	-1	1	10.42
20	1	-1	-1	1	10.75
21	-1	1	1	-1	10.75
22	1	1	1	-1	10.48
23	1	1	1	-2	10.35
24	0	0	-1	-2	9.85
25	0	0	0	0	12.86
26	0	0	0	0	12.86

เมื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์กับตัวแปรอิสระต่าง ๆ ได้แก่ ระหว่างข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลือง (A), ระหว่างข้าวหักไรซ์เบอร์รี่กับพีเอช (B) ระหว่างข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และอุณหภูมิ (C), ระหว่างกากถั่วกับพีเอช (D) ระหว่างกากถั่วเหลืองและอุณหภูมิ (E) และอุณหภูมิกับพีเอช (F) แสดงดังภาพที่ 16 พบว่า ปริมาณของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ กากถั่วเหลือง อุณหภูมิ และพีเอช เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยการเพิ่มปริมาณข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองส่งผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามการร่วมกันระหว่างปริมาณข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลือง การร่วมกันระหว่างปริมาณของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่กับพีเอช และการร่วมกันระหว่างปริมาณของกากถั่วกับพีเอช ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นจากผลการทดลองจึงสามารถทำนายระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์โดยเชื้อ *B. tequilensis* PS21 จากโปรแกรม Design Expert Version 7.00 (ภาพที่ 15) พบว่า ระดับที่เหมาะสมของการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ คือ ปริมาณผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 6 จะได้ปริมาณเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 38.7 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์ที่ได้ 12.8 Log CFU/mL

พูน ปณ สิโต ชีเว



ภาพที่ 15 ผลการตอบสนองระหว่างผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และผงกากถั่วเหลือง (A), ระหว่างผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่กับพีเอช (B) ระหว่างผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และอุณหภูมิ (C), ระหว่างผงกากถั่วเหลืองกับพีเอช (D) ระหว่างผงกากถั่วเหลืองและอุณหภูมิ (E) และอุณหภูมิกับพีเอช (F)

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) เป็นค่าที่บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 12 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจเท่ากับ 0.9793 หรือ 97 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลตอบสนอง (ตารางที่ 12) ตัวแปรอิสระที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีค่า p-value น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ได้แก่ ปริมาณของผง

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (X_1) พงกาทั่วเหลือง (X_2) อุณหภูมิ (X_3) พีเอช (X_4) การร่วมกันระหว่างปริมาณของข้าวไรซ์เบอร์รี่กับอุณหภูมิ และการร่วมกันระหว่างปริมาณของพงกาทั่วเหลืองกับอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังพบว่า สมการกำลังสอง (quadratic equations) เป็นสมการที่ใช้ศึกษาปัจจัยและการตอบสนองแบบพื้นผิวที่ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 ที่ 72 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1503.85	14	107.42	37.21	< 0.0001	significant
A-Carbon	43.09	1	43.09	14.93	0.0026	
B-Nitrogen	188.94	1	188.94	65.46	< 0.0001	
C-pH	28.16	1	28.16	9.75	0.0097	
D-temp	109.28	1	109.28	37.86	< 0.0001	
AB	10.09	1	10.09	3.5	0.0884	
AC	4.80	1	4.8	1.66	0.2236	
AD	18.89	1	18.89	6.55	0.0266	
BC	7.22	1	7.22	2.5	0.1421	
BD	48.45	1	48.45	16.78	0.0018	
CD	0.78	1	0.78	0.27	0.6131	
A ²	67.96	1	67.96	23.54	0.0005	
B ²	102.25	1	102.25	35.42	< 0.0001	
C ²	716.19	1	716.19	248.12	< 0.0001	
D ²	110.67	1	110.67	38.34	< 0.0001	
Residual	31.75	11	2.89			
Lack of Fit	27.10	6	4.52	4.86	0.0518	not significant
Pure Error	4.65	5	0.93			
Cor Total	1535.60	25				
Std. Dev.	1.70		R-Squared	0.9793		
Mean	26.84		Adj R-Squared	0.9530		

C.V. %	6.33	Pred R-Squared	0.7840
PRESS	331.65	Adeq Precision	18.1200

การสังเคราะห์เอ็กโพลีแซคคาไรด์จะเกิดขึ้นในสภาวะอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนสูงๆ และมีสารอาหารจำกัด เช่น แหล่งไนโตรเจน และออกซิเจน เป็นต้น (Reis & Freitas, 2018) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ เช่น ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ชนิดและปริมาณของแหล่งธาตุอาหารเสริม เป็นต้น จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Afzal (2014) พบว่า ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *Bacillus* CMG1403 แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบของโมโนแซคคาไรด์ของเอ็กโพลีแซคคาไรด์ที่ได้ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Cerning et al (1994) พบว่า การใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำตาลแล็กโตส และน้ำตาลกลูโคส ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จาก *L. casei* แม้ว่าส่วนใหญ่สภาวะในการเลี้ยงเชื้อจะไม่ค่อยส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติและลักษณะเบื้องต้นของเอ็กโพลีแซคคาไรด์มากนัก แต่ส่งโดยตรงต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ เช่น พีเอช อุณหภูมิ เป็นต้น นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้าของ Bergmaier et al (2003) พบว่า *L. rhamnosus* RW-9595M ไม่สามารถผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ได้ ถ้าหากเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า 32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการทำนายจุด เพื่อหาค่าที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 ในครั้งนี้ และประเมินหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง ค่าที่คาดการณ์ได้รับการยืนยันจากการทดลอง (ตารางที่ 13) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์สูงสุด คือ ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ใช้เท่ากับ 39.51 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเท่ากับ 6.66 โดยจะส่งผลต่อการผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์มากที่สุดเท่ากับ 39.82 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเพื่อไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโพลีแซคคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็ง

จากรายงานหลายฉบับ พบว่า การออกแบบการทดลองด้วยพื้นผิวตอบสนอง สามารถเพิ่มผลผลิตเอ็กโพลีแซคคาไรด์ได้มากขึ้นจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม (ตารางที่ 14) และการนำเทคนิคพื้นผิวตอบสนองสามารถประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดลองได้ เนื่องจากไม่สิ้นเปลืองวัตถุดิบ และเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันที่ให้ผลการทดลองที่ครอบคลุมและแม่นยำ

ตารางที่ 13 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุดจากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 ที่ 72 ชั่วโมง

Condition	Carbon %	Nitrogen %	pH	Temperature (°C)	Desirability	Predict EPS Yield (g/L)	Actual EPS Yield (g/L)	Mean difference
1	5.19	3	6.69	38.76	0.977	40.14	39.05 ± 0.13	1.09
2	5.17	3	6.68	38.6	0.977	40.20	39.34 ± 0.12	0.86
3	5	3	6.66	39.51	0.974	41.17	39.82 ± 0.03	1.36
4	4.71	3	6.47	35.23	0.956	40.21	39.39 ± 0.13	0.82

ตารางที่ 14 การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM)

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สารตั้งต้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH	ปริมาณ EPS (กรัมต่อลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)	อ้างอิง
<i>Bacillus tequilensis</i> PS21	RBR 5% SBM 3%	39.51	6.66	39.82	72	This study
<i>Weissella confusa</i> NH02	Sugarcane molasses (43.65 g/L) soybean meal (1.87 g/L)	39.64	6	30.34	48	(Saelim and Maneerat 2019)
<i>Lactobacillus brevis</i> E25	MRS	35	6.5	10-35	18	(Ermis et al., 2020)
<i>Lactobacillus confusus</i> TISTR 1498	Sugarcane juice and add sucrose 300 g/L, 1.22PYB (Peptone (6.1 g/L),	29.75	5.55	107.52	24	(Manochai et al., 2014)

	yeast extract (3.05 g/L) and beef extract (3.05 g/L))					
<i>Bacillus velezensis</i> KY498625	Sugarcane molasses 12% (W/V) yeast extract (6 g/L)	30	7.2	7.6	24	(Moghannem et al., 2018)
<i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> MS3	Mango peels powder (7.5 g/L) yeast extract (3.5 g/L)	37	7	15.6	72	(Asgher et al., 2019)

งานวิจัยของเราจากตารางที่ 14 พบว่า การนำเทคนิคพื้นผิวตอบสนองมาใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สามารถเพิ่มผลผลิตได้ 1.39 เท่า จากการที่ไม่มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ จาก (28.47 เป็น 39.82) แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนองสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เป็นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ก่อนหน้านี้ที่ไม่มีการนำเทคนิคพื้นผิวตอบสนองมาใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Asgher et al (2019) พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. licheniformis* MS3 โดยการนำเทคนิค RSM-CCD มาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สามารถเพิ่มผลผลิตเป็น 3.2 เท่า จากสถานะที่ไม่เหมาะสม (จาก 4.6 เป็น 15.6 กรัมต่อลิตร) และสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Manochai et al (2014) ที่นำเทคนิคพื้นผิวตอบสนองมาเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ พบว่า สถานะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในน้ำอ้อย คือ พีเอชเท่ากับ 5.55 อุณหภูมิ 29.75 องศาเซลเซียส และอาหารสูตรดัดแปลง 1.22 PYB (โปรตีนสกัด 6.1 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 3.05 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากเนื้อวัว 3.05 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สถานะที่เหมาะสมการคาดการณ์ การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงสุด 107.5 กรัมต่อลิตร และชีวมวลที่คาดการณ์ไว้คือ 1.92 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการหมักที่ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งอาหารสามารถช่วยเพิ่มผลเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 2 เท่า

จากรายงานก่อนหน้าของ Saelim & Maneerat (2019) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยมีปัจจัยทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง และอุณหภูมิ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *W. confuse* NH02 ประกอบด้วย กากน้ำตาล ความเข้มข้น 43.65 กรัมต่อลิตร กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 1.87 กรัมต่อลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 39.64 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถทำนายการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้เท่ากับ 30.34 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 5.33 กรัมต่อลิตร

มีการศึกษาก่อนหน้าของ Ermis et al (2020) ซึ่งใช้เทคนิคพื้นผิวตอบสนองเพื่อผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Lactobacillus brevis* E25 โดยศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ (30, 36 และ 42 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (18, 33 และ 48 ชั่วโมง) และพีเอช (4.5, 5.5 และ 6.5) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จาก *Lactobacillus brevis* E25 อยู่ในช่วง 10 ถึง 35 กรัมต่อลิตร จากตารางที่ 14 จะเห็นว่ารายงานของ Manochai et al (2014) สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้มากกว่ารายงานวิจัยของเรา เนื่องจากการใช้แบคทีเรียที่แตกต่างกัน และมีการดัดแปลงสูตรอาหาร โดยมีการเติมแหล่งอาหารสังเคราะห์ลงในน้ำอ้อย ซึ่งเป็นการเพิ่มแหล่งอาหารให้แบคทีเรียละแบคทีเรียจึงสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณที่มากกว่ารายงานของเรา อย่างไรก็ตามถือว่าเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตที่มากขึ้นแม้ว่าจะได้ผลผลิตที่สูงขึ้น ดังนั้นรายงานของเราถือว่าสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณที่สูงในระดับหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานที่ผ่านมา ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สิ่งที่ต้องการคือผลผลิตที่สูง แต่ต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิตด้วย เนื่องจากรายงานของเรานี้เป็นการสารเพิ่มมูลค่าให้แก่วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรและลดต้นทุนในกระบวนการผลิต เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ในภาคอุตสาหกรรมระดับชุมชน หรือภาคอุตสาหกรรมระดับประเทศในอนาคต สามารถลดต้นทุนในการผลิตและสามารถขายในราคาที่ไม่แพง ดังนั้นรายงานวิจัยฉบับนี้สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณที่สูง และลดต้นทุนในการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในตาราง

พูน ปณ ศิโต ชเว

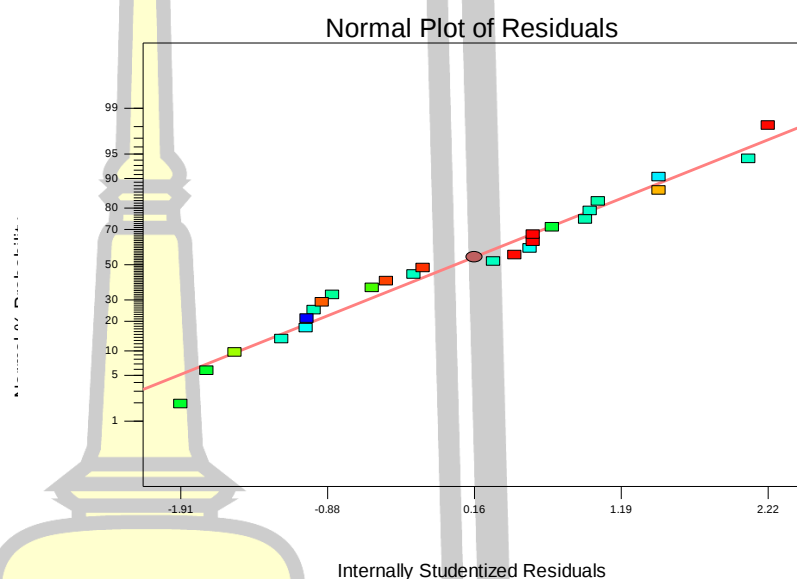
การตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลเบื้องต้น ประกอบด้วย

1. การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ ซึ่งเป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูล ว่ามีการกระจายของค่าส่วนตกค้าง (ภาพที่ 16) พบว่าข้อมูลมีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากการทดลองการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ไม่แสดงสิ่งผิดปกติ สรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงปกติ

Design-Expert® Software
Yield (72)

Color points by value of
Yield (72):

38.7
13.4



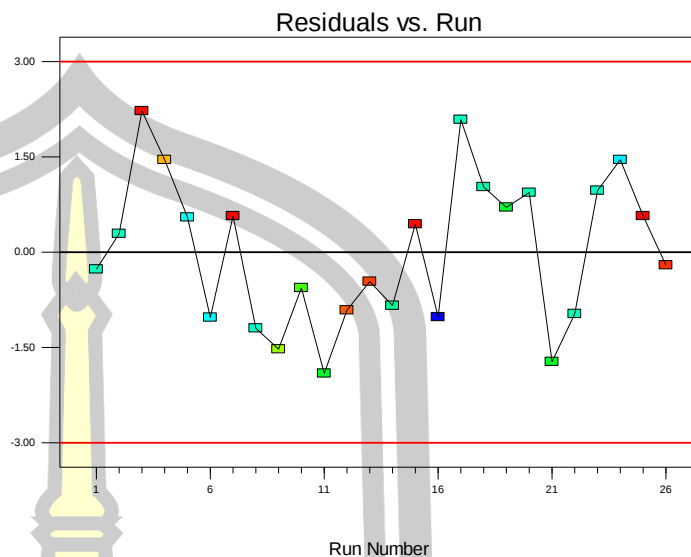
ภาพที่ 16 ความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้างของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

2. การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล (ภาพที่ 17) พบว่า ส่วนตกค้างของผลการทดลองของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ไม่มีรูปแบบที่แน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายตัวสม่ำเสมอ แสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

พหุ ประสิทธิภาพ

Design-Expert® Software
Yield (72)

Color points by value of
Yield (72):

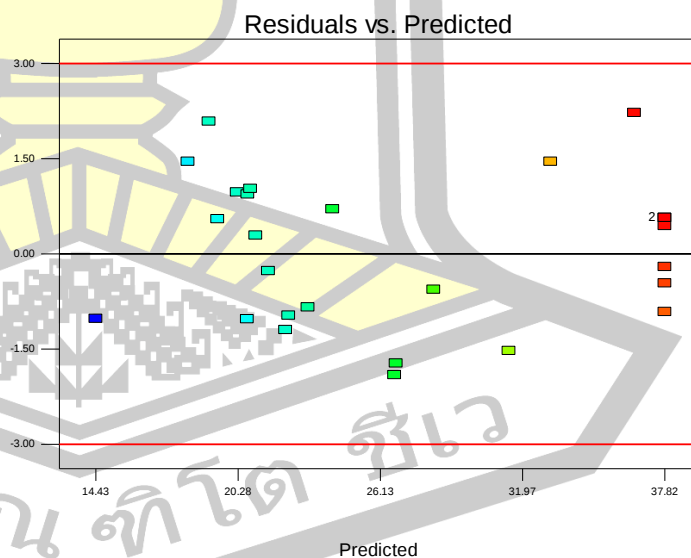


ภาพที่ 17 การกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูลการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

3. การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน (ภาพที่ 18) พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและลบ แสดงให้เห็นว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน

Design-Expert® Software
Yield (72)

Color points by value of
Yield (72):



ภาพที่ 18 การกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัยของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

4.3 การศึกษาหองค์ประกอบทางเคมีในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *B. tequilensis* PS21 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด เท่ากับ 591.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (คิดเป็น 85 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารชีวเคมี) ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ปริมาณโปรตีน 25.13 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (คิดเป็น 3.39 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณกรดนิวคลีอิก 86.67 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (คิดเป็น 11.69 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยใช้ *B. tequilensis* PS21

ตัวอย่าง	ปริมาณสารชีวเคมี (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)			อ้างอิง
	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	กรดนิวคลีอิก	
<i>B. tequilensis</i> PS21	591.19±10.04 (85%) ^a	25.13±0.76 (3.39%) ^c	86.67±2.89 (11.69%) ^b	This work
<i>Chelatococcus daeguensis</i> TAD1	86.7	116.8	14.9	(Wei et al., 2017)
<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	7.7	126.6	24.9	(Sheng et al., 2005)
<i>B. tequilensis</i> PS21	697.8 ± 3.7 (65%) ^a	361.4 ± 3.1 (34%) ^b	12.5 ± 4.1 (1%) ^c	(Luang-in et al., 2018)
<i>Cloacibacterium normanense</i>	104.0 ± 5.5	145.6 ± 4.7	-	(Nouha et al., 2016)

อักษร ^{a, b, c...} ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA in CRD) หรือ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

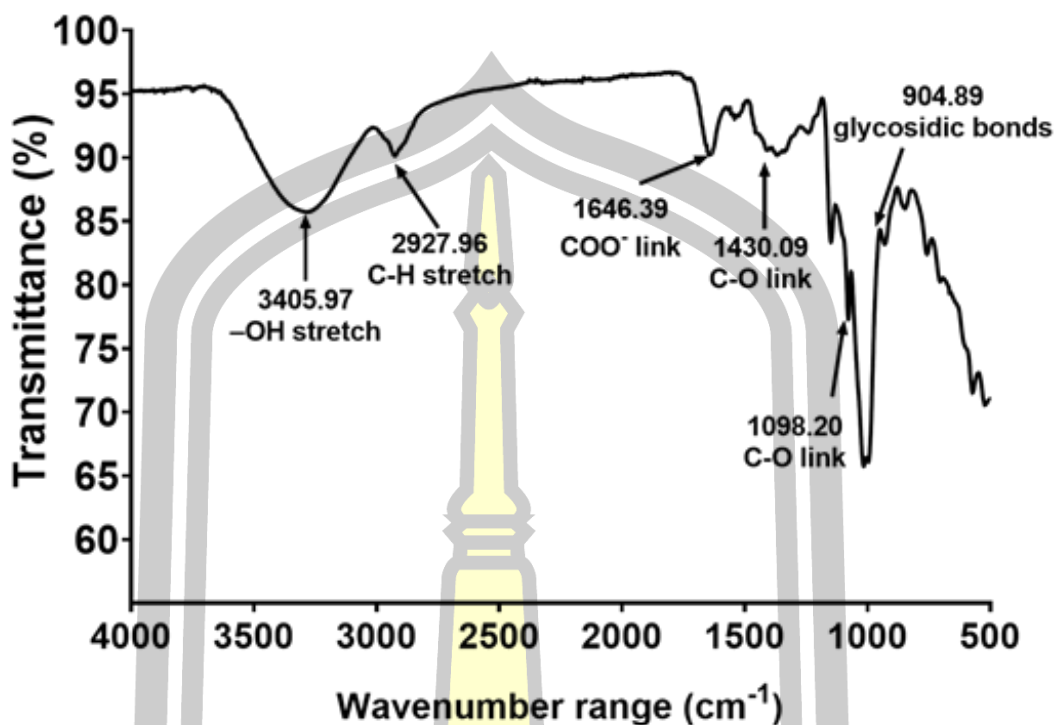
จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Luang-in et al, (2018) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *B. tequilensis* PS21 จากน้ำตาลแลคโตส มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด 697.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (65 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณโปรตีน 361.4 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (34 เปอร์เซ็นต์) และปริมาณกรดนิวคลีอิก 12.5 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ (1 เปอร์เซ็นต์)

รายงานก่อนหน้านี้ของ Razack & Thangavelu, (2013) ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Bacillus subtilis* โดยใช้รำข้าว (5 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 63 เปอร์เซ็นต์ และใช้กากน้ำตาล (2 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำตาลซูโครส (2 เปอร์เซ็นต์) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 76 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่มาจากกากน้ำตาลสามารถให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดมากกว่าแหล่งคาร์บอนที่มาจากน้ำตาลซูโครส

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wei et al, (2017) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Chelatococcus daeguensis* TAD1 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด 86.7 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ปริมาณโปรตีน 116.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และปริมาณกรดนิวคลีอิก 14.9 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ในขณะที่รายงานก่อนหน้านี้ของ Sheng et al, (2005) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Rhodopseudomonas acidophila* มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุด 7.7 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ปริมาณโปรตีน 126.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และปริมาณกรดนิวคลีอิก 24.9 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย สารตั้งต้นและสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งจะส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกันออกไป

4.4 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรด

การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วย FTIR (ภาพที่ 19) พบว่า ที่ตำแหน่ง $3,405.97\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีคของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของวงแหวนน้ำตาล ส่วนพีคของเมธิลหรือกลุ่มเมธิลีน (-C=H_3 หรือ $\text{-CH}_2\text{=}$) อยู่ที่ตำแหน่ง $2,927.96\text{ cm}^{-1}$ มักมีอยู่ในน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ส่วนตำแหน่งที่อยู่ระหว่าง $1,098.20$ ถึง $1,646.39\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งอาจประกอบด้วย กรดคาร์บอกซิลิก (C-O) คาร์บอกซิล (COO) หรือเอไมด์ บ่งบอกว่าตัวอย่างเป็นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เนื่องจากยืนยันว่ามีวงแหวนคาร์โบไฮเดรต (Poli et al., 2009; Tipson et al., 1959) พีคที่ 904.89 cm^{-1} แสดงให้เห็นว่ามีพันธะไกลโคซิดิก (C-O-C) และพันธะ C-O-H ของหน่วยไพราโนสในแต่ละโพลีแซคคาไรด์ (Jia et al., 2013)

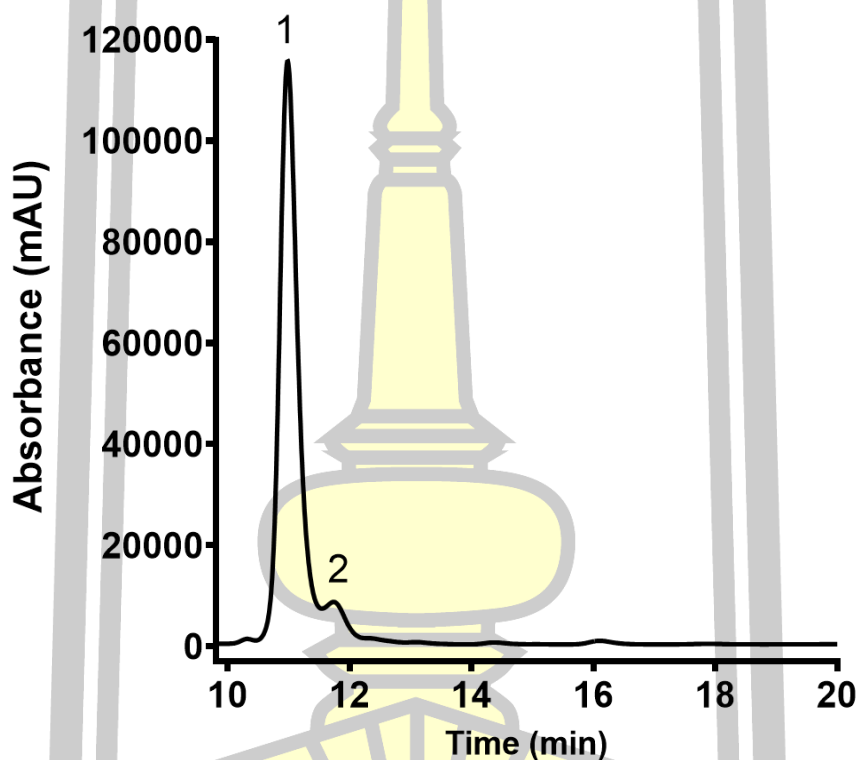


ภาพที่ 19 การวิเคราะห์ FTIR ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สกัดหยาบ ด้วย *B. tequilensis* PS21 เพาะเลี้ยงใน ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 39.51 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 6.66 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Ogidi et al. (2020) พบว่า หมูฟังก์ชันของ เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้วัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการทางเกษตรที่แตกต่างกันเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pleurotus pulmonarius* ประกอบด้วย มีหมูไฮดรอกซิล (-OH) เมธิล (-CH₃) คีโตน (-RCOH) และ หมูคาร์บอนิล (-C=O) เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะมีหมูฟังก์ชันที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ของแบคทีเรีย สารตั้งต้นและสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อการสังเคราะห์เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อย่างไรก็ตามหมูฟังก์ชันของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมา

4.5 การศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ด้วย HPLC

การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วย HPLC ของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์สกัดหยาบ โดย *B. tequilensis* PS21 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส 88 เปอร์เซ็นต์ ที่ 10.98 นาที และน้ำตาลไซโลส 12 เปอร์เซ็นต์ ที่ 11.75 นาที (ภาพที่ 20) ซึ่งบ่งบอกว่าในทุก ๆ 8 โมโนเมอร์ของน้ำตาลที่มาต่อกัน จะประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส 7 หน่วย (3.12 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง) และน้ำตาลไซโลส 1 หน่วย (0.42 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง)



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์ HPLC ของเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์สกัดหยาบ ด้วย *B. tequilensis* PS21 เพาะเลี้ยงใน พงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 3 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 39.51 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 6.66 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พิคที่ 1 กลูโคส (10.98 นาที) และพิกที่ 2 - ไซโลส (11.75 นาที)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Luang-in et al. (2018) ศึกษาการผลิตของ เอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ ด้วย *B. tequilensis* PS21 โดยใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธี HPLC เป็นเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์ชนิดเฮเทอโรโพลิแซคคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนเมอร์ 5 ชนิด เรียงตามลำดับดังต่อไปนี้ (อัตราส่วนของ EPS): ไซโลส

(17.65) 12.28 นาที กลูโคส (2.54) ที่ 11.55 นาที ไรโบส (1.83) ที่ 9.21 นาที แรมโนส (1.23) ที่ 12.98 นาที และกาแลคโตส (1) ที่ 10.86

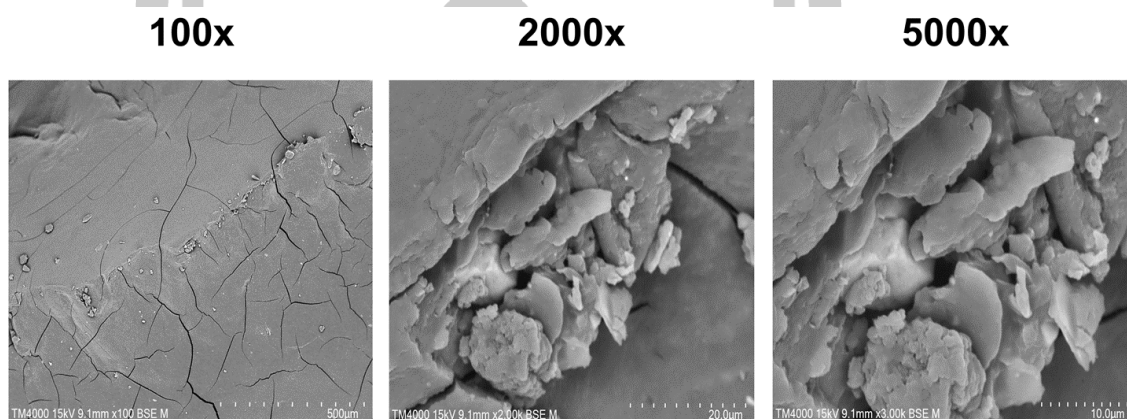
ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Seo et al. (2004) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Sphingomonas* sp. CS101 ประกอบด้วยน้ำตาล 4 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส แมนโนส ฟิวโคส และแรมโนส ในขณะที่สายพันธุ์บาซิลลัสที่ได้จากปล่องภูเขาไฟระเบิดของอิตาลี พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีน้ำตาลฟรุคโตส ฟิวโคส กลูโคส กาแลคโต ซามิน และแมนโนส ใช้น้ำตาลที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน (กลูโคส ซูโครส ทิฮาโลส ฟรุคโตส ไรโบส ซิโลส แรมโนส และเซลโลไบโอส) และใช้สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน (Spano & Nicolaus, 2013)

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Insulkar et al. (2018) พบว่า องค์ประกอบของน้ำตาลที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* PASS26 ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส (18.44%) กาแลคโตส (9.89%), ฟรุคโตส (16.15%), แมนโนส (27.32%) และกรดกาแลกทูโรนิก (28.18%) องค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะขึ้นอยู่กับประเภทหรือองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงและชนิดของจุลินทรีย์ หากองค์ประกอบของ แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และแร่ธาตุ แตกต่างกันจะส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ต่างกัน คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีแตกต่างกัน ดังนั้น องค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร ชนิดจุลินทรีย์ หรือแม้แต่สภาวะที่ใช้ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อีกด้วย

งานวิจัยของเราสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Hussein et al. (2018) พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Nostoc carneum* มีน้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน 4.3:2.1 ซึ่งบ่งบอกว่าในทุก ๆ 7 โมโนเมอร์ของน้ำตาลที่มาต่อกัน จะประกอบไปด้วย น้ำตาลไซโลส 4 หน่วย และน้ำตาลกลูโคส 2 หน่วย (215.2 และ 105.5 มิลลิกรัมต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์) และพบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *N. carneum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ผลิตจาก *N. carneum* เมื่อเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก ค่า IC_{50} (32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ นั้นสูงกว่าค่าของกรดแอสคอร์บิก (24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ค่า IC_{50} ของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีค่าต่ำและส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เทียบเท่ากรดแอสคอร์บิก ดังนั้นเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *N. carneum* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ที่สูง

4.6 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดยการสแกนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การสแกนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพในการจัดจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาของพื้นผิวเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพทั่วไปของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ลักษณะสัณฐานวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. tequilensis* PS21 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่ามีลักษณะเป็นพื้นผิวเรียบ มีขนาดกะทัดรัด เมื่อเพิ่มกำลังขยายจะเห็นว่าลักษณะเป็นรูพรุน (ภาพที่ 21) ซึ่งงานวิจัยของเราสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Rani et al. (2016) พบว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีขนาดกะทัดรัดและมีรูพรุน และยังมีรูปร่างทรงกระบอกของ *B. tequilensis* FR9 นั้นติดอยู่กับผิวเซลล์



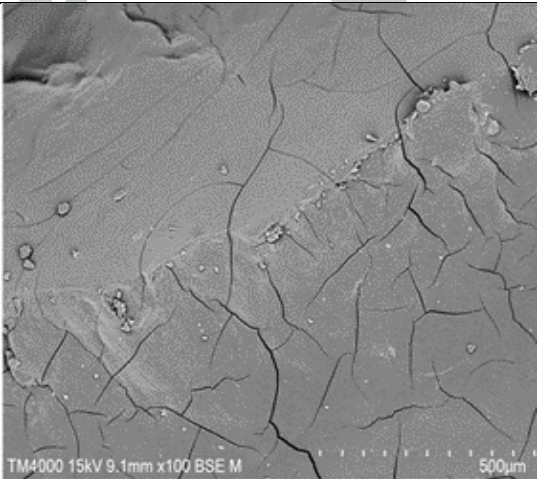
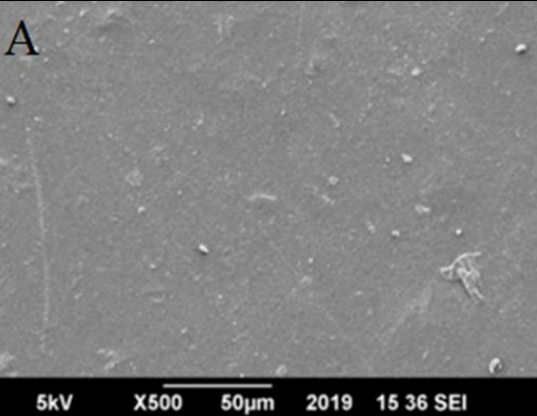
ภาพที่ 21 ลักษณะของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สกัดหยาบที่ผลิตโดย *B. tequilensis* PS21 เพาะเลี้ยงใน ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ ผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 39.51 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช 6.66 โดยการสแกนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

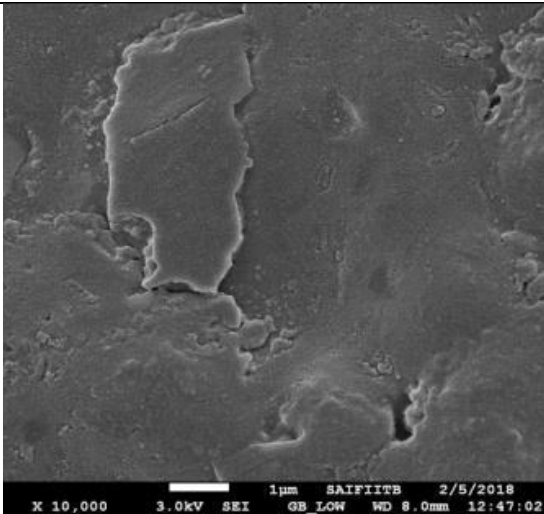
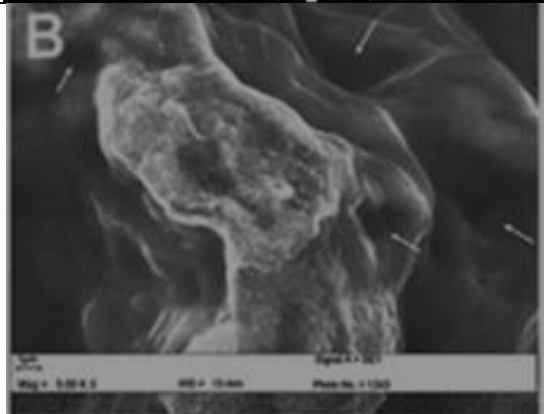
จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Asgher et al. (2019) พบว่า โครงสร้างของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* MS3 มีลักษณะเป็นเกล็ดเรียบแต่กะทัดรัด เมื่อเพิ่มกำลังขยายที่สูงขึ้นพื้นผิวที่ไม่สม่ำเสมอแต่เรียบเนียน ซึ่งมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันกับของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *thermophilus* spp., *B. anthracis* และ *mesophilic* spp., *B. licheniformis*

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Insulkar et al. (2018) รายงานว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพื้นผิวมีรูพรุนคล้ายเปลือกหุ้ม โครงสร้างคล้ายเกล็ดที่มีขนาดกะทัดรัด เมื่อใช้กำลังขยายที่สูงขึ้นจะสังเกตเห็นพื้นผิวที่เรียบไม่สม่ำเสมอแต่โดดเด่นของสะเก็ดที่มีความพรุนน้อยกว่า ซึ่งโครงสร้างคล้ายเกล็ดคล้ายเกล็ดสำหรับเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Bacillus anthracis* Strain PFAB2 ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน (Banerjee et al., 2018)

รายงานก่อนหน้าของ Luang-in et al. (2018) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *B. tequilensis* PS21 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีการเติมน้ำตาลแลคโตส 80 กรัมต่อลิตรมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กที่มีพื้นผิวไม่เรียบและมีรูพรุนปกคลุม ในขณะที่รายงานวิจัยของเราลักษณะเป็นพื้นผิวเรียบมีขนาดกะทัดรัด อย่างไรก็ตามถึงแม้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันแต่ลักษณะของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่างกัน เนื่องจากสารตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียต่างกันอาจส่งผลต่อรูปร่างทางกายภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และลักษณะสัณฐานวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์	อ้างอิง
	This work
	(Asgher et al., 2019)

		(Insulkar et al., 2018)
		(Luang-in et al., 2018)

4.7 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

จากการศึกษาผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้นำเทคนิคพื้นผิวตอบสนองมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ตามแผนการออกแบบทดลองประสมกลาง พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. tequilensis* PS21 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 48.02 ± 0.15 เปอร์เซ็นต์ และวิธี FRAP เท่ากับ 1.25 ± 0.04 มิลลิกรัม Fe (II) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 17) สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yang et al. (2015) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ C-1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

ตารางที่ 17ฤทธิ์ทางชีวภาพของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากสภาวะที่เหมาะสมโดย

B. tequilensis PS21

ตัวอย่าง	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ		อ้างอิง
	DPPH (% scavenging)	FRAP (mg FeSO ₄ /g DW)	
<i>B. tequilensis</i> PS21 Crud EPS (20 mg/mL)	48.02±0.15 ^a	1.25±0.04 ^b	This work
<i>B. tequilensis</i> PS21 Crud EPS (20 mg/mL)	57.50 ± 0.8	5.60 ± 3.10	(Luang-in et al., 2018)
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> C88 (4 mg/mL)	51.52 ± 1.10	0.39	(Chen et al., 2014)
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> CNPC003 (8 mg/mL)	51.52 ± 1.10	15.54± 10.63	(Bomfim et al., 2020)
<i>P. pulmonarius</i>	60-88%	-	(Ogidi et al., 2020)
<i>Bacillus velezensis</i> <i>SN-1</i> (4 mg/mL)	60	-	(Cao et al., 2020)

อักษร a, b, c... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA in CRD) หรือ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ogidi et al. (2020) ใช้วัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรที่แตกต่าง ได้แก่ เปลือกถั่วลิสง ขุยมะพร้าว และเปลือกสับปะรด เป็นอาหารเลี้ยง *Pleurotus pulmonarius* พบว่า กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ด้วยวิธี DPPH เท่ากับ (60.60–81.20%, 70.40–84.70%, 78.40–88.50%) ตามลำดับ

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chen et al. (2014) พบว่า สารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Lactobacillus plantarum* C88 สามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 51.52 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์ และวิธี FRAP เท่ากับ 0.39 มิลลิกรัม Fe (II) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จากรายงาน

วิจัยก่อนหน้านี้ของ Bomfim et al. (2020) แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 51.52 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์ และวิธี FRAP เท่ากับ 15.54 ± 10.63 มิลลิกรัม Fe (II) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Luang-in et al. (2018) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *B. tequilensis* PS21 เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีการเติมน้ำตาลแลคโตส 80 กรัมต่อลิตร มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยวิธี DPPH ($57.50 \pm 0.8\%$) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (5.60 ± 3.10 มิลลิกรัม Fe (II) ต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) แสดงให้เห็นว่างานวิจัยดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่างานวิจัยของเราถึงแม้จะเป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน อย่างไรก็ตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะขึ้นอยู่กับประเภทหรือองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงและชนิดของจุลินทรีย์ หากองค์ประกอบของ แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน และแร่ธาตุแตกต่างกัน (Insulkar et al., 2018) จะส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกัน คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน ดังนั้นองค์ประกอบของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน

4.8 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

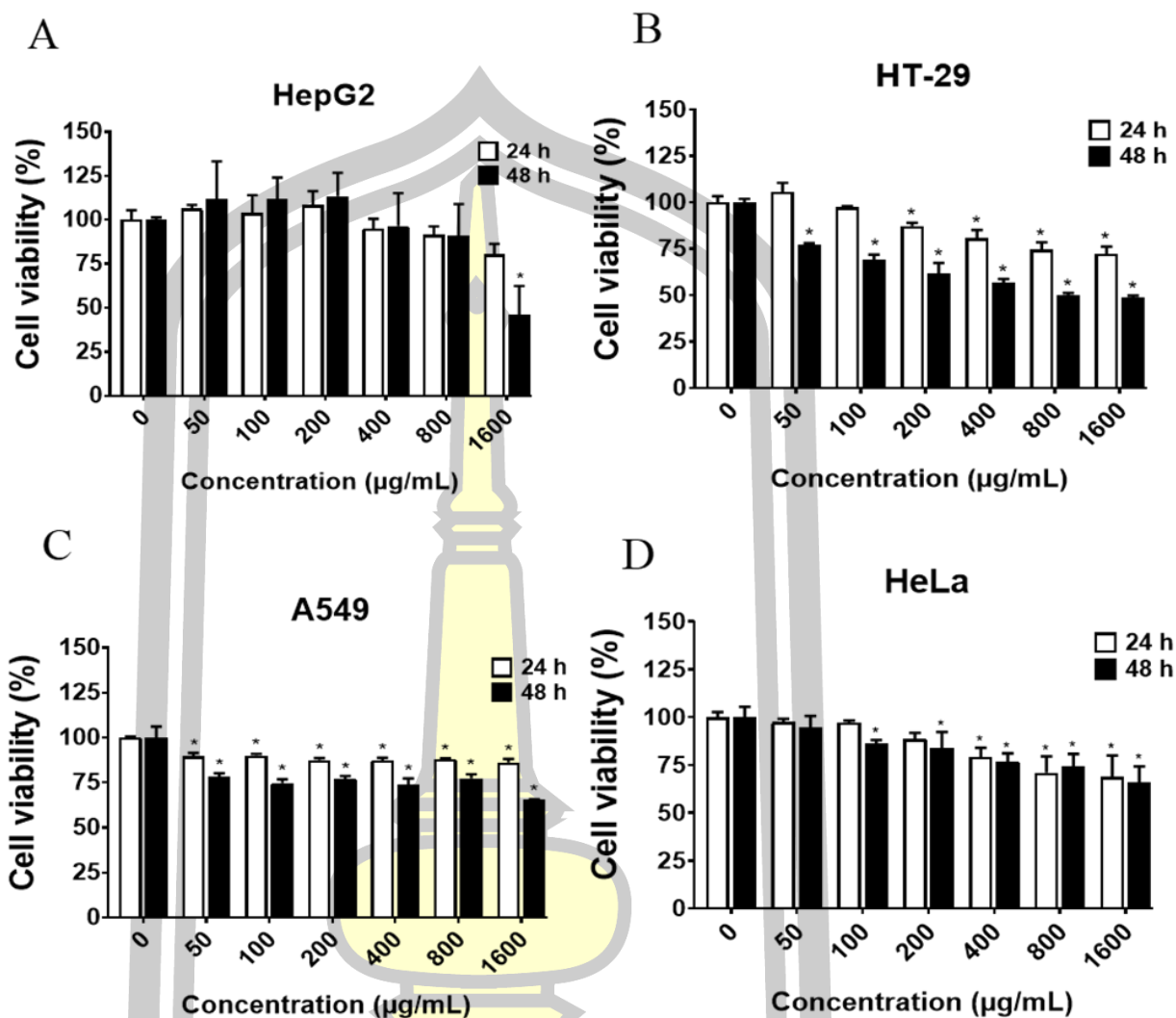
จากการศึกษาผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองที่ส่งผลต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ได้นำเทคนิคพื้นผิวตอบสนองมาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ตามแผนการออกแบบทดลองประสมกลาง พบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้สูง จึงทำการคัดเลือกสภาวะที่ดีที่สุดมาศึกษาต่อ โดยศึกษาผลของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวของ เซลล์มะเร็งระดับ เซลล์มะเร็งลำไส้ด้วย เซลล์มะเร็งปอด และเซลล์มะเร็งปากมดลูก ด้วยเทคนิค MTT

หลักการทำงานของ MTT คือ เซลล์ที่มีชีวิตอยู่มี Enzyme succinate dehydrogenase ซึ่งจะเปลี่ยน tetrazolium salt ให้เป็นผลึกฟอร์มาซานโดยปฏิกิริยารีดิวซ์ (Reduction) และผลึกฟอร์มาซานมีสีม่วงน้ำเงินที่ไม่ละลายในน้ำต้องละลายด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของฟอร์มาซานซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิต ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 ที่ได้รับสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีความเข้มข้น 0 ถึง 1600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 หลังจากการบ่มที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่า Emax เท่ากับ 54.16 ± 16.52 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังภาพที่ 22A และตารางที่ 18)

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ HT-29 พบว่า หลังจากการบ่มที่เวลา 48 มีค่า Emax เท่ากับ 51.08 ± 0.79 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22B และตารางที่ 18) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด A549 หลังจากการบ่มที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่า Emax เท่ากับ 34.64 ± 0.31 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22C และตารางที่ 18) และความเป็นพิษต่อเซลล์ปากมดลูก HeLa พบว่า หลังจากการบ่มที่เวลา 48 ชั่วโมง มีค่า Emax เท่ากับ 34.63 ± 8.66 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22D และตารางที่ 18)

นักวิจัยหลายคน พบว่า โพลีแซคคาไรด์มีฤทธิ์ด้านเนื้องอกและรูปแบบการออกฤทธิ์เป็นไปตามกลไกสิ่งเหล่านี้ ได้แก่ การกระตุ้นและเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน, การเหนี่ยวนำของการตายของเซลล์, การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ และการหยุดวงจรของเซลล์ (Meng et al., 2016; Xu et al., 2017) เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ที่ได้จาก *Lactobacillus acidophilus* มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้สองชนิด HCT15 และ CaCo-2 (Deepak et al., 2016) จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Zhou et al (2017) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เอ็นซีสองมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งมีความหลากหลายขององค์ประกอบโมโนแซคคาไรด์ ดังนั้นจึงเชื่อกันว่าจะส่งผลกับตัวรับที่ผิวเซลล์ต่าง ๆ มากขึ้น โดยเฉพาะในเซลล์มาโครฟาจและเซลล์เดนไดรต์ เช่น TLRs, เลกตินที่จับกับแมนโนส และเลกตินชนิด C ซึ่งมีโดเมนการจดจำคาร์โบไฮเดรตที่เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน โดยธรรมชาติและเสริมระบบต่อต้านเนื้องอก (Brown & Gordon, 2005; Steele et al., 2005) โพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ แต่จะจับกับตัวรับเซลล์มะเร็งที่ควบคุมการส่งสัญญาณของเซลล์และการถ่ายทอดเซลล์





ภาพที่ 22 ผลของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งโดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0-1600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร A; มะเร็งตับ B; มะเร็งลำไส้ C; มะเร็งปอด D; มะเร็งปากมดลูก ที่เวลาการบ่ม 24-48 ชั่วโมง โดยวิธี MTT ข้อมูลแสดง ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

หมายเหตุ: * แสดงค่าที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

พูน บณ สิโต ชีเว

ตารางที่ 18 ค่าการรอดชีวิต (Cell viability) ของสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ต่อเซลล์มะเร็ง

Sample	Cell viability (%)					Reference
	HepG2	HT-29	A549	HeLa	Caco-2	
<i>B. tequilensis</i> PS21 Crud EPS (1600 µg/mL) 48 h	45.84±16.52	48.91±0.80	65.36±0.30	65.68±8.66		This work
<i>Lactobacillus plantarum</i> WLPL04 (800 µg/mL) 24 h					85	(Liu et al., 2019)
<i>Enterococcus faecalis</i> (1000 µg/mL) 24 h				16.5		(Choudhuri et al., 2020)
<i>Cryptococcus heimaeyensis</i> S20 (500 µg/mL) 72 h			27.62			(Hao et al., 2020)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> HX-2 Pure EPS (800 µg/mL) 48 h			73.13	60.31		(Hu et al., 2020)

อักษร a, b, c... ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA in CRD) หรือ F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

มีรายงานหลายฉบับที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์โดยมีหน้าที่ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Lu et al (2019) แสดงให้เห็นว่าโพลีแซคคาไรด์ที่ละลายในน้ำ (TPS) ที่ถูกแยกจากไมซีเลียมในการหมักจาก *Trichoderma kangnensis* สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ของหนู และ

รายงานก่อนหน้านี้ของ Ramamoorthy et al (2018) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Bacillus thuringiensis* RSK CAS4 ที่แยกได้จาก ascidian didemnum granulatum ทดสอบกับ เซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด และเซลล์ปกติ แสดงให้เห็นว่าเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด และพบว่ามีฤทธิ์ต้านมะเร็งตับสูงสุด 76 เปอร์เซ็นต์ (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Hu et al., 2020 พบว่า สารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด A549, เซลล์มะเร็งตับ SMMC-7721 และ เซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa โดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ นอกจากนี้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 21.86, 31.24 และ 37.65 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นว่าสารสกัดสามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ดีที่สุด

รายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Mohamed et al (2018) รายงานว่าเซลล์มะเร็งปอด A-549 ที่ได้รับสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่งผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงทำให้อัตราการรอดของเซลล์มะเร็งลดลง ความสามารถในการต้านมะเร็งของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์อาจเกิดจากคุณสมบัติทางเคมีที่แตกต่างกัน เช่น รูปร่างของโซ่สายโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล และองค์ประกอบของโมโนแซ็กคาไรด์ (Wu et al., 2016) โดยน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลสูงจะแสดงฤทธิ์การต้านมะเร็งมากขึ้น (Peng et al., 2005)

ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Nguyen & Nguyen (2015) พบว่า เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* NCR112 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa (86.86 ± 4.875) สูงกว่าเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (50.36 ± 6.237) เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จะส่งผลต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ เมตาบอลิซึมของเซลล์ และการเคลื่อนที่ของเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ส่งผลต่อการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งและมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Choudhuri et al., 2020 พบว่า สารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa 68.6 เปอร์เซ็นต์ (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa 83.5 เปอร์เซ็นต์ (1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในทางตรงกันข้ามสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

HEK-29 อย่างชัดเจน ดังนั้นจะเห็นว่าความเข้มข้นของสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ส่งผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Farag et al (2020) พบว่า สารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์แสดงความเป็นพิษต่อไตหนูแฮมสเตอร์ในเซลล์ปกติ (BHK) (IC_{50} 254 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ Caco-2 (IC_{50} 138 และ 159 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sun et al (2018) พบว่า เมื่อเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลต่ออัตราการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 เพิ่มขึ้นซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของสารสกัด EPS-3a แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ดีที่สุดที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ EPS-1a และ EPS-2a เมื่อค่า IC_{50} ของสารสกัด EPS-3a เท่ากับ 313.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเร็วๆ นี้การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเซลล์มะเร็งของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าการต้านเซลล์มะเร็งขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบทางเคมี โครงสร้างของสายโซ่โมเลกุลของโพลิเมอร์ที่แตกต่างกัน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ma et al (2018) พบว่า สารสกัดเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ REPS2-A มีฤทธิ์การต้านมะเร็งตับ HepG2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับผลกระทบต่อเซลล์ตับต่ำกว่าปกติของเซลล์ตับ L02 ซึ่งศึกษากลไกพื้นฐาน พบว่า REPS2-A จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดและเวลาที่ได้รับสารสกัดที่เข้าจับกับวัฏจักรของเซลล์ G1 / S

อย่างไรก็ตาม การศึกษาในหลอดทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านมะเร็งของสารสกัดจากพืชมีข้อจำกัดในการในร่างกายที่อาจจะเป็นไปได้ (Ramamoorthy et al., 2018) ในการศึกษาี้ โดยเฉพาะเซลล์มะเร็งที่ได้รับสารสกัดไมโครกรีนที่มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลานาน พบว่า สารสกัดจะไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร สารเมแทบอลิต์ที่ได้จากสารสกัดจากพืชที่ไม่เกี่ยวข้องทางสรีรวิทยาเหล่านี้ เช่น สารสารเมแทบอลิต์ไม่ผ่านการคอนจูเกต อาจไม่ไปถึงเซลล์มะเร็งเป้าหมายและฤทธิ์การต้านมะเร็งอาจจะไม่สมบูรณ์เมื่ออยู่ในสภาพทางสรีรวิทยา ดังนั้นจึงขอแนะนำการนำไปใช้ทางชีวภาพ (BFs) ของไมโครกรีนให้อยู่รูปของเมทริกซ์ของอาหารที่ผ่านการย่อยแล้วทั้งหมด เพื่อประเมินผลของการต้านมะเร็ง เนื่องจากการนำไปใช้ทางชีวภาพของสารเมตาโบไลต์ที่ได้จากลำไส้ซึ่งมีอยู่ในกระแสเลือดและสามารถเข้าสู่เนื้อเยื่อของระบบได้ (Lu et al., 2019)

4.9 การประเมินมูลค่าของผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

การประเมินต้นทุนในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 การทดลองครั้งนี้ นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เพื่อเพิ่มมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลิตภัณฑ์ ได้นำเทคนิคพื้นผิวตอบสนองมาหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดและสามารถ

ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ได้ 39.82 ± 0.03 กรัมต่อลิตร และทำการประเมินมูลค่าของผลิตภัณฑ์ชีวภาพ (ตารางที่ 18)

จากการคำนวณต้นทุนการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับราคาเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทางการตลาด พบว่า การผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในงานวิจัยนี้มีต้นทุนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทั้งหมด 174.66 บาทต่อลิตร หากคิดเป็นต้นทุนทั้งหมดต่อน้ำหนักเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ คิดเป็นราคา 4.48 บาทต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และต้นทุนของสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อคิดเป็น 0.03 บาทต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เมื่อเปรียบเทียบกับราคาผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้กับราคาแอลจินेटในท้องตลาด พบว่า ราคาแอลจินेटตามท้องตลาดคิดเป็น 7.60 บาทต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อย่างไรก็ตามการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในรายงานฉบับนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานที่ผ่านมาในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ถือว่าสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า ดังนั้นต้นทุนในการผลิตของรายงานฉบับนี้มีต้นทุนที่ต่ำกว่ารายงานที่ผ่านมาและอาจจะต่ำกว่าราคาในท้องตลาด ในอนาคตอาจจะมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปพัฒนาและศึกษาวิจัยต่อยอดเกี่ยวกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในถึงชีวภาพในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อที่จะสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์และการทำให้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ด้านผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เช่น อาหารคน อาหารสัตว์ เครื่องดื่มสุขภาพ เครื่องสำอาง เป็นต้น



ตารางที่ 19 ต้นทุนการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ และราคาเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ทางการตลาด

EPS	Ingredient	Price THB	Price THB/L	Source
EPS this work	Broken rice	15	0.075	This work
39 g/1 L	THB/kg			
	Soy meal	19.40	0.58	
	THB/kg			
	water THB/L	10	10	
	Electricity	30	30	
	THB/3 day			
	Ethanol 95%	1200	133.33	
	THB/18 L			
	Total	1227.40	174.66	
EPS commercial		7,591		(https://www.lazada.co.th/products/alginate-powder-food-additive-ointment-gel-thickener-emulsifier-i1943898218-s6160760600.html?)
Alginate Powder Food Additive				
(1000 g)				
EPS commercial		840.00		(https://www.saveco.com/catalog/product/view/id/240210/s/s29042097/category/3397/)
Xanthan Gum				
(227g)				

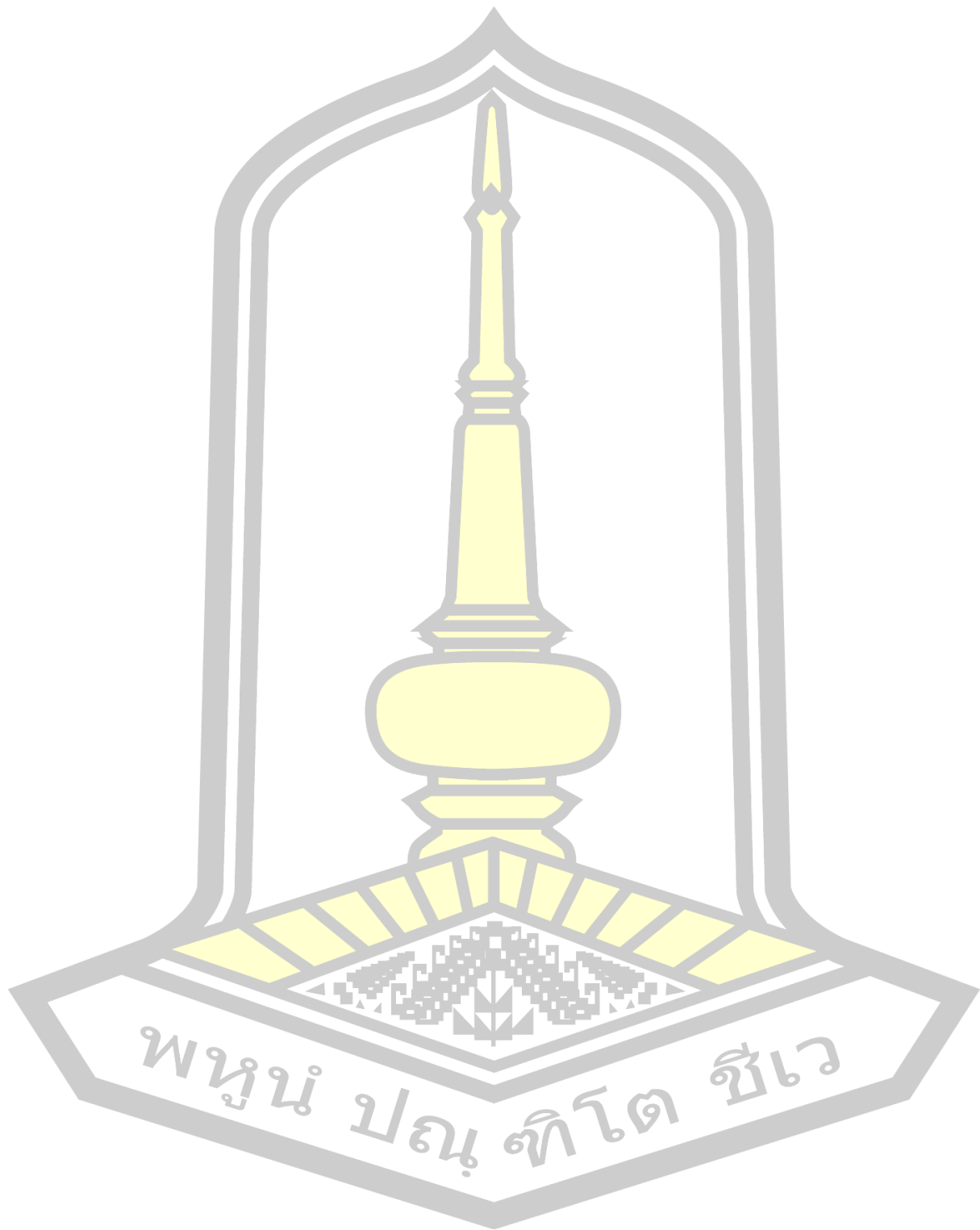
บทที่ 5

บทสรุป

จากการศึกษาผลของข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลืองต่อการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *B. tequilensis* PS21 โดยมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้นำเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) มาใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ผลการทดลอง สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน ที่ใช้ผงข้าวหักไรซ์เบอร์รี่ 5 เปอร์เซ็นต์ แหล่งไนโตรเจน ใช้ผงกากถั่วเหลือง 3 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ใช้เท่ากับ 39 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเท่ากับ 6.66 ส่งผลให้เกิดการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์มากที่สุดเท่ากับ 39.82 ± 0.03 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้สารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงคุณสมบัติการยับยั้งการมีชีวิตรอดและการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง ซึ่งถือได้ว่ารายงานฉบับนี้ให้ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์โดย *Bacillus* sp. สูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้ และต้นทุนของสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเชื่อคิดเป็น 0.25 บาทต่อกรัมเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ อย่างไรก็ตามการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในรายงานฉบับนี้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานที่ผ่านมาในการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ ถือว่าสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า ในอนาคตอาจจะมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปพัฒนาและศึกษาวิจัยต่อยอดเกี่ยวกับการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในถังชีวภาพในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อที่จะสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์และการทำให้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เช่น อาหารคน อาหารสัตว์ เครื่องดื่มสุขภาพ เครื่องสำอาง เป็นต้น และเป็นวิธีใหม่ในการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวหักไรซ์เบอร์รี่และกากถั่วเหลือง

พูน ปณ ศิโต ชีเว

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2557). ข้าวไรซ์เบอร์รี่ สืบค้นเมื่อ 20 มีนาคม 2562, จาก <http://dna.kps.ku.ac.th>.
- ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และพงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์, การออกแบบและวิเคราะห์การทดลอง Design and analysis of experiments, กรุงเทพฯ : ท็อป, 2551
- Abd hul, K., Ganesh, M., Shanmughapriya, S., Kanagavel, M., Anbarasu, K., & Natarajaseenivasan, K. (2014). International Journal of Biological Macromolecules Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain Enterococcus faecium (BDU7) from Ngari. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.026>
- Afzal, M. (2014). Optimization of water absorbing exopolysaccharide production on local cheap substrates by Bacillus strain CMG1403 using one variable at a time approach. *Journal of Microbiology*, 52(1), 44-52.
- Ariga, H. I., Urashima, T. A., Michihata, E. I., ITO, M. A., Morizono, N. O., Kimura, T. S., & Takahashi, S. E. (1992). Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus saejivarius subsp. thermophilus* OR 901 isolated from commercial yogurt. *Journal of Food Science*, 57(3), 625-628.
- Asai, T. (1968). Acetic acid bacteria; classification and biochemical activities.
- Asgher, M., Urooj, Y., Qamar, S. A., & Khalid, N. (2020). Improved exopolysaccharide production from *Bacillus licheniformis* MS3: optimization and structural/functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 984-992. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.094>
- Bajpai, V. K., Rather, I. A., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., ... & Park, Y. H. (2016). Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(1), 1-23. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i1.23819>
- Banerjee, A., Rudra, S. G., Mazumder, K., Nigam, V., & Bandopadhyay, R. (2018). Structural and functional properties of exopolysaccharide excreted by a novel

- Bacillus anthracis* (Strain PFAB2) of hot spring origin. *Indian Journal of Microbiology*, 58(1), 39-50. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0699-4>
- Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., & Ielpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 145-152.
- Bergmaier, D., Champagne, C. P., & Lacroix, C. (2003). Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 1049-1057. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02084>.
- Bomfim, V. B., Neto, J. H. P. L., Leite, K. S., de Andrade Vieira, É., Iacomini, M., Silva, C. M., ... & Cardarelli, H. R. (2020). Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003. *LWT*, 127, 109349. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109349>
- Brown, G. D., & Gordon, S. (2005). Immune recognition of fungal β -glucans. *Cellular Microbiology*, 7(4), 471-479. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x>
- Byrom, D. (1991). *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Springer.
- Cao, C., Liu, Y., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, Y., Wu, R., & Wu, J. (2020). Structural characterization and antioxidant potential of a novel exopolysaccharide produced by *Bacillus velezensis* SN-1 from spontaneously fermented Da-Jiang. *Glycoconjugate Journal*, 37(3), 307-317. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09923-1>
- Cerning, J. C. M. C., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., & Topisirovic, L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 3914-3919.

- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.10.004>
- Cheng, Y., Xiao, X., Li, X., Song, D., Lu, Z., Wang, F., & Wang, Y. (2017). Characterization, antioxidant property and cytoprotection of exopolysaccharide-capped elemental selenium particles synthesized by *Bacillus paralicheniformis* SR14. *Carbohydrate polymers*, 178, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.124>
- Choudhuri, I., Khanra, K., Pariya, P., Maity, G. N., Mondal, S., Pati, B. R., & Bhattacharyya, N. (2020). Structural Characterization of an Exopolysaccharide Isolated from *Enterococcus faecalis*, and Study on its Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Against HeLa Cells. *Current Microbiology*, 77(10), 3125-3135. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02130-z>
- Cimmino, A., Cinelli, T., Evidente, M., Masi, M., Mugnai, L., Silva, M. A., ... & Evidente, A. (2016). Phytotoxic fungal exopolysaccharides produced by fungi involved in grapevine trunk diseases. *Natural Product Communications*, 11(10), 1934578X1601101015. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101015>
- Couso, R.O., Ielpi, L., Garcia, R.C., & Dankert, M.A. (1982). Biosynthesis of polysaccharides in *Acetobacter xylinum*: Sequential synthesis of a heptasaccharide diphosphate prenol. *European Journal of Biochemistry*, 123(3), 617-627.
- Crescenzi, V. (1995). Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnology Progress*, 11(3), 251-259.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 153-177.
- Deepak, V., Ramachandran, S., Balahmar, R. M., Pandian, S. R. K., Sivasubramaniam, S. D., Nellaiah, H., & Sundar, K. (2016). In vitro evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52(2), 163-173. <https://doi.org/10.1007/s11626-015-9970-3>

- Dinić, M., Pecikoza, U., Djokić, J., Stepanović-Petrović, R., Milenković, M., Stevanović, M., ... & Lukić, J. (2018). Exopolysaccharide produced by probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 reduces inflammatory hyperalgesia in rats. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1.
- Draper, X.L. & Lin, D.K.J. (1990). Small response-surface designs. *Tecnometrics*, 32(2)187-194.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El-Deeb, N. M. El, Yassin, A. M., Madboly, L. A. Al, & Hawiet, A. El. (2018). A novel purified *Lactobacillus acidophilus* molecularly regulates both apoptotic and NF- KB inflammatory pathways in human colon cancer. *Microbial Cell Factories*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0877->
- Ergene, E., & Ayşe, A. V. C. I. (2018). Effects of cultural conditions on exopolysaccharide production by *Bacillus* sp. ZBP4. *Journal of Agricultural Sciences*, 24(3), 386-393. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.456666>
- Ermiş, E., Poyraz, E., Dertli, E., & Yılmaz, M. T. (2020). Optimization of exopolysaccharide production of *Lactobacillus brevis* E25 using RSM and characterization. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(1), 151-160. <https://doi.org/10.16984/sofenbilder.545929>
- Farag, M. M., Moghannem, S. A., Shehabeldine, A. M., & Azab, M. S. (2020). Antitumor effect of exopolysaccharide produced by *Bacillus mycoides*. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103947. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103947>
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. (2014). Bacterial polysaccharides: production and applications in cosmetic industry. *Polysaccharides*. Springer International Publishing, Cham, 1-24.

- Galanakis C M. (2017). Bioactive compounds are defined as components of food that influence physiological or cellular activities in the animals or humans that consume them. *Nutraceutical and Functional Food Components*, 2017.
- Gilani, S. L., Heydarzadeh, H. D., Mokhtarian, N., Alemian, A., & Kolaei, M. (2011). Effect of preparation conditions on xanthan gum production and rheological behavior using cheese whey by *Xanthomonas campestris*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(10), 855-859.
- Glasel, J., (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280 absorbance ratios. *Biotechniques* 18: 62–63.
- Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3), 174-179. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140303.16>
- Han, Y. W., & Watson, M. A. (1992). Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. *Journal of Industrial Microbiology*, 9(3), 257-260.
- Hao, Y., Huang, Y., Chen, J., Li, J., Yuan, Y., Wang, M., ... & Shen, C. (2020). Exopolysaccharide from *Cryptococcus heimaeyensis* S20 induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via ROS/p38 and ROS/ERK signalling. *Cell Proliferation*, 53(8), e12869. <https://doi.org/10.1111/cpr.12869>
- Hu, X., Li, D., Qiao, Y., Wang, X., Zhang, Q., Zhao, W., & Huang, L. (2020). Purification, characterization and anticancer activities of exopolysaccharide produced by *Rhodococcus erythropolis* HX-2. *International Journal of Biological macromolecules*, 145, 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.228>
- Hua, X., Wu, Z., Zhang, H., Lu, D., Wang, M., Liu, Y., & Liu, Z. (2010). Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an

- exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere*, 80(8), 951-956.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.002>
- Hussein, M. H., Abou-ElWafa, G. S., Shaaban-Dessuuki, S. A., & Hassan, N. I. (2015). Characterization and antioxidant activity of exopolysaccharide secreted by *Nostoc carneum*. *International Journal Pharmacol*, 11(5), 432-439.
- Insulkar, P., Kerkar, S., & Lele, S. S. (2018). Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1441-1450.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.147>
- Jia, X., Dong, L., Yang, Y., Yuan, S., Zhang, Z., & Yuan, M. (2013). Preliminary structural characterization and antioxidant activities of polysaccharides extracted from Hawk tea (*Litsea coreana* var. *lanuginosa*). *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.005>
- Kanmani, P., Suganya, K., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Paari, K. A., & Arul, V. (2013). Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of fish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(3), 1001-1015.
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-0074-1>
- Karlapudi AP, Kodali VP, Kota KP, Shaik SS, Sampath Kumar NS, Dirisala VR (2016) Deciphering the effect of novel bacterial exopolysaccharide-based nanoparticle cream against *Propionibacterium acnes*. *3Biotech*, 6(1): 35.
<http://doi.org/10.1007/s13205-015-0359-5>
- Kimmel, S. A., Roberts, R. F., & Ziegler, G. R. (1998). Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*RR Grown in a Semidefined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 659-664.
- Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Yamaguchi, T., Kumano, N., & Adechi, S. (1991). Antitumoral Activity of Slime-forming, Encapsulated *Lctococcus lactis* subsp.

- cremoris isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk, "viili". *Nihon Chikusan Gakkaiho* 62(3):277-283.
- Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 232-237. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00033-8)
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., ... & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9), 71-88.
- Küçükaşık, F., Kazak, H., Güney, D., Finore, I., Poli, A., Yenigün, O., ... & Öner, E. T. (2011). Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6), 1729-1740. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3055-8>
- Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M., & Adhikari, D. K. (2011). Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IPE453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. *Journal of Petroleum Technology and Alternative Fuels*, 2(1), 1-6.
- Laws, A., Gu, Y., & Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19(8), 597-625.
- Lee, W. J., & Lucey, J. A. (2004). Structure and physical properties of yogurt gels: Effect of inoculation rate and incubation temperature. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3153-3164. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73450-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73450-5)
- Liang, D., Zhang, N., Zhang, Y., Zhang, T., Lü, L., Wang, Z., & Teng, L. (2012). Response Surface Methodology Used for Statistical Optimization of Fermentation Media of *Cordyceps Militaris*. In *Information Technology and Agricultural Engineering* (pp. 485-491). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Liu, Z., Dong, L., Jia, K., Zhan, H., Zhang, Z., Shah, N. P., ... & Wei, H. (2019). Sulfonation of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 exopolysaccharide amplifies its antioxidant activities in vitro and in a Caco-2 cell model. *Journal of Dairy Science*, 102(7),

5922-5932.<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15831>

- Linton, J.D., Ash, S.G., & Hugbrechts, L. (1991). Microbail Polysaccharide in Biomaterials Novel Materials from Biological Source. (Byrom, D., ed). p. 215-262 Macillan Publisher Ltd., Great Britain.
- Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., & Broadbent, J. R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2147.
- Lu, Y., Xu, L., Cong, Y., Song, G., Han, J., Wang, G., ... & Chen, K. (2019). Structural characteristics and anticancer/antioxidant activities of a novel polysaccharide from *Trichoderma kanganensis*. *Carbohydrate Polymers*, 205, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.068>
- Luang-In, V., & Deeseenthum, S. (2016). Exopolysaccharide-producing isolates from Thai milk kefir and their antioxidant activities. *LWT*, 73, 592-601. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.068>
- Luang-In, V., Saengha, W., & Deeseenthum, S. (2018). Characterization and bioactivities of a novel exopolysaccharide produced from lactose by *Bacillus tequilensis* PS21 isolated from Thai milk kefir. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46(1), 9-17. <https://doi.org/10.4014/mb.1712.12018>
- Luang-In, V., Deeseenthum, S., Udomwong, P., Saengha, W., & Gregori, M. (2018). Formation of sulforaphane and iberin products from Thai cabbage fermented by myrosinase-positive bacteria. *Molecules*, 23(4), 955. <https://doi.org/10.3390/molecules23040955>
- Ma, W., Chen, X., Wang, B. O., Lou, W., Chen, X., Hua, J., ... & Peng, T. (2018). Characterization, antioxidativity, and anti-carcinoma activity of exopolysaccharide extract from *Rhodotorula mucilaginosa* CICC 33013. *Carbohydrate Polymers*, 181, 768-777. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.080>
- Manochai, P., Phimolsiripol, Y., & Seesuriyachan, P. (2014). Response surface optimization of exopolysaccharide production from sugarcane juice by

- Lactobacillus confusus* TISTR 1498. Chiang Mai University. *Journal. National. Science*, 13(1), 425-438. <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2014.0046>
- Meng, Y., Ying, Z., Xiang, Z., Hao, D., Zhang, W., Zheng, Y., ... & Ying, X. (2016). The anti-inflammation and pharmacokinetics of a novel alkaloid from *Portulaca oleracea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(3), 397-405. <https://doi.org/10.1111/jphp.12526>
- Masaoka, S., Ohe, T., & Sakota, N. (1993). Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 75(1), 18-22.
- Moghannem, S. A., Farag, M., Shehab, A. M., & Azab, M. S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 452-462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>
- Mohamed, S. S., Amer, S. K., Selim, M. S., & Rifaat, H. M. (2018). Characterization and applications of exopolysaccharide produced by marine *Bacillus altitudinis* MSH2014 from Ras Mohamed, Sinai, Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2018.05.009>
- Montgomery, D. C., & Mastrangelo, C. M. (1991). Some statistical process control methods for autocorrelated data. *Journal of Quality Technology*, 23(3), 179-193. <https://doi.org/10.1080/00224065.1991.11979321>
- Montgomery, D. C. (1991). Design and analysis of experiments. 3rd edition. New York: John Wiley & Sons.
- Morillo, J. A., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., & Monteoliva-Sánchez, M. (2006). Production of a metal-binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. *Current Microbiology*, 53(3), 189-193. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0438-7>

- Nagaraj K, Devasya RP, Bhagwath AA (2016) Exopolysaccharide produced by *Enterobacter* sp. YG4 reduces uranium induced nephrotoxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 557-561. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.020>
- Naik, M. M., Pandey, A., & Dubey, S. K. (2012). Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. *Biodegradation*, 23(5), 775-783. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9552-y>
- Nery, T. B. R., Cruz, A. J. G. D., & Druzian, J. I. (2013). Use of green coconut shells as an alternative substrate for the production of xanthan gum on different scales of fermentation. *Polímeros*, 23, 602-607.
- Ngampuak, V., Laothong, S., Tachaapikoon, C., Pason, P., Laohakunjit, N., Ratanakhanokchaim, K., & Waeonukul, R. (2018). Isolation of Exopolysaccharide Producing Bacteria from Thai Traditional Fermented Soybean. *Thai Journal of Agricultural Science* 49(2) (Suppl.): 1-4.
- Nguyen, D. T., & Nguyen, T. H. (2015). Detection on antioxidant and cytotoxicity activities of exopolysaccharides isolated in plant-originated *Lactococcus lactis*. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 7(1), 33-38.
- Nichols, C. M., Guezennec, J., & Bowman, J. P. (2005). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Marine biotechnology*, 7(4), 253-271. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-5118-2>
- Nouha, K., Hoang, N. V., Song, Y., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. (2016). Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Cloacibacterium normanense* isolated from wastewater sludge for sludge settling and dewatering. *Journal of Civil & Environmental Engineering*, 05(06). <https://doi.org/10.4172/2165-784x.1000191>

- Ogidi, C. O., Ubaru, A. M., Ladi-Lawal, T., Thonda, O. A., Aladejana, O. M., & Malomo, O. (2020). Bioactivity assessment of exopolysaccharides produced by *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture with different agro-waste residues. *Heliyon*, 6(12), e05685. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05685>
- Pace, M. M., Sullivan, J. J., Elliott, F. I., Graham, E. F., & Coulter, G. H. (1981). Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in. 5-ml French straws. *Journal of Animal Science*, 53(3), 693-701.
- Park, Y. H., Kim, H. K., Kim, H. S., Lee, H. S., Shin, I. S., & Whang, K. Y. (2002). Effects of three different soybean meal sources on layer and broiler performance. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15(2), 254-265.
- Pau-Roblot, C., Lequart-Pillon, M., Apanga, L., Pilard, S., Courtois, J., & Pawlicki-Jullian, N. (2013). Structural features and bioremediation activity of an exopolysaccharide produced by a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated in the Chernobyl exclusion zone. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.025>
- Peng, Y., Zhang, L., Zeng, F., & Kennedy, J. F. (2005). Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma tsugae* mycelium. *Carbohydrate Polymers*, 59(3), 385-392. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.10.009>
- Pérez-Ramos A, Mohedano ML, López P, Spano G, Fiocco D, Russo P, Capozzi V (2017) In situ β -glucan fortification of cereal-based matrices by *Pediococcus parvulus* 2.6: technological aspects and prebiotic potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7): 1588. <http://doi.org/10.3390/ijms18071588>
- Pirog, T. P., Ivakhniuk, M. O., & Voronenko, A. A. (2016). Exopolysaccharides synthesis on industrial waste. *Biotechnologia Acta*, 9(2). <https://doi.org/10.15407/biotech9.02.007>

- Poli, A., Kazak, H., Gurleyendag, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Oner, E.T., Nicolaus, B., 2009. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas* species growing on defined media. *Carbohydrat. Polymer.* 78, 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.031>
- Prathima, P. C., Lule, V. K., Tomar, S. K. & Singh, A. K. (2014). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* NCDC191 by response surface methodology. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5): 835-854.
- Ramamoorthy, S., Gnanakan, A., Lakshmana, S. S., Meivelu, M., & Jeganathan, A. (2018). Structural characterization and anticancer activity of extracellular polysaccharides from ascidian symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Carbohydrate Polymers*, 190, 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.047>
- Ran, H., Zhang, J., Gao, Q., Lin, Z., & Bao, J. (2014). Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1-12.
- Rani, R. P., Anandharaj, M., Sabhapathy, P., & Ravindran, A. D. (2017). Physiochemical and biological characterization of novel exopolysaccharide produced by *Bacillus tequilensis* FR9 isolated from chicken. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.122>
- Razack, S. A., Velayutham, V., & Thangavelu, V. (2013). Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turkish Journal of Biology*, 37(3), 280-288. <https://doi.org/10.3906/biy-1206-50>
- Saelim, K and Maneerat, S (2019). Optimization of Exopolysaccharide Production by *Weissella confusa* NH02 by Taguchi Method. Proceedings of the Seoul International Conference on Applied Science and Engineering. Seoul, Korea.
- Salama, B. M., Hassan, M. E., AR, D., Hassanein, N. M., Helmy, W. A., & Esawy, M. A. (2018). Chemical Characterization of Levan and Optimization of immobilized *Bacillus tequilensis* levansucrase onto K-Carrageenan–CMC Gel

- Beads. *Egyptian Journal of Chemistry*, 61(5), 857-866.
<https://doi.org/10.21608/ejchem.2018.3839.1331>
- Sanalibaba, P., & Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Open Access*, 2(1000115).
<https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>
- Santi, L. P., Dariah, A., & Goenadi, D. H. (2018). Increased mineral soil aggregate stability by exopolysaccharide producing bacteria. *Tower Estates*, 76(2), 93-103.
- Sasikumar, K., Vaikkath, D. K., Devendra, L., & Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152-1156.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.075>
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., & Techapun, C. (2011). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 33(4).
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Chaiyaso, T., & Leksawasdi, N. (2012). Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(5), 912– 917.
<https://doi.org/10.1271/bbb.110905>
- Sellami, M., Oszako, T., Miled, N., & Ben Rebah, F. (2015). Industrial wastewater as raw material for exopolysaccharide production by *Rhizobium leguminosarum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 407-413.
- Seo, E. J., Yoo, S. H., Oh, K. W., Cha, J., Lee, H. G., & Park, C. S. (2004). Isolation of an exopolysaccharide-producing bacterium, *Sphingomonas* sp. CS101, which forms an unusual type of sphingan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(5), 1146-1148. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1146>.
- Sheng, G. P., Yu, H. Q., & Yu, Z. (2005). Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. *Applied*

Microbiology and Biotechnology, 67(1), 125–130.

<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1704-5>

Singh, S. U. R. E. N. D. R. A., Sharma, V. I. N. N. I., Soni, M. L., & Das, S. H. I. P. R. A. (2011). Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 486-496.

Smiderle, F. R., Olsen, L. M., Ruthes, A. C., Czelusniak, P. A., Santana-Filho, A. P., Sasaki, G. L., ... & Iacomini, M. (2012). Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 368-376.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.063>

Song, X., Zhang, X., Kuang, C., Zhu, L., & Guo, N. (2007). Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 42(10), 1391-1397. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.014>

Song, Y. R., Song, N. E., Kim, J. H., Nho, Y. C., & Baik, S. H. (2011). Exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* strains isolated from Kimchi. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57(3), 169-175.

Soponronnarit, S., Wetchacama, S., Swasdisevi, T., & Poomsa-ad, N. (1999). Managing moist paddy by drying, tempering and ambient air ventilation. *Drying Technology*, 17(1-2), 335-343.

Spanò, C., Gugliandolo, V., Lentini, T.L., Maugeri, G., Anzelmo, A., Poli, B., Nicolaus, A novel EPS-producing strain of *Bacillus licheniformis* isolated from a shallow vent off Panarea Island (Italy). *Current Microbiology*, 67(1), 21-29.
<https://doi.org/10.1007/s00284-013-0327-4>.

Steele, C., Rapaka, R. R., Metz, A., Pop, S. M., Williams, D. L., Gordon, S., Kolls, J. K., & Brown, G. D. (2005). The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 1(4), 0323–0334.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010042>

- Subair, H., Mu'minah, Baharuddin, Darwisah, B., & Fahrudin. (2015). Isolation and Screening of Exopolysaccharide Producing Bacterial (EPS) from Potato Rhizosphere for Soil Aggregation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(6), 341–349. Retrieved from <http://www.ijcmas.com>.
- Sun, N., Liu, H., Liu, S., Zhang, X., Chen, P., Li, W., ... & Tian, W. (2018). Purification, preliminary structure and antitumor activity of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CH9. *Molecules*, 23(11), 2898. <https://doi.org/10.3390/molecules23112898>
- Sutherland, I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16(1), 41-46.
- Sutherland, I. W. (1999). Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 38(4), 319-328.
- Sutherland, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663-674.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Suhaniza, H. J., Lai, C. C., Norazalina, S., & Roselina, K. (2013). Antioxidant properties and antiproliferative effect of brewers' rice extract (temukut) on selected cancer cell lines. *International Food Research Journal*, 20(5), 2117.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Huynh, K., Heshu, S. R., Yeap, S. K., Hazilawati, H., & Roselina, K. (2015). Water extract of brewers' rice induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activation of caspase-3 and caspase-8 and downregulates the Wnt/ β -catenin downstream signaling pathway in brewers' rice-treated rats with azoxymethane-induced colon carcinogenesis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0730-4>
- Tipson, R. S., Isbell, H. S., & Stewart, J. E. (1959). *Infrared Absorption Spectra of Some Cyclic Acetals of Sugars*. 62(6), 257–282.
- Torres, C. A., Marques, R., Ferreira, A. R., Antunes, S., Grandfils, C., Freitas, F., & Reis, M. A. (2014). Impact of glycerol and nitrogen concentration on *Enterobacter* A47

growth and exopolysaccharide production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 81-86.

Upadhyay, K. H., Vaishnav, A. M., Tipre, D. R., Patel, B. C., & Dave, S. R. (2017). Kinetics and mechanisms of mercury biosorption by an exopolysaccharide producing marine isolate *Bacillus licheniformis*. *3 Biotech*, 7(5), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0958-4>

Van Den Berg, D. J. C. G., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M., Vreeker, R., Kamerling, J. P., ... & Verrips, C. T. (1995). Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and Characterization of the Polysaccharide. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2840-2844. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2840-2844.1995>

Venkatesh, P., Balraj, M., Ayyanna, R., Ankaiah, D., & Arul, V. (2016). Physicochemical and biosorption properties of novel exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis*. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 606-614. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.005>

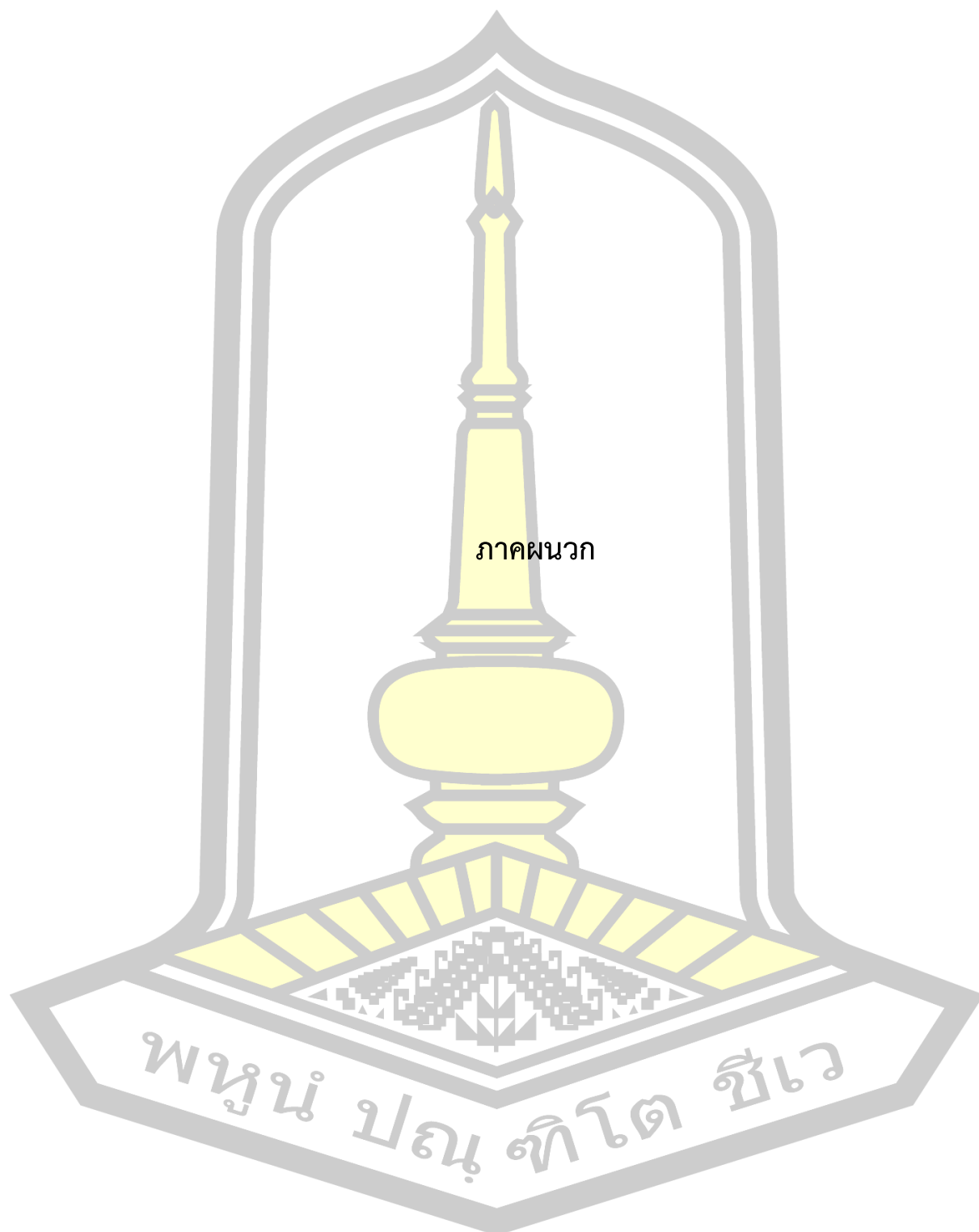
Valepyn, E., Berezina, N., & Paquot, M. (2012). Optimization of production and preliminary characterization of new exopolysaccharides from *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524. *2012(December)*, 488-496. <https://doi.org/10.4236/aim.2012.24062>

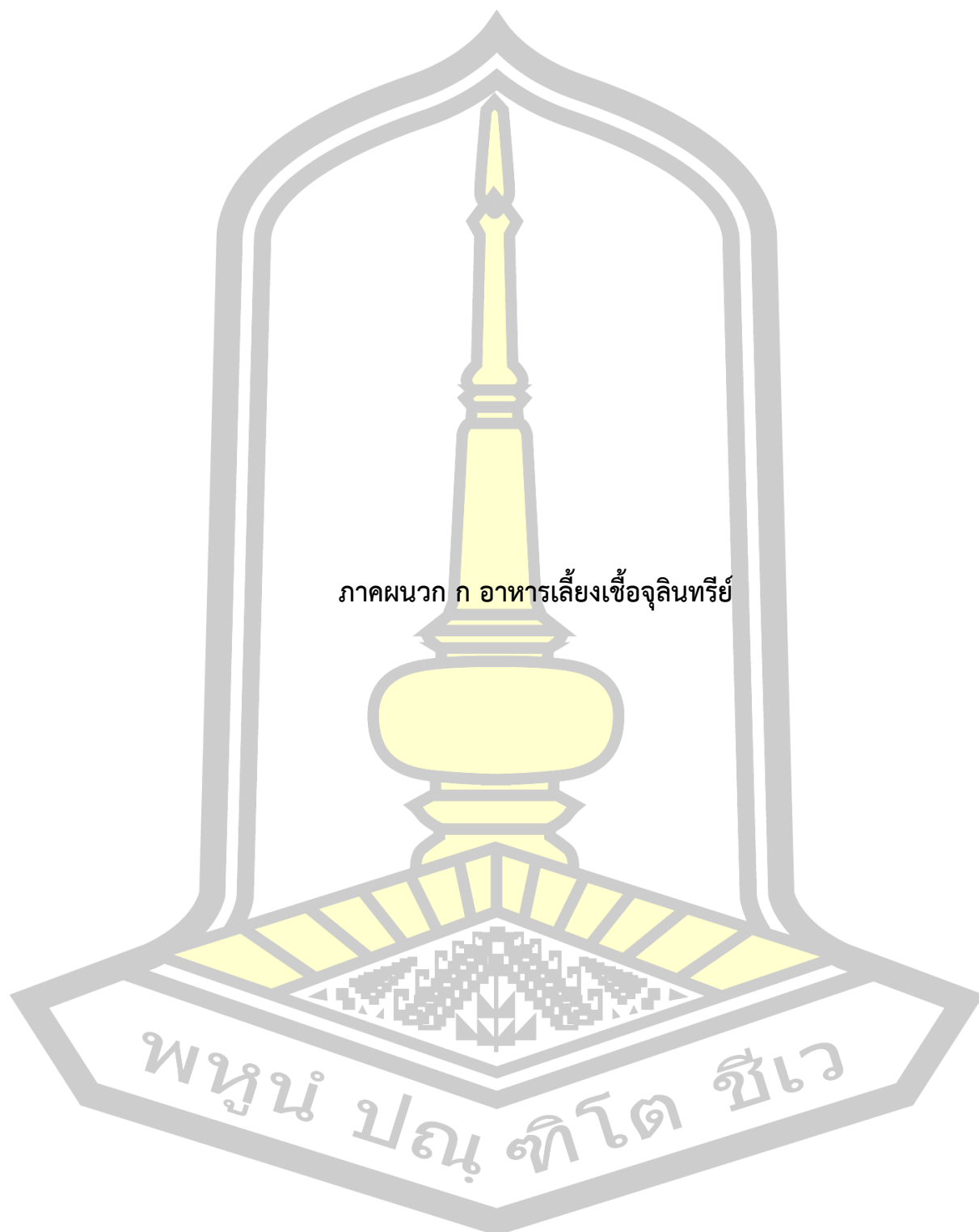
Wang, L., Xie, B., Shi, J., Xue, S., Deng, Q., Wei, Y., & Tian, B. (2010). Physicochemical properties and structure of starches from Chinese rice cultivars. *Food Hydrocolloids*, 24(2-3), 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.007>

Wei, J., Miao, H., & Wang, Q. (2011). Effect of glucose on glucosinolates, antioxidants and metabolic enzymes in Brassica sprouts. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 535-540. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.04.026>

Wei, Z., Huang, S., Zhang, Y., Li, H., & Zhou, S. (2017). Characterization of extracellular polymeric substances produced during nitrate removal by a thermophilic bacterium *Chelatococcus daeguensis* TAD1 in batch cultures. *RSC Advances*, 7(70), 44265-44271. <https://doi.org/10.1039/c7ra08147b>

- Wu, Q., Tun, H. M., Leung, F. C. C., & Shah, N. P. (2014). Genomic insights into high exopolysaccharide-producing dairy starter bacterium *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Scientific reports*, 4(1), 1-8.
- Wu, Z., Wang, G., Pan, D., Guo, Y., Zeng, X., Sun, Y., & Cao, J. (2016). Inflammation-related pro-apoptotic activity of exopolysaccharides isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Beneficial Microbes*, 7(5), 761–768. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0192>
- Xu, L., Tao, X., Gao, Y., Zhang, W., Meng, Y., Li, C., Jiang, M., & Ying, X. (2017). Cytotoxicity of hydroxydihydrobovolide and its pharmacokinetic studies in portulaca oleracea l. Extract. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(2), 1–9. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000216093>
- Yang H, Deng J, Yuan Y, Fan D, Zhang Y, Zhang R, et al. 2015. Two novel exopolysaccharides from *Bacillus amyloliquefaciens* C-1: Antioxidation and effect on oxidative stress. *Current Microbiology*, 70 : 298 - 306 . <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0717-2>
- Zhang, L., Tu, Z. C., Yuan, T., Wang, H., Xie, X., & Fu, Z. F. (2016). Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from *Ipomoea batatas* leaves identified by bioassay-guided approach and structure-activity relationships. *Food Chemistry*, 208, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.079>
- Zhou, X., Hong, T., Yu, Q., Nie, S., Gong, D., Xiong, T., & Xie, M. (2017). Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 induce c-Jun dependent Fas/FasL-mediated apoptosis via TLR2 in mouse intestinal epithelial cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14178-2>





อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptone	20	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
NaCl	5	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.5	

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. Gifu Anaerobic Broth (GAM Broth)

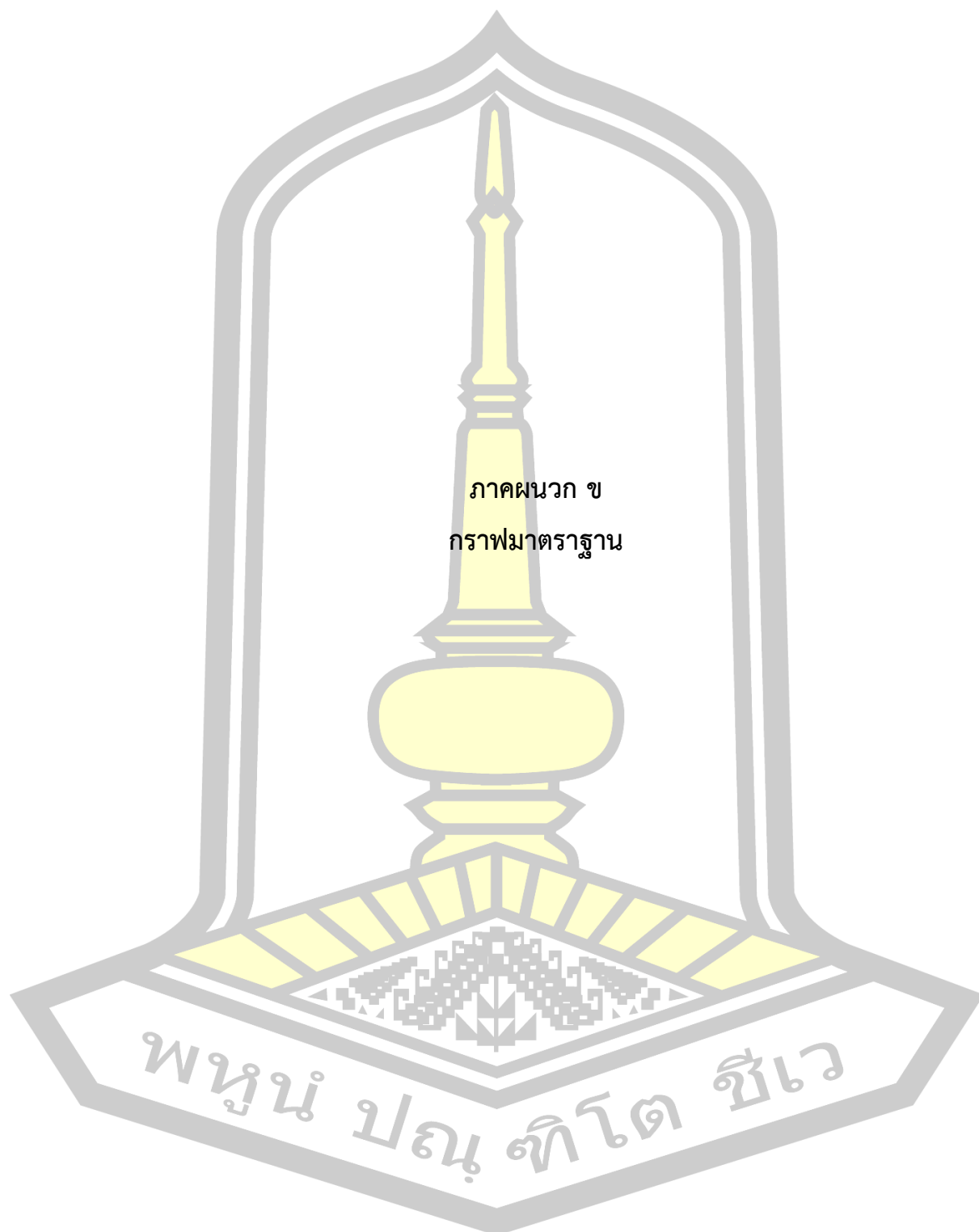
Peptic digest of animal tissue	10.0	กรัม
Papaic digest of soyabean meal	3.0	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Digested serum	13.5	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Beef extract	2.2	กรัม
Liver extract	1.2	กรัม
Dextrose	3.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.5	กรัม
NaCl	3.0	กรัม

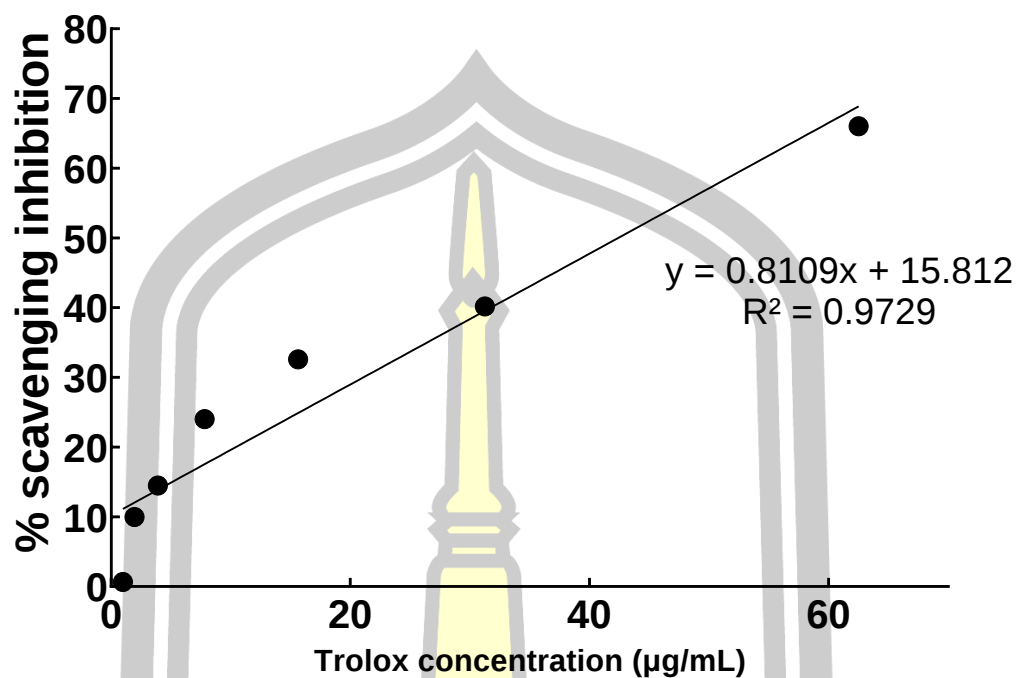
Starch, Soluble	5.0	กรัม
L-Cysteine hydrochloride	0.3	กรัม
$C_2H_4O_2S$	0.3	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.3	

ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

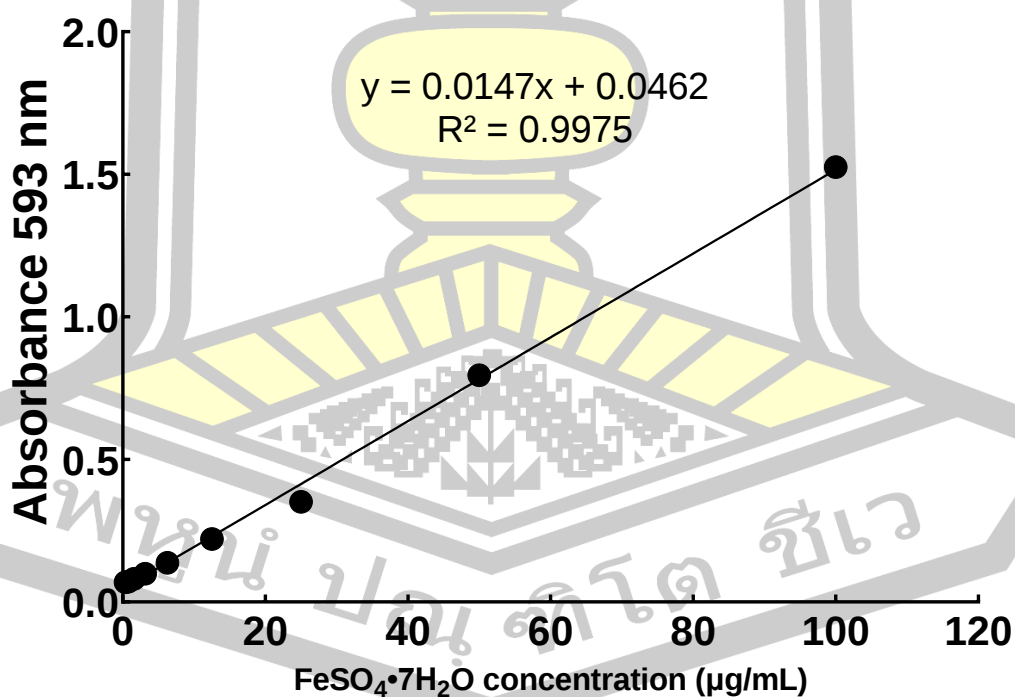
3. Lactobacillus MRS Broth (MRS)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
$C_6H_{11}NO_7$	2.0	กรัม
$C_2H_3NaO_2$	5.0	กรัม
$MgSO_4$	0.10	กรัม
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.05	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH	6	

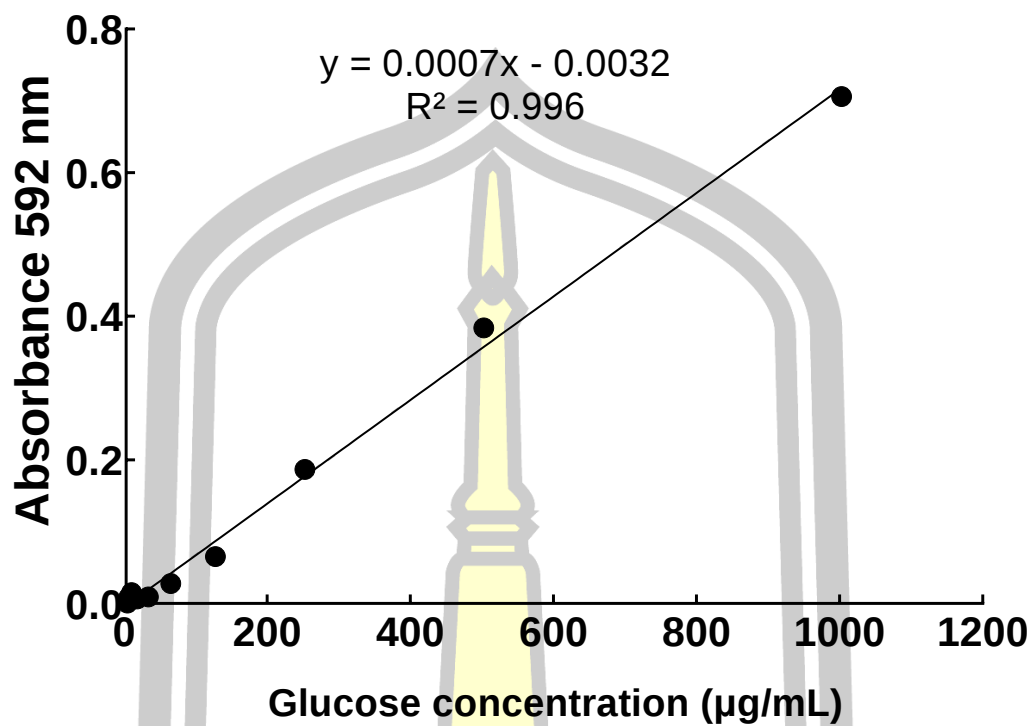




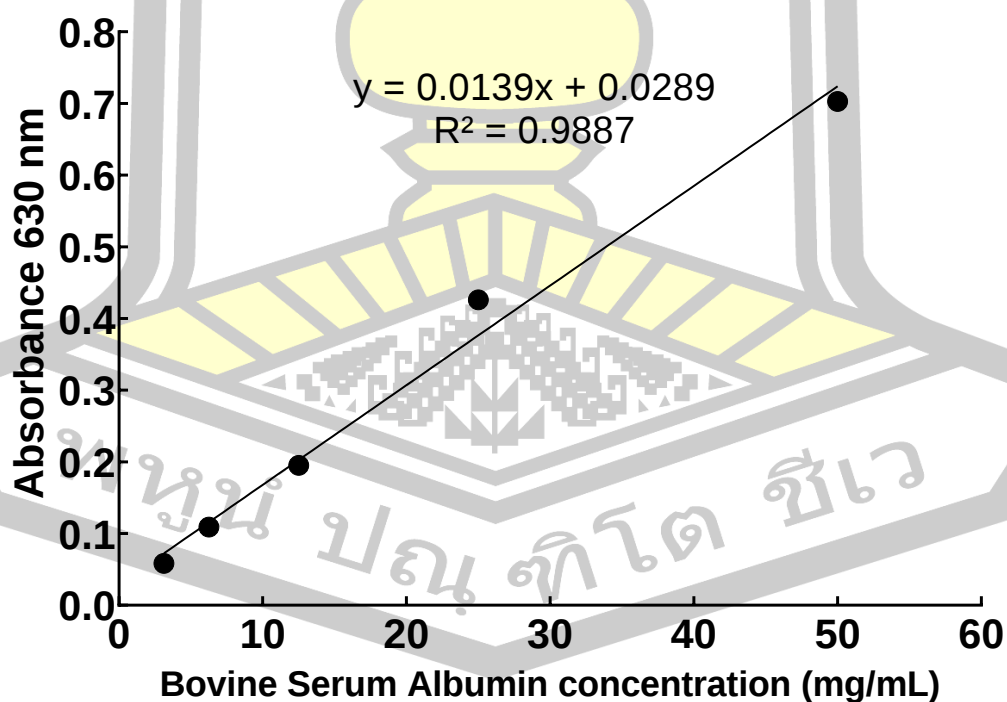
ภาพที่ 23 กราฟของสารมาตรฐานโทรลล๊อกซ์ (Trolox)



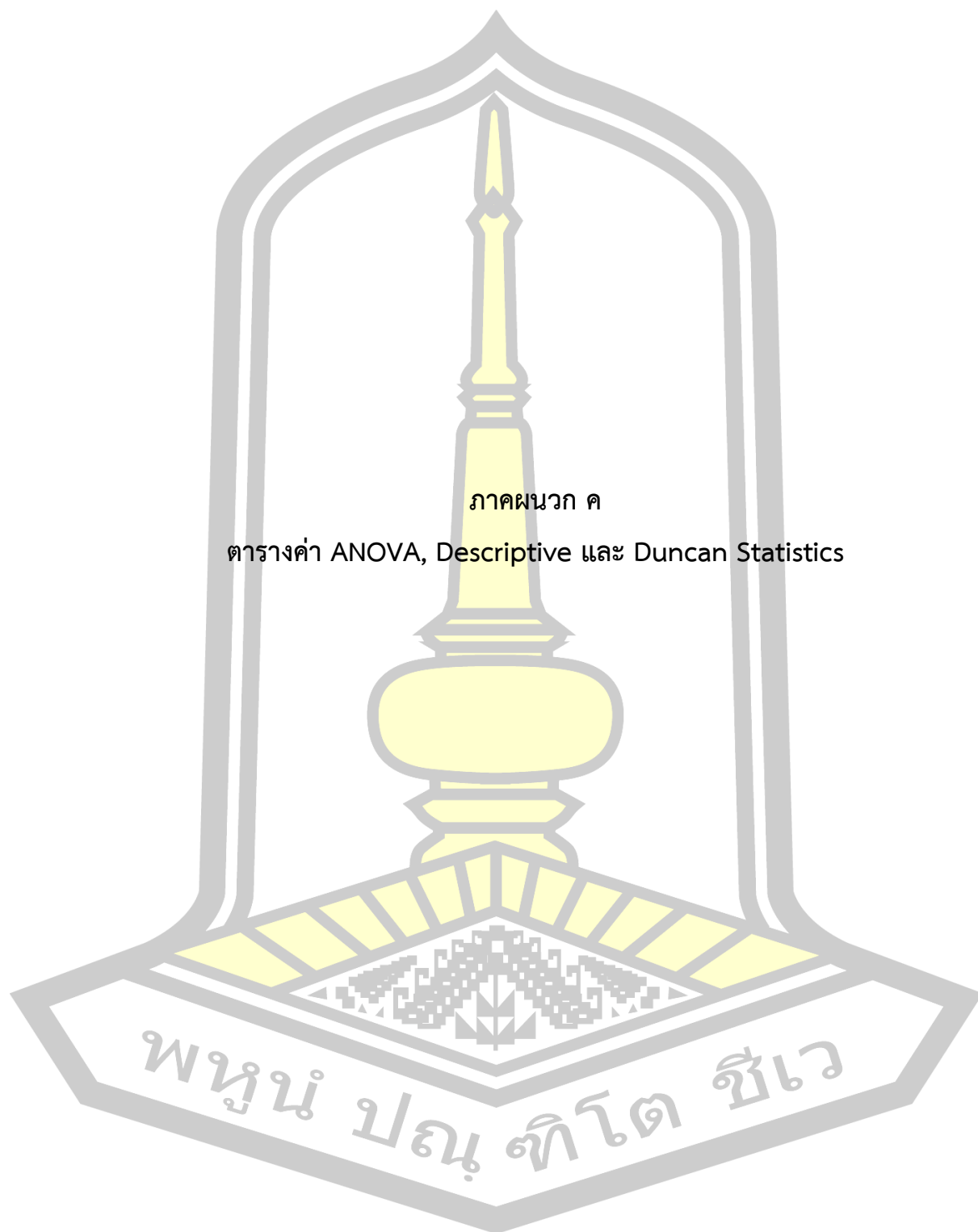
ภาพที่ 24 กราฟของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)



ภาพที่ 25 กราฟของสารมาตรฐานกลูโคส



ภาพที่ 26 กราฟของสารมาตรฐานโปรตีนซีรัมอัลบูมิน



ตารางที่ 20 Descriptive ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
DPPH	EPS	3	1.4394	.00541	.00312	1.4260	1.4528	1.43	1.44
	C1								
	EPS	3	1.3176	.00541	.00312	1.3041	1.3310	1.31	1.32
	C2								
	EPS	3	1.9860	.00937	.00541	1.9627	2.0093	1.98	2.00
	C3								
FRAP	EPS	3	1.0458	.01082	.00625	1.0189	1.0727	1.04	1.06
	C4								
	Total	12	1.4472	.35744	.10319	1.2201	1.6743	1.04	2.00
	EPS	3	1.2489	.00403	.00233	1.2389	1.2589	1.24	1.25
	C1								
	EPS	3	1.1308	.03747	.02163	1.0378	1.2239	1.09	1.17
	C2								
	EPS	3	1.2454	.04253	.02455	1.1397	1.3510	1.20	1.29
	C3								
	EPS	3	1.0447	.04568	.02637	.9312	1.1581	.99	1.08
	C4								
	Total	12	1.1674	.09437	.02724	1.1075	1.2274	.99	1.29

ตารางที่ 21 ANOVA ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DPPH	Between Groups	1.405	3	.468	7110.667	.000
	Within Groups	.001	8	.000		
	Total	1.405	11			
FRAP	Between Groups	.087	3	.029	21.910	.000
	Within Groups	.011	8	.001		
	Total	.098	11			

ตารางที่ 22 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
EPS C4	3	1.0458			
EPS C2	3		1.3176		
EPS C1	3			1.4394	
EPS C3	3				1.9860
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 23 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากสารสกัดหยาบ
เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
EPS C4	3	1.0447		
EPS C2	3		1.1308	
EPS C3	3			1.2454
EPS C1	3			1.2489
Sig.		1.000	1.000	.909

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 24 Descriptive ขององค์ประกอบชีวเคมีจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
DNS	EPS	3	4.514	.21429	.1237	3.982	5.046	4.30	4.73
	C1	3	2.061	.25085	.1448	1.438	2.685	1.80	2.30
	EPS	3	5.800	.07143	.0412	5.622	5.977	5.73	5.87
	C2	3	3.442	.12372	.0714	3.135	3.750	3.37	3.59
	C3	3	3.954	1.4443	.4169	3.037	4.872	1.80	5.87
	C4	3	3.954	1.4443	.4169	3.037	4.872	1.80	5.87
	Total	12	3.954	1.4443	.4169	3.037	4.872	1.80	5.87

Phenol	EPS		549.1	14.699	8.487	512.6	585.6		
	C1	3	316	97	03	149	484	540.64	566.11
	EPS		372.1	5.2906	3.054	359.0	385.2		
	C2	3	460	8	58	032	888	368.94	378.25
	EPS		591.1	10.039	5.796	566.2	616.0		
	C3	3	528	00	02	145	911	585.36	602.74
	EPS		361.5	3.0475	1.759	354.0	369.1		
	C4	3	889	5	51	184	595	358.07	363.35
	Tot		468.5	107.65	31.07	400.1	536.9		
	al	12	048	518	737	040	057	358.07	602.74
Protein	EPS		11.31		.2080	10.41	12.20		
	C1	3	06	.36031	3	55	56	10.90	11.59
	EPS		4.715		.2395	3.685	5.746		
	C2	3	8	.41484	1	3	3	4.28	5.11
	EPS		25.13		.4387	23.24	27.02		
	C3	3	55	.75995	6	77	33	24.43	25.94
	EPS		15.69		.1268	15.15	16.24		
	C4	3	90	.21979	9	31	50	15.51	15.94
	Tot		14.21	7.7591	2.239	9.285	19.14		
	al	12	52	3	87	3	51	4.28	25.94
DNA	EPS		56.94	3.3678	1.944	48.57	65.31		
	C1	3	44	8	44	82	07	55.00	60.83
	EPS		55.83	1.4433	.8333	52.24	59.41		
	C2	3	33	8	3	78	89	55.00	57.50
	EPS		86.66	2.8867	1.666	79.49	93.83		
	C3	3	67	5	67	56	78	85.00	90.00
	EPS		185.5	8.0937	4.672	165.4	205.6		
	C4	3	556	8	95	495	616	176.67	192.50
	Tot		96.25	55.523	16.02	60.97	131.5		
	al	12	00	79	834	19	281	55.00	192.50

ตารางที่ 25 ANOVA ขององค์ประกอบชีวเคมีจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DNS	Between Groups	22.689	3	7.563	234.053	.000
	Within Groups	.259	8	.032		
	Total	22.947	11			
Phenol	Between Groups	126777.717	3	42259.239	477.304	.000
	Within Groups	708.299	8	88.537		
	Total	127486.017	11			
Protein	Between Groups	660.389	3	220.130	949.093	.000
	Within Groups	1.855	8	.232		
	Total	662.244	11			
DNA	Between Groups	33737.269	3	11245.756	515.455	.000
	Within Groups	174.537	8	21.817		
	Total	33911.806	11			

พหุ ประสิทธิภาพ ชีว

ตารางที่ 26 Duncan ขององค์ประกอบของน้ำตาลรีดิวซ์จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
EPSC2	3	2.0619			
EPSC4	3		3.4429		
EPSC1	3			4.5143	
EPSC3	3				5.8000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 27 Duncan ขององค์ประกอบของน้ำตาลทั้งหมดจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
EPSC4	3	361.5889		
EPSC2	3	372.1460		
EPSC1	3		549.1316	
EPSC3	3			591.1528
Sig.		.207	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

พหุ ประสิทธิภาพ

ตารางที่ 28 Duncan ขององค์ประกอบของโปรตีนจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
EPSC2	3	4.7158			
EPSC1	3		11.3106		
EPSC4	3			15.6990	
EPSC3	3				25.1355
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 29 Duncan ขององค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
EPSC2	3	55.8333		
EPSC1	3	56.9444		
EPSC3	3		86.6667	
EPSC4	3			185.5556
Sig.		.778	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.



ตารางที่ 30 Descriptive ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
HepG2 1600 ug/ml 24 h	3	80.3139	5.99602	3.46180	65.4189	95.2088	73.39	83.78
800 ug/ml 24 h	3	91.4686	4.78756	2.76410	79.5756	103.3615	86.31	95.78
400 ug/ml 24 h	3	95.0073	5.56926	3.21541	81.1725	108.8421	88.85	99.70
200 ug/ml 24 h	3	108.4699	7.75458	4.47711	89.2064	127.7333	101.08	116.55
100 ug/ml 24 h	3	103.7003	10.25986	5.92353	78.2134	129.1872	91.85	109.62
50 ug/ml 24 h	3	106.3159	2.13192	1.23086	101.0199	111.6119	103.85	107.55
0 ug/ml 24 h	3	100.0077	5.46304	3.15409	86.4367	113.5786	93.70	103.16
1600 ug/ml 48 h	3	45.8406	16.52451	9.54043	4.7914	86.8898	36.30	64.92
800 ug/ml 48 h	3	90.7504	18.13666	10.47120	45.6965	135.8044	69.81	101.22
400 ug/ml 48 h	3	96.4514	18.70081	10.79692	49.9960	142.9068	74.87	107.85
200 ug/ml 48 h	3	113.3217	13.36456	7.71603	80.1223	146.5211	98.08	123.04
100 ug/ml 48 h	3	111.7510	12.27279	7.08570	81.2637	142.2383	97.91	121.29
50 ug/ml 48 h	3	111.5183	21.74089	12.55211	57.5110	165.5257	86.56	126.35
0 ug/ml 48 h	3	100.0000	1.38521	.79975	96.5589	103.4411	98.95	101.57
Total	42	96.7798	19.70853	3.04109	90.6382	102.9214	36.30	126.35

HT29	1600 ug/ml	3	72.3199	3.84650	2.22078	62.7646	81.8751	67.94	75.16
	24 h								
	800 ug/ml	3	74.4534	4.07432	2.35231	64.3322	84.5745	69.75	76.81
	24 h								
	400 ug/ml	3	80.6897	4.40468	2.54304	69.7479	91.6315	77.30	85.67
	24 h								
	200 ug/ml	3	87.3090	1.72906	.99827	83.0138	91.6042	85.50	88.95
	24 h								
	100 ug/ml	3	97.2653	.66326	.38293	95.6177	98.9129	96.50	97.65
	24 h								
	50 ug/ml 24	3	105.6899	4.86012	2.80599	93.6166	117.7631	101.09	110.78
	h								
	0 ug/ml 24	3	100.0005	3.38066	1.95182	91.6025	108.3986	96.17	102.57
	h								
	1600 ug/ml	3	48.9196	.79761	.46050	46.9382	50.9010	48.14	49.73
	48 h								
	800 ug/ml	3	49.6635	1.46611	.84646	46.0214	53.3055	48.57	51.33
	48 h								
	400 ug/ml	3	56.5710	2.18909	1.26387	51.1330	62.0090	54.09	58.24
	48 h								
	200 ug/ml	3	61.7783	5.63264	3.25201	47.7860	75.7705	55.47	66.31
	48 h								
	100 ug/ml	3	68.8275	2.97619	1.71830	61.4342	76.2208	67.06	72.26
	48 h								
	50 ug/ml 48	3	76.9394	1.11962	.64641	74.1581	79.7207	75.88	78.11
	h								
	0 ug/ml 48	3	100.0354	1.87208	1.08085	95.3849	104.6859	98.51	102.13
	h								
	Total	42	77.1759	18.71687	2.88808	71.3433	83.0085	48.14	110.78
A549	1600 ug/ml	3	86.2327	1.91311	1.10454	81.4803	90.9852	84.02	87.34
	24 h								
	800 ug/ml	3	87.8501	.68325	.39448	86.1528	89.5474	87.46	88.64
	24 h								
	400 ug/ml	3	87.3373	1.43483	.82840	83.7730	90.9016	85.68	88.17
	24 h								

HeLa	200 ug/ml	3	87.4951	1.09321	.63116	84.7794	90.2107	86.86	88.76
	24 h								
	100 ug/ml	3	89.9803	.95656	.55227	87.6041	92.3565	88.88	90.53
	24 h								
	50 ug/ml 24	3	89.5464	1.98144	1.14398	84.6242	94.4685	88.40	91.83
	h								
	0 ug/ml 24	3	100.0789	.47828	.27613	98.8908	101.2670	99.53	100.36
	h								
	1600 ug/ml	3	65.3646	.31574	.18229	64.5802	66.1489	65.00	65.55
	48 h								
	800 ug/ml	3	77.3177	2.34549	1.35417	71.4912	83.1442	74.61	78.67
	48 h								
	400 ug/ml	3	73.6719	3.65354	2.10938	64.5960	82.7478	69.45	75.78
	48 h								
	200 ug/ml	3	77.0833	1.53359	.88542	73.2737	80.8930	75.31	77.97
	48 h								
	100 ug/ml	3	74.7656	2.02975	1.17188	69.7235	79.8078	73.59	77.11
	48 h								
	50 ug/ml 48	3	78.2813	1.89443	1.09375	73.5752	82.9873	76.09	79.38
	h								
	0 ug/ml 48	3	99.7917	6.31477	3.64583	84.1049	115.4784	92.50	103.44
	h								
HeLa	Total	42	83.9141	9.88767	1.52570	80.8328	86.9953	65.00	103.44
	1600 ug/ml	3	68.6490	11.31810	6.53451	40.5333	96.7648	62.11	81.72
	24 h								
	800 ug/ml	3	70.9985	8.52037	4.91924	49.8328	92.1643	66.08	80.84
	24 h								
	400 ug/ml	3	79.2217	4.83245	2.79001	67.2173	91.2262	76.43	84.80
	24 h								
	200 ug/ml	3	88.6197	3.17924	1.83554	80.7220	96.5174	86.78	92.29
	24 h								
	100 ug/ml	3	97.1366	1.14453	.66079	94.2934	99.9797	96.48	98.46
	24 h								
HeLa	50 ug/ml 24	3	97.5771	1.52604	.88106	93.7862	101.3680	95.81	98.46
	h								

0 ug/ml 24 h	3	100.0000	2.67056	1.54185	93.3660	106.6340	96.92	101.54
1600 ug/ml 48 h	3	65.6818	8.66025	5.00000	44.1686	87.1951	60.68	75.68
800 ug/ml 48 h	3	74.2424	6.56080	3.78788	57.9445	90.5404	70.45	81.82
400 ug/ml 48 h	3	76.6667	4.46134	2.57576	65.5841	87.7493	74.09	81.82
200 ug/ml 48 h	3	83.9394	8.39782	4.84848	63.0780	104.8007	79.09	93.64
100 ug/ml 48 h	3	86.4394	1.70581	.98485	82.2019	90.6769	85.45	88.41
50 ug/ml 48 h	3	94.7727	5.90472	3.40909	80.1046	109.4409	87.95	98.18
0 ug/ml 48 h	3	100.0758	5.37985	3.10606	86.7115	113.4401	93.86	103.18
Total	42	84.5729	12.88476	1.98816	80.5577	88.5881	60.68	103.18



ตารางที่ 31 ANOVA ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
HepG2	Between Groups	11835.039	13	910.388	6.232	.000
	Within Groups	4090.427	28	146.087		
	Total	15925.466	41			
HT29	Between Groups	14078.775	13	1082.983	106.625	.000
	Within Groups	284.393	28	10.157		
	Total	14363.168	41			
A549	Between Groups	3845.734	13	295.826	50.919	.000
	Within Groups	162.674	28	5.810		
	Total	4008.407	41			
HeLa	Between Groups	5766.464	13	443.574	11.940	.000
	Within Groups	1040.232	28	37.151		
	Total	6806.696	41			

พหุ ประสิทธิภาพ

ตารางที่ 32 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1600 ug/ml 48 h	3	45.8406		
1600 ug/ml 24 h	3		80.3139	
800 ug/ml 48 h	3		90.7504	90.7504
800 ug/ml 24 h	3		91.4686	91.4686
400 ug/ml 24 h	3		95.0073	95.0073
400 ug/ml 48 h	3		96.4514	96.4514
0 ug/ml 48 h	3		100.0000	100.0000
0 ug/ml 24 h	3		100.0077	100.0077
100 ug/ml 24 h	3			103.7003
50 ug/ml 24 h	3			106.3159
200 ug/ml 24 h	3			108.4699
50 ug/ml 48 h	3			111.5183
100 ug/ml 48 h	3			111.7510
200 ug/ml 48 h	3			113.3217
Sig.		1.000	.092	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

พหุ ประสิทธิภาพ

ตารางที่ 33 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

HT29									
Duncan									
a									
Sample	N	Subset for alpha = 0.05							
			1	2	3	4	5	6	7
1600 ug/ml 48 h	3	48.9196							
800 ug/ml 48 h	3	49.6635							
400 ug/ml 48 h	3		56.571						
200 ug/ml 48 h	3		61.7783						
100 ug/ml 48 h	3			68.8275					
1600 ug/ml 24 h	3			72.3199	72.3199				
800 ug/ml 24 h	3				74.4534				

50 ug/ml 48 h	3				76.9394	76.9394			
400 ug/ml 24 h	3					80.6897			
200 ug/ml 24 h	3						87.309		
100 ug/ml 24 h	3							97.2653	
0 ug/ml 24 h	3							100.0005	
0 ug/ml 48 h	3							100.0354	
50 ug/ml 24 h	3								105.6899
Sig.		0.777	0.055	0.19	0.103	0.161	1	0.324	1

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

พหุ ประถมศึกษา

ตารางที่ 34 Duncan การยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
1600 ug/ml 48 h	3	65.3646				
400 ug/ml 48 h	3		73.6719			
100 ug/ml 48 h	3		74.7656	74.7656		
200 ug/ml 48 h	3		77.0833	77.0833		
800 ug/ml 48 h	3		77.3177	77.3177		
50 ug/ml 48 h	3			78.2813		
1600 ug/ml 24 h	3				86.2327	
400 ug/ml 24 h	3				87.3373	
200 ug/ml 24 h	3				87.4951	
800 ug/ml 24 h	3				87.8501	
50 ug/ml 24 h	3				89.5464	
100 ug/ml 24 h	3				89.9803	

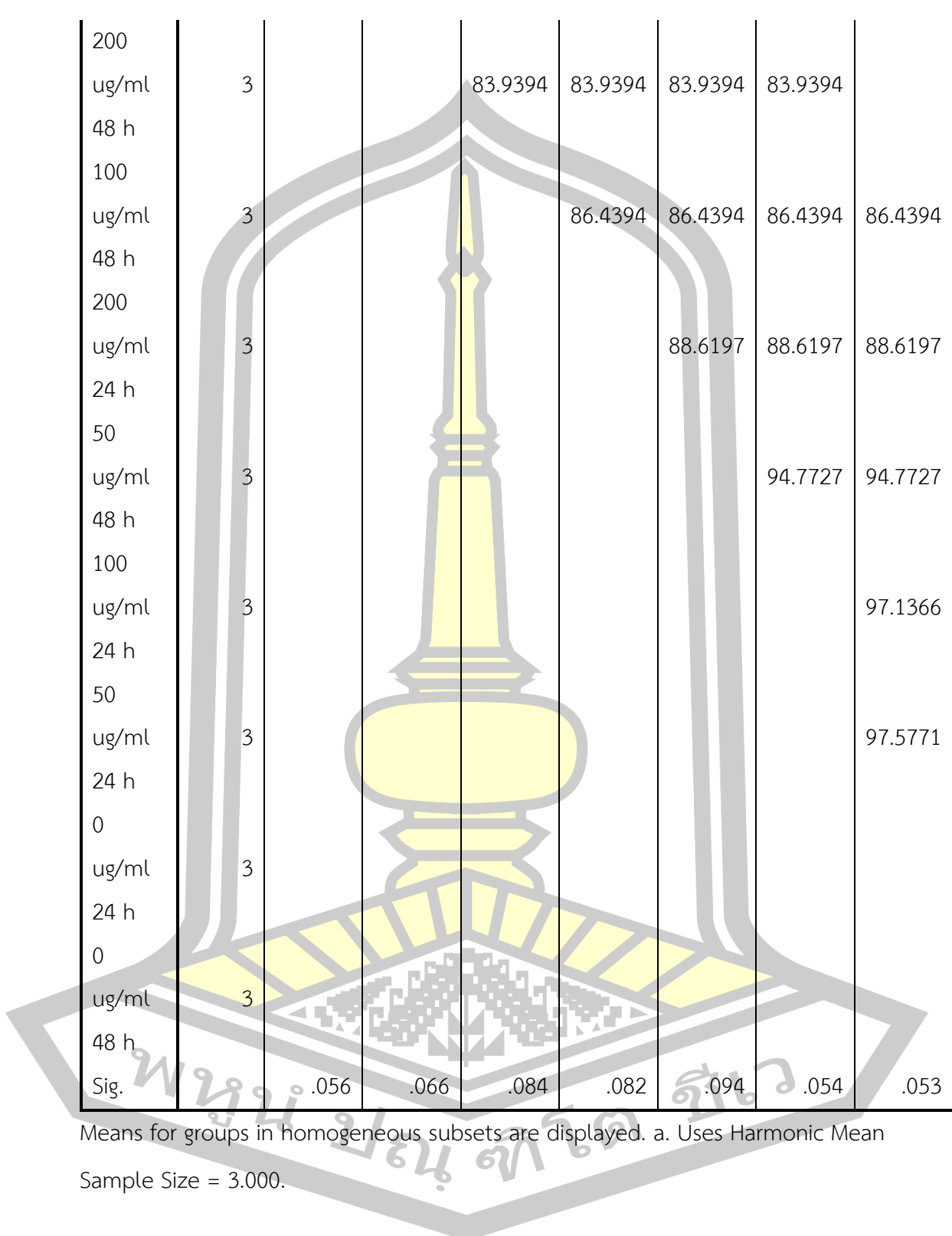
0 ug/ml 48 h	3					99.7917
0 ug/ml 24 h	3					100.0789
Sig.		1.000	.100	.112	.103	.885

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 35 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดจากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1600 ug/ml 48 h	3	65.6818							
1600 ug/ml 24 h	3	68.6490	68.6490						
800 ug/ml 24 h	3	70.9985	70.9985						
800 ug/ml 48 h	3	74.2424	74.2424	74.2424					
400 ug/ml 48 h	3	76.6667	76.6667	76.6667	76.6667				
400 ug/ml 24 h	3		79.2217	79.2217	79.2217	79.2217			



200									
ug/ml	3			83.9394	83.9394	83.9394	83.9394		
48 h									
100									
ug/ml	3				86.4394	86.4394	86.4394	86.4394	
48 h									
200									
ug/ml	3					88.6197	88.6197	88.6197	88.6197
24 h									
50									
ug/ml	3						94.7727	94.7727	94.7727
48 h									
100									
ug/ml	3							97.1366	97.1366
24 h									
50									
ug/ml	3							97.5771	97.5771
24 h									
0									
ug/ml	3								100.0000
24 h									
0									
ug/ml	3								100.0758
48 h									
Sig.		.056	.066	.084	.082	.094	.054	.053	.050

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 36 Descriptive ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Emax) จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
HepG2 24 h	3	19.6861	5.99602	3.46180	4.7912	34.5811	16.22	26.61
HepG2 48 h	3	54.1594	16.52451	9.54043	13.1102	95.2086	35.08	63.70
HT-29 24 h	3	27.6801	3.84650	2.22078	18.1249	37.2354	24.84	32.06
HT-29 48 h	3	51.0804	.79761	.46050	49.0990	53.0618	50.27	51.86
A549 24 h	3	13.7673	1.91311	1.10454	9.0148	18.5197	12.66	15.98
A549 48 h	3	34.6354	.31574	.18229	33.8511	35.4198	34.45	35.00
HeLa 24 h	3	31.3510	11.31810	6.53451	3.2352	59.4667	18.28	37.89
HeLa 48 h	3	34.3182	8.66025	5.00000	12.8049	55.8314	24.32	39.32
Total	24	33.3347	14.93690	3.04898	27.0274	39.6420	12.66	63.70

ตารางที่ 37 ANOVA ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Emax) จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

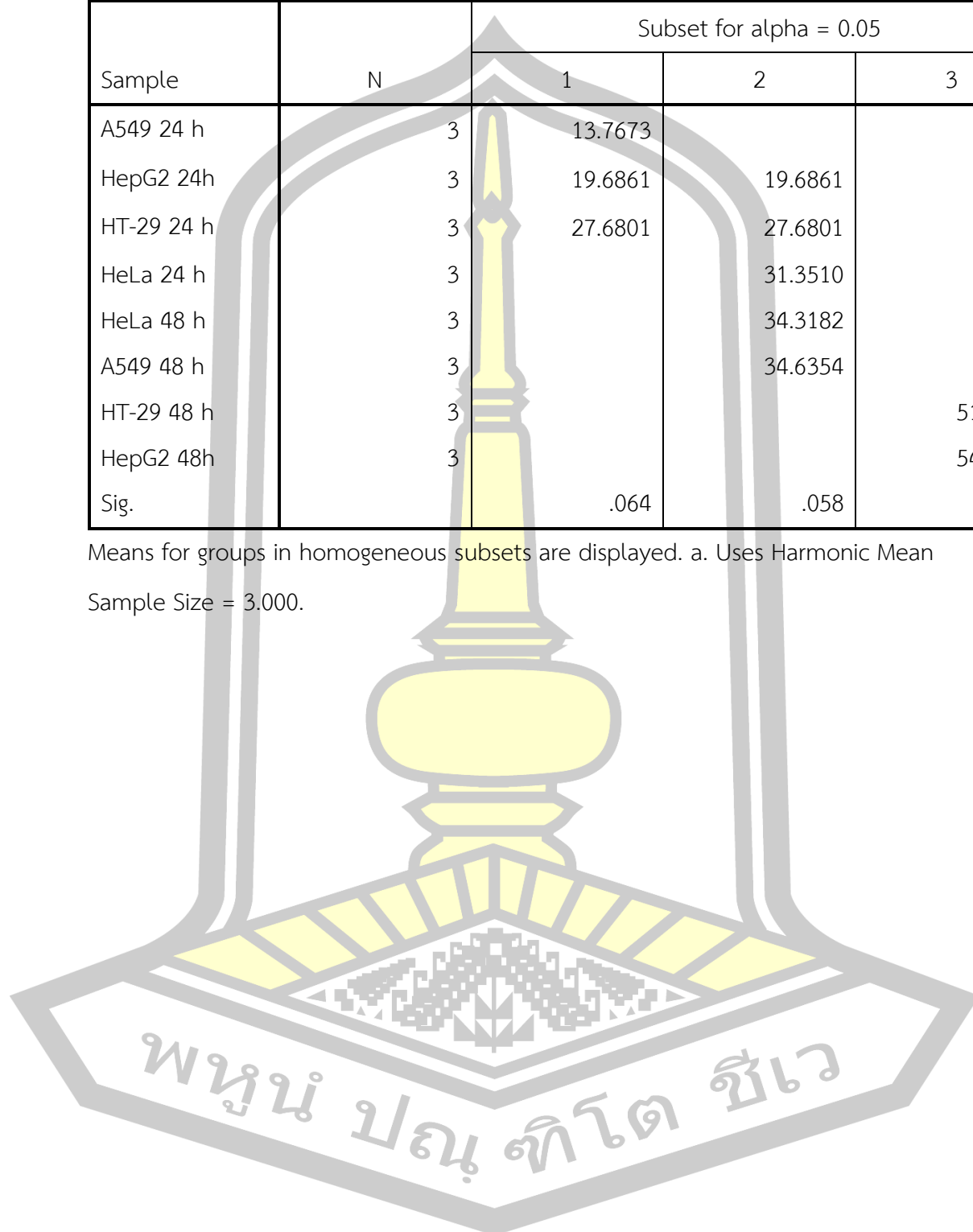
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4068.945	7	581.278	8.752	.000
Within Groups	1062.605	16	66.413		
Total	5131.550	23			

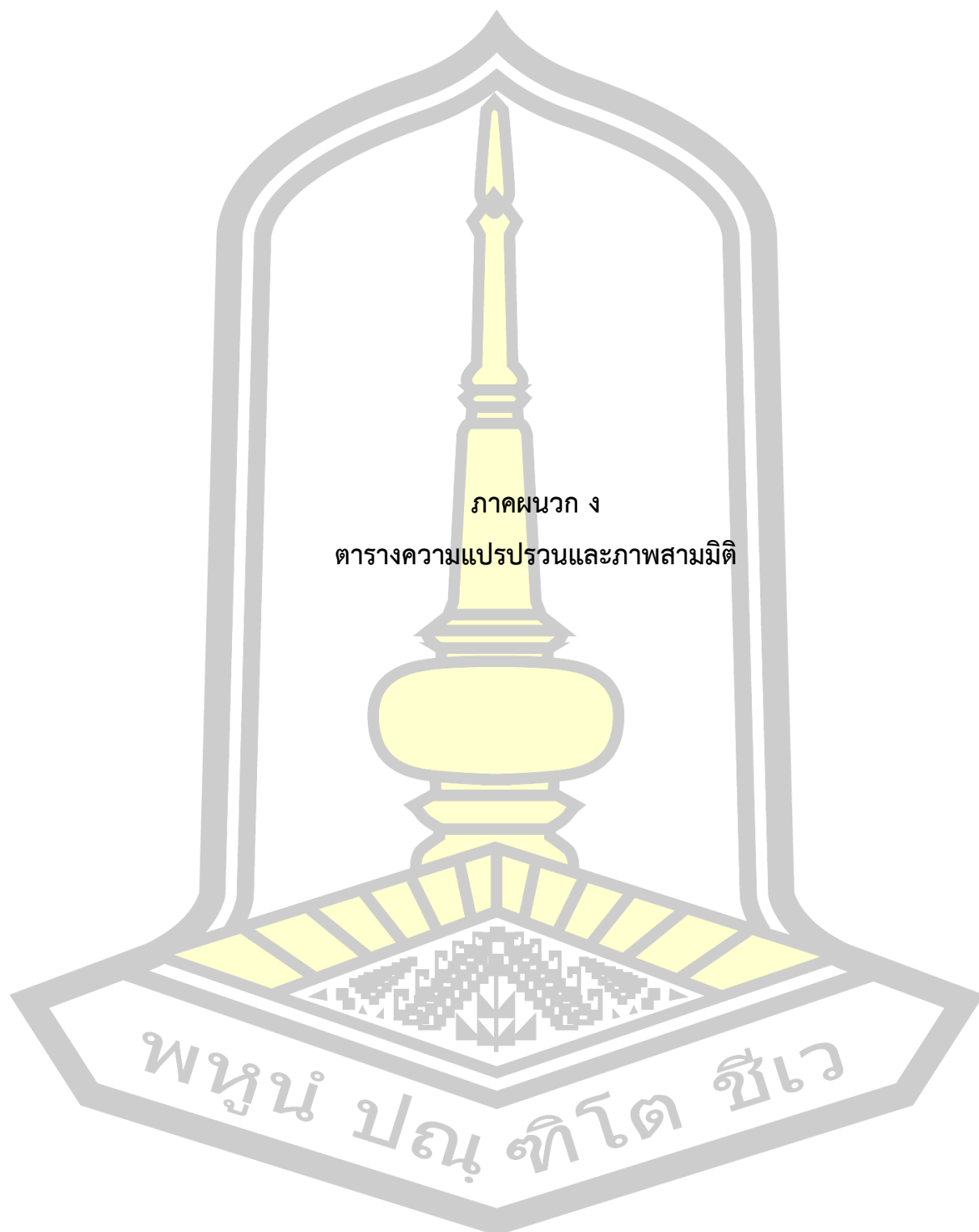
ตารางที่ 38 Duncan ของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Emax) จากสารสกัดหยาบเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์

Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
A549 24 h	3	13.7673		
HepG2 24h	3	19.6861	19.6861	
HT-29 24 h	3	27.6801	27.6801	
HeLa 24 h	3		31.3510	
HeLa 48 h	3		34.3182	
A549 48 h	3		34.6354	
HT-29 48 h	3			51.0804
HepG2 48h	3			54.1594
Sig.		.064	.058	.650

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a. Uses Harmonic Mean

Sample Size = 3,000.





ตารางที่ 39 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21
ที่ 24 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	225.32	14	16.09	4.55	0.0079	significant
A-Carbon	1.85	1	1.85	0.52	0.4843	
B-Nitrogen	20.24	1	20.24	5.72	0.0357	
C-pH	13.60	1	13.60	3.85	0.0756	
D-temp	3.37	1	3.37	0.95	0.3499	
AB	0.21	1	0.21	0.059	0.8127	
AC	2.59	1	2.59	0.73	0.4099	
AD	6.57	1	6.76	1.86	0.2001	
BC	7.01	1	7.01	1.98	0.1867	
BD	1.49	1	1.49	0.42	0.5294	
CD	1.05	1	1.05	0.30	0.5966	
A ²	4.45	1	4.45	1.26	0.2858	
B ²	1.22	1	1.22	0.34	0.5691	
C ²	70.44	1	70.44	19.93	0.0010	
D ²	45.58	1	45.58	12.90	0.0042	
Residual	31.75	11	3.53			
Lack of Fit	27.10	6	3.50			not significant
Pure Error	4.65	5	6.57			
Cor Total	1535.60	25				
Std. Dev.	1.88		R-Squared	0.8528		
			Adj R-Squared			
Mean	13.47		Pred R-Squared	0.6655		
C.V. %	13.96		Squared	0.0027		

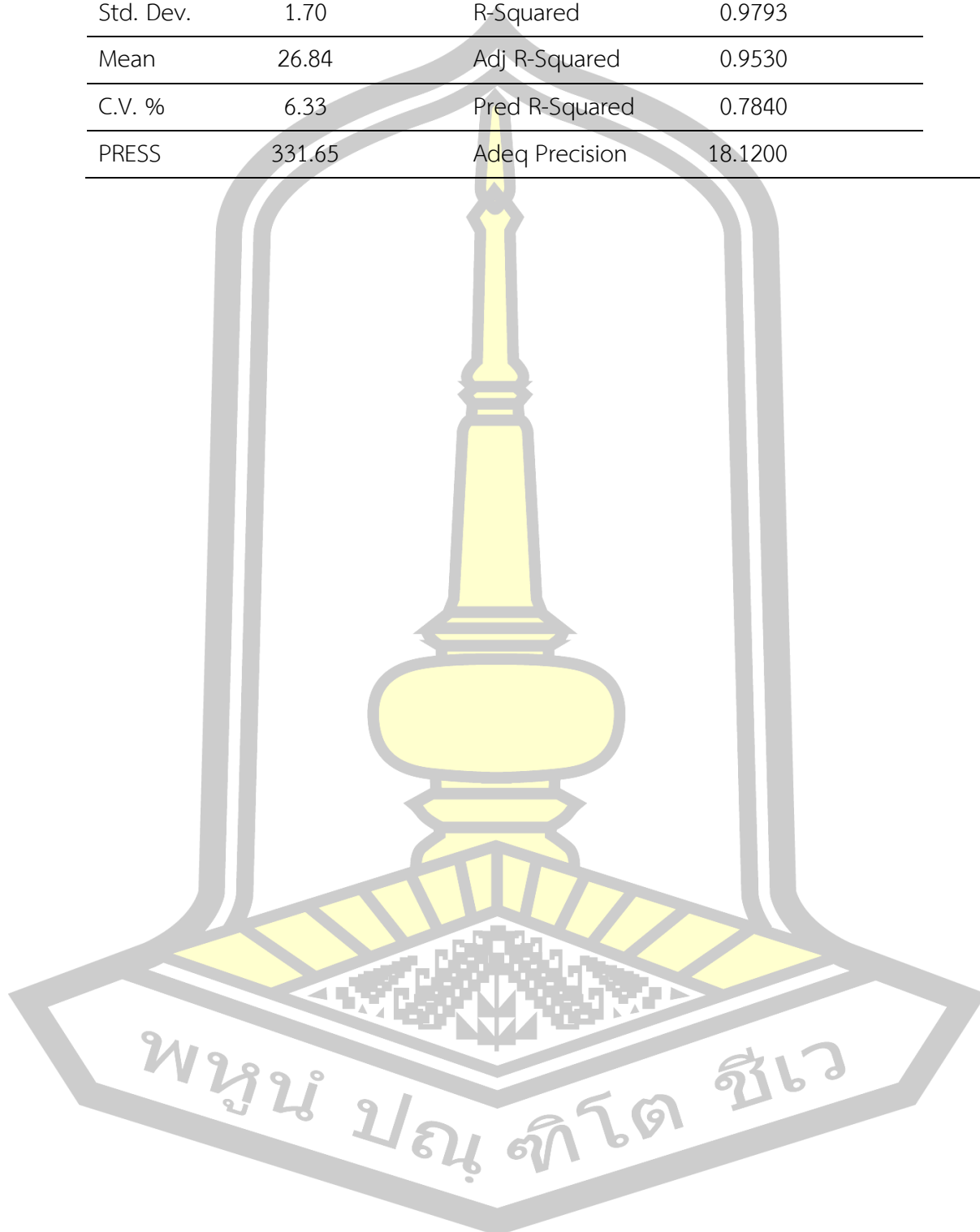
PRESS		263.49		Adeq		Precision		7.486	
ตารางที่ 40 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ <i>B. tequilensis</i> PS21 ที่ 48 ชั่วโมง									
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F				
Model	739.98	14	52.86	22.97	< 0.0001	significant			
A-Carbon	3.60	1	3.60	1.56	0.2371				
B-Nitrogen	60.88	1	60.88	26.46	0.0003				
C-pH	30.53	1	30.53	13.27	0.0039				
D-temp	24.74	1	24.74	10.75	0.0073				
AB	1.29	1	1.29	0.56	0.4704				
AC	2.47	1	2.47	1.07	0.3222				
AD	3.59	1	3.59	1.56	0.2375				
BC	3.82	1	3.82	1.66	0.2238				
BD	11.24	1	11.24	4.88	0.0492				
CD	0.99	1	0.99	0.43	0.5246				
A ²	42.88	1	42.88	18.64	0.0012				
B ²	19.67	1	19.67	8.55	0.0138				
C ²	298.31	1	298.31	129.66	< 0.0001				
D ²	106.29	1	106.29	46.20	< 0.0001				
Residual	25.31	11	2.30						
Lack of Fit	13.67	6	2.28	0.98	0.5199	not significant			
Pure Error	11.64	5	2.33						
Cor Total	765.29	25							
Std. Dev.	1.52		R-Squared	0.9669					

		Adj R-	
Mean	20.39	Squared	0.9248
		Pred R-	
C.V. %	7.44	Squared	0.7572
		Adeq	
PRESS	185.82	Precision	14.174

ตารางที่ 41 ค่าความแปรปรวนของการผลิตเอ็กโซโพลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *B. tequilensis* PS21 ที่ 72 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1503.85	14	107.42	37.21	< 0.0001	significant
A-Carbon	43.09	1	43.09	14.93	0.0026	
B-Nitrogen	188.94	1	188.94	65.46	< 0.0001	
C-pH	28.16	1	28.16	9.75	0.0097	
D-temp	109.28	1	109.28	37.86	< 0.0001	
AB	10.09	1	10.09	3.5	0.0884	
AC	4.80	1	4.8	1.66	0.2236	
AD	18.89	1	18.89	6.55	0.0266	
BC	7.22	1	7.22	2.5	0.1421	
BD	48.45	1	48.45	16.78	0.0018	
CD	0.78	1	0.78	0.27	0.6131	
A ²	67.96	1	67.96	23.54	0.0005	
B ²	102.25	1	102.25	35.42	< 0.0001	
C ²	716.19	1	716.19	248.12	< 0.0001	
D ²	110.67	1	110.67	38.34	< 0.0001	
Residual	31.75	11	2.89			
Lack of Fit	27.10	6	4.52	4.86	0.0518	not significant
Pure Error	4.65	5	0.93			

Cor Total	1535.60	25	
Std. Dev.	1.70	R-Squared	0.9793
Mean	26.84	Adj R-Squared	0.9530
C.V. %	6.33	Pred R-Squared	0.7840
PRESS	331.65	Adeq Precision	18.1200



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวทิพย์ภียะ การ์รัตน์
วันเกิด	วันที่ 3 มิถุนายน พ.ศ. 2538
สถานที่เกิด	อำเภอธวัชบุรี จังหวัดร้อยเอ็ด
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 6 หมู่ 5 ตำบลธวัชบุรี อำเภอธวัชบุรี จังหวัดร้อยเอ็ด รหัสไปรษณีย์ 45170
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนธนาณี พ.ศ. 2560 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2563 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประเภท บัณฑิตศึกษาประจำปี 2563
ผลงานวิจัย	1. Karirat, T *, Saengha, W., Deeseenthum, S. & Luang-In, V. (2021). The 8th International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology (ICoFAB 2021) At: Mahasarakham University, Thailand. DOI: 10.14457/MSU.res.2021.1 2. Khanit Matra, Worachot Saengha, Yottana Tanakaran, Thipphiya Karirat, Benjaporn Buranrat, Sirirat Deeseenthum, Vijitra Luang-In (2021). Effect of Pre-soaking Mustard Green Seeds Prior to Cold Plasma Treatment on Bioactive Aspects of Microgreens. Tropical Journal of Natural Product Research. 5(8):1422-1426 3. Saengha, W, Karirat, T., Buranrat, B., Matra, K., Deeseenthum, S., Katisart, T., & Luang-In, V.* (2021). Cold plasma treatment on mustard green seeds and its effect on growth, isothiocyanates, antioxidant activity and anticancer activity of microgreens. International Journal of Agriculture and Biology. 25(3), 667–676. https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1715 . IF = 0.833 ISI Q3.

4. Luang-In, V.*, Saengha, W., Karirat, T., Buranrat, B., Matra, K., Deeseenthum, S., & Katisart, T. (2021). Effect of cold plasma and elicitors on bioactive contents, antioxidant activity and cytotoxicity of Thai rat-tailed radish microgreens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101(4): 1685–1698.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.10985>. IF = 2.614 ISI Q1.
5. Luang-In, V.*, Saengha, W., Karirat, T., Deeseenthum, S., Buranrat, B., Nudmamud-Thanoi, S., Ma, N.L., & Narbad, A. (2021). Probiotic attributes, GABA-producing capacity and cytotoxic effects of microbes isolated from Thai fermented foods. *International Journal of Agriculture and Biology*. 25(2), 409–419. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1682> IF = 0.833 ISI Q3.
6. Luang-In, V.*, Saengha, W., Karirat, T., Buranrat, B., Nudmamud-Thanoi, S., Ma, N.L., & Narbad, A. (2020). Cytotoxic effects of probiotics *Saccharomyces cerevisiae* TC6 and *Lactobacillus brevis* TBRC 3003 isolated from Thai fermented foods. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 19(11). In Press. IF = 0.503 ISI Q3.
7. Saengha, W. *, Karirat, T., Buranrat, B., Matra, K., Deeseenthum, S. & Luang-In, V. (2019). The 6th International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology (ICoFAB 2019) At: Mahasarakham University, Thailand.
[Doi.10.14457/MSU.res.2019.23](https://doi.org/10.14457/MSU.res.2019.23)
8. Yotchaisarn, M. *, Saengha, W., Karirat, T., Deeseenthum, S., Maneewan, K. & Luang-In, V. (2018). The 5th International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology (ICoFAB 2018) At: Mahasarakham University, Thailand.
[Doi.1014457/MSU.res.2018.31](https://doi.org/10.14457/MSU.res.2018.31)