

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 คุณสมบัติทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 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 เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ด้วย 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 บ่งบอกถึงการมีอยู่ของหมู่ฟังก์ชันของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสัญญาณวิทยาของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า มีพื้นผิวเรียบ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลในเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า ชนิดของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เป็นชนิดเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิด คือ กลูโคส และ โซโลส ในอัตราส่วน 7 : 1

บ่งบอกว่าในทุก ๆ 8 โมโนเมอร์ของน้ำตาลที่มาต่อกัน จะประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส 7 หน่วย และน้ำตาลไซโลส 1 หน่วย องค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตเท่ากับ 591.19 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง โปรตีน 25.13 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และกรดนิวคลีอิก 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

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

AUTHOR Thipphiya Karirat

ADVISORS Assistant Professor Vijitra Luangin, Ph.D
Assistant Professor Sirirat Deeseenthum, Ph.D

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biotechnology

UNIVERSITY Mahasarakham 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 $48.02 \pm 0.15\%$ 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