

บทความวิจัย (Research Article)

การผลิตและศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของ Exopolymeric substances จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ *Rhodopseudomonas palustris* PP803

โตมร นุ่นแก้ว* และ พุทธิพร แก้วมีศรี

Production and antioxidant activities of Exopolymeric substances from phototrophic purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* PP803

Tomorn Nunkaew* and Putthaporn Kaewmeesri

Faculty of Medicine, Princess of Naradhiwas University, Mueang, Narathiwat Province, 96000

* Corresponding to: Tomorn.n@pnu.ac.th

Naresuan Phayao J. 2020;13(3): 29-42.

Received; 1 October 2020; Revised: 23 October 2020; Accepted: 5 November 2020

บทคัดย่อ

แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ (PNSB) เป็นกลุ่มที่น่าสนใจสำหรับใช้เป็นแหล่งผลิต Exopolymeric substances (EPS) เนื่องจากผลิตได้มากและสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย แต่การศึกษาเกี่ยวกับสภาวะสำหรับเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS ยังมีน้อย ประกอบกับปัจจุบัน EPS ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มากขึ้น ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS จาก *Rhodopseudomonas palustris* PP803 และศักยภาพของ EPS ต่อการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ผลการศึกษาด้วย Central Composite Design (CCD) พบว่า Acetate ความเข้มข้น 7.82 กรัมต่อลิตร และ NaCl ความเข้มข้น 1.49 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 62.83 ชั่วโมง ให้ผลผลิต EPS สูงสุด (0.93) นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้น NaCl มีอิทธิพลต่อการผลิต EPS จาก *R. palustris* PP803 มากที่สุด เมื่อทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง พบว่า EPS ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า Fe^{2+} Chelating activity สูงถึง 73.10% อาจเนื่องมาจากมีหมู่ฟังก์ชัน Carboxyl group ในโครงสร้างของ EPS ซึ่งส่งผลให้กระบวนการ Metal chelating เกิดได้ดี ส่งเสริมให้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระอื่นดีไปด้วย ดังนั้นจึงเป็นแนวทางในพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระในอนาคต

คำสำคัญ: การต้านอนุมูลอิสระ Exopolymeric substances แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์

Abstract

Purple non-sulfur photosynthetic bacteria (PNSB) are an interesting microbial group to produce exopolymeric substances (EPS). PNSB is highly productive and used a variety of carbon sources. However, the optimum culture conditions for EPS production are still less studied. In addition, the EPS has been used more in medical applications. Thus, this research aims to study the optimum conditions for EPS production from *Rhodospseudomonas palustris* PP803 and the EPS potential to reduce the effects of free radical activity. According to Central Composite Design (CCD) were revealed 7.82 g/L of acetate, 1.49 g/L of NaCl, and 62.83 hours of culture time result to gain the highest EPS yield (0.93) and show the highest concentration of NaCl influence from the EPS production of PP803. The antioxidant test showed that EPS at a concentration of 4 mg/mL had a Fe^{2+} chelating activity of 73.10% *in vitro*, which may be due to a group of functions. The carboxyl group in EPS structure may result in high metal chelating activity indicated that it is a good antioxidant potential. Therefore, it is a way to develop health products that have the ability to against free radicals in the future.

Keywords: Antioxidant activities, Exopolymeric substances, Purple non-sulfur photosynthetic bacteria

บทนำ

การใช้ชีวิตประจำวันของมนุษย์ในปัจจุบันพบว่ามีความเสี่ยงต่อโรค เช่น การรับประทานอาหารประเภทเนื้อสัตว์เป็นประจำ และร่างกายได้รับมลพิษเป็นสาเหตุให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free radical) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายโครงสร้างของเซลล์ และการทำหน้าที่ของผนังเซลล์ ก่อให้เกิดความผิดปกติ อาทิ โรคชราก่อนวัย โรคหัวใจ ผนังหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis) รวมไปถึงการกลายพันธุ์ (Mutation) ของเซลล์ ซึ่งอาจพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง ดังนั้นร่างกายของมนุษย์จึงมีกลไกในการควบคุมสารเหล่านี้ รวมถึงผลที่เกิดจากอนุมูลอิสระไม่ให้ลุกลาม [1] มีการศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ๆ จากแหล่งที่หลากหลายในธรรมชาติ ทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้พบสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพดีมากมาย โดยเฉพาะสารจากจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถผลิต Exopolymeric substances (EPS) ออกมานอกเซลล์ ยกตัวอย่าง สารในกลุ่ม Polysaccharide ซึ่งมีความหลากหลายทางโครงสร้าง จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก [2] เนื่องจากมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และยังเพาะเลี้ยงได้ในระยะเวลาอันสั้น ให้ปริมาณสารสำคัญสูง รวมถึงต้นทุนการผลิต

ต่ำกว่าชนิดอื่น [3-4] จึงเหมาะสมที่จะเป็นแหล่งผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป

แม้ว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิต EPS ได้ แต่แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์ (PNSB) เป็นกลุ่มที่น่าสนใจสำหรับใช้เป็นแหล่งผลิต EPS เนื่องจากผลิต EPS ได้มาก ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนหลายชนิด แม้ในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น Photoorganotroph และ Chemoorganotroph รวมถึงยังสามารถใช้แสงธรรมชาติเป็นแหล่งพลังงานได้อีกด้วย [5] บัจฉย ดังกกล่าว ทำให้ได้ EPS ที่มีลักษณะของโครงสร้างที่หลากหลาย อีกทั้งยังปรับเปลี่ยนสภาวะเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมและลดต้นทุนได้ง่าย ซึ่งในปัจจุบันได้นำ EPS ที่ผลิตจาก PNSB ไปประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เช่น เป็นวัสดุห่อหุ้มในระบบนำส่งยา (Drug delivery system) [6-7] ซึ่ง EPS ดังกกล่าว มีสมบัติย่อยสลายง่ายตามธรรมชาติและมีผลข้างเคียงน้อยมาก อย่างไรก็ตามความสามารถต้านอนุมูลอิสระรวมถึงคุณสมบัติทางการแพทย์ของ EPS จาก PNSB ในปัจจุบันยังมีการศึกษาอยู่น้อย

จากการศึกษาของผู้วิจัย พบว่า *Rhodospseudomonas palustris* PP803 ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม PNSB ที่แยกได้จากนาข้าวดินเค็มในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย มีความสามารถเจริญได้ดีทั้งสภาวะแบบมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย และแบบไม่มีแสง-มีอากาศ [8] สามารถผลิต EPS ได้ดีในสภาวะที่มี NaCl 1% และเมื่อศึกษาโครงสร้างหลักของ EPS ด้วยเทคนิค GC-MS และ ¹H-NMR พบว่ามี Galacturonic acid เป็นองค์ประกอบสำคัญ [9] ทั้งนี้จากรายงานการวิจัยของ Liu et al. [10] พบว่า EPS จากแบคทีเรียที่มีโครงสร้างหลักที่คล้ายคลึงกันดังกล่าว มีความสามารถดักจับกรรมของสารอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide และ Hydroxyl radical ได้ดี ซึ่งการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่ EPS จาก *R. palustris* PP803 จะมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ด้วยเช่นกัน จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ยิ่งเพิ่มความน่าสนใจเกี่ยวกับ EPS ที่มีโครงสร้างหลักคล้ายกับ EPS จาก PP803 กอปรกับข้อได้เปรียบของ EPS ที่สามารถผลิตได้มากในระยะเวลาดสั้นและต้นทุนที่ต่ำ อย่างไรก็ตามมีรายงานเรื่องสภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น เวลาในการเพาะเลี้ยง ชนิดและอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน ความเข้มข้นของเกลือ มีผลต่อการปริมาณการผลิต EPS [11-12] ซึ่งประเด็นดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาการผลิต EPS ของ *R. palustris* PP803 มาก่อนหน้านี้ จึงนำไปสู่งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS จาก *R. palustris* PP803 และศึกษาศักยภาพของ EPS ต่อกิจกรรมของอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

วัสดุและวิธีการ

1. การคัดเลือกสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS

1.1 เตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 โดยกล้าเชื้อเตรียมได้จากการถ่ายเชื้อจากอาหาร Glutamate-Acetate medium (GA) ซึ่งประกอบด้วย Sodium L-glutamic acid 3.8 กรัม Sodium acetate 5.4 กรัม Yeast extract 4.0 กรัม KH₂PO₄ 0.5 กรัม

K₂HPO₄ 0.5 กรัม (NH₄)₂HPO₄ 0.8 กรัม MgSO₄·7H₂O 0.2 กรัม CaCl₂·2H₂O 0.053 กรัม Nicotinic acid 0.001 กรัม Thiamine hydrochloride 0.001 กรัม Biotin 0.01 กรัม MnSO₄·5H₂O 0.012 กรัม Ferric citrate 0.025 กรัม และ CoCl₂·6H₂O 0.95 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 mL และปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 6.8 ใช้กล้าเชื้อ 10% เลี้ยงในสภาวะมีอากาศเล็กน้อย-มีแสง ประมาณ 3500±200 ลักซ์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ

1.2 การคัดเลือกสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS แบบแยกปัจจัยอิสระ (Single factor experiment)

โดยศึกษาหาปัจจัยที่ผลต่อการผลิต EPS คือ ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน ผลของอัตราส่วนความเข้มข้นของคาร์บอนต่อความเข้มข้นของไนโตรเจน (C/N Ratio) ผลความเข้มข้นเกลือและผลของเวลาในการผลิต ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นแยกเป็นปัจจัยอิสระ เพื่อให้ช่วงของข้อมูลที่จะนำไปศึกษาแบบปัจจัยร่วม

1. ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน

ศึกษาโดยเติม Butyrate และ Propionate เป็นแหล่งคาร์บอน ทดแทน Sodium acetate ในสูตรอาหาร GA ในปริมาณเท่ากัน แล้วฆ่าเชื้อ ใช้กล้าเชื้อ 10% เลี้ยงในสภาวะแบบมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย ประมาณ 3500±200 ลักซ์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์ นำน้ำเลี้ยงไปตกตะกอน EPS โดยเติมเอทานอลที่แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสองเท่าของน้ำเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน EPS นำสารแขวนลอยที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ได้ตะกอนของ EPS นำไปหาปริมาณน้ำหนักแห้ง (DW)

2. ผลของปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

ศึกษาหาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม ซึ่งมีผลต่อ C/N Ratio ศึกษาโดยปรับปริมาณของแหล่งคาร์บอน คือ Sodium acetate ซึ่งปรับปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 4 เท่า และปรับปริมาณลดลง 2 และ 4 เท่า จากสูตรอาหาร GA เดิม (5.4 กรัมต่อลิตร) ทำให้ปริมาณ Sodium acetate ที่ใช้คือ 0.00 1.35 2.70

5.40 10.80 และ 21.60 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองตามวิธีข้างต้น เพื่อหาปริมาณ EPS

3. ผลความเข้มข้นเกลือ

ศึกษาความเข้มข้น NaCl ที่เหมาะสมโดยปรับความเข้มข้นเป็น 0.0 0.5 1.0 2.0 3.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร ในอาหาร GA หลังจากนั้นทำการทดลองตามวิธีข้างต้น เพื่อหาปริมาณ EPS

4. ผลของเวลาในการผลิต

ศึกษาผลของเวลาในการผลิต โดยเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร GA ในสภาวะแบบมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย ประมาณ 3500±200 ลักซ์ บมที่อุณหภูมิห้อง ที่เวลา 0 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดลองตามวิธีข้างต้น เพื่อหาปริมาณ EPS

1.3 การศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS โดยใช้ Central Composite Design (CCD)

การหาสภาวะที่เหมาะสมโดยเลือกจากปัจจัยที่ศึกษาข้างต้นที่มีผลต่อการสร้าง EPS สูงสุด 3 ปัจจัย นำมาศึกษาโดยระดับที่แตกต่างกันของปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง EPS คือ X_1 , X_2 และ X_3 ซึ่งจะนำปัจจัยเหล่านี้ใช้ในการออกแบบการทดลองด้วยวิธีการ Response Surface Methodology (RSM) ซึ่งใช้รูปแบบ Central Composite Design (CCD) ที่มีปัจจัยศึกษา 3 ปัจจัย (X_1 , X_2 , X_3) แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ ซึ่งกำหนดรหัสแต่ละระดับ -1, 0 และ +1 ดังแสดงในตาราง 1 นำไปสู่การออกแบบการทดลองด้วย CCD ได้ชุดการทดลองทั้งหมด 20 ชุดทดลอง ดังแสดงในตาราง 2 เพื่อพยากรณ์สภาวะที่เหมาะสม ที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลให้สร้าง EPS ให้มากที่สุด

ตาราง 1 ปัจจัยชนิดต่าง ๆ และระดับของปัจจัยที่ใช้ออกแบบการทดลองศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS โดยใช้ Central Composite Design (CCD)

Variable name	Coded	Levels		
		-1	0	1
Acetate concentration (g/L)	X_1	5.40	8.10	10.80
NaCl concentration (g/L)	X_2	1.00	1.50	2.00
Time (h)	X_3	48	60	72

สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS จะแสดงออกมาในรูปแบบสมการถดถอย (Regression equations) และวิเคราะห์โดยกราฟพื้นที่ตอบสนอง (Response surface contour plots) โดยโปรแกรม Design-Expert 8.0.2 Trial version ซึ่งค่าที่ได้ตรวจสอบความน่าเชื่อถือของผลการทดลองโดยค่า coefficient; R^2

2. การทดสอบความสามารถด้านอนุมูลอิสระของ EPS ในหลอดทดลอง

2.1 การเตรียม EPS

นำน้ำเลี้ยงเซลล์จากสภาวะเพาะเลี้ยงที่ทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 ผลิต EPS ได้สูงสุด มาหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ และนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปตะกอน EPS ตามวิธีข้างต้น เมื่อได้ตะกอนของ EPS แล้ว นำไปประเหยด้วยความเย็น จนได้ผง EPS นำไปชั่งหาน้ำหนักแห้ง ก่อนทำการทดลอง

2.2 การทดสอบ DPPH Radical scavenging activity

DPPH Radical scavenging activity ทดสอบ โดยนำสารละลาย DPPH (0.4 mM DPPH ละลายใน Methanol) 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย EPS 1.0 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น EPS 0.25 - 4.00 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) แล้วเติมน้ำกลั่น 1.8 มิลลิลิตร ผสมกันให้เข้า กันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดการ ดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร คำนวณ % Scavenging activity

2.3 การทดสอบ H₂O₂ Scavenging activity

H₂O₂ scavenging activity ทดสอบโดยนำ สารละลาย EPS 1.0 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น EPS 0.25 - 4.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมกับ Phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) 2.4 มิลลิลิตร และสารละลาย H₂O₂ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกันให้เข้ากันดี วางไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร คำนวณ % Scavenging activity

2.4 การทดสอบ Fe²⁺ Chelating activity

Fe²⁺ Chelating activity ทดสอบ โดยนำ สารละลาย EPS 1.0 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น EPS 0.25 - 4.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมกับ สารละลาย FeCl₂ (2 mM) 2.4 มิลลิลิตร และสารละลาย Ferrozine 0.2 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 2.75 มิลลิลิตร ผสมกัน

ให้เข้ากันดี วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดการ ดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตร คำนวณ % Chelating activity

2.5 การทดสอบ Lipid peroxidation inhibition effect

Lipid peroxidation inhibition effect ทดสอบ โดยนำสารละลาย EPS 1.0 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น EPS 0.25 - 4.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมกับ 1% Liver homogenate 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย FeCl₂ (0.5 mM) 0.05 มิลลิลิตร และสารละลาย H₂O₂ 0.05 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วเติม Trichloroacetic acid (20%, w/v) 1.5 มิลลิลิตร และสารละลาย Thiobarbituric acid (0.8%, w/v) 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นวางไว้จนอุณหภูมิของสารละลาย เท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวัดการดูดกลืน แสงที่ 532 นาโนเมตร และคำนวณ % Inhibition effect

2.6 การคำนวณความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ EPS

การคำนวณความสามารถต้านอนุมูลอิสระ ของ EPS จากการทดลองข้างต้น สามารถคำนวณ % Activity ต่าง ๆ ได้ตามวิธีการของ Sánchez-Moreno [13] ดังนี้

$$\% \text{ Activity} = \frac{1 - (A1 - A2)}{A0} \times 100$$

โดย A0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (น้ำกลั่น)

A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

A2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง EPS เท่านั้น

3. การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับทุก ชุดการทดลอง คำนวณค่าทางสถิติ (ค่าเฉลี่ยและส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน) โดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่น 26 รวมถึงวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยในกลุ่มชุด

ทดลอง ด้วยวิธี One-Way ANOVA (One-Way Analysis of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการ ทดลอง (Post Hoc Tests) ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ผลการศึกษา

1. การคัดเลือกสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS

จากทดลองศึกษาหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิต EPS คือ ชนิดของแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N Ratio) ความเข้มข้นของ NaCl และเวลาในการผลิต ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นแยกเป็นปัจจัยอิสระ ทำให้พบว่าเมื่อเติมแหล่งคาร์บอนชนิด Butyrate Propionate ทดแทน Acetate ในสูตรอาหาร GA ปริมาณเท่ากัน ทำให้ได้ EPS น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งคาร์บอนจาก Acetate ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์ *R. palustris* PP803 ที่ใช้ Acetate เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งให้ปริมาณสูงสุดที่ 1714.00 ± 27.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณผลผลิต EPS (EPS Yield) พบว่าการใช้ Acetate เป็นแหล่งคาร์บอนให้ค่า EPS yield สูงสุด ที่ 0.66 ± 0.01 (รูป 1A) แสดงให้เห็นว่า Acetate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อเลือกใช้ในการศึกษาการผลิต EPS ต่อไป

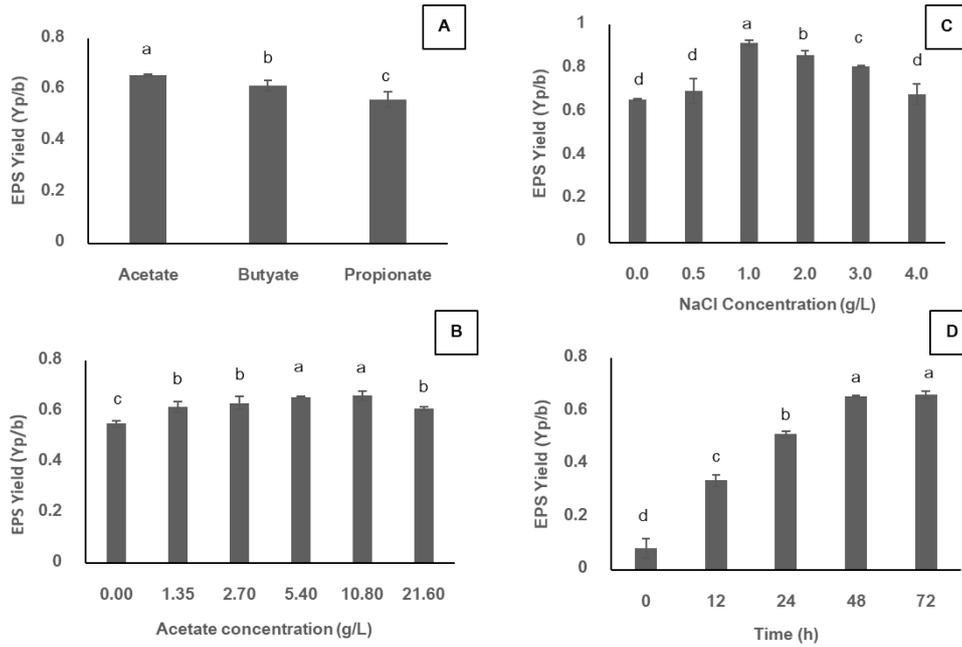
จากศึกษาผลของอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการการผลิต EPS และการเจริญเติบโตของเซลล์ *R. palustris* PP803 ดังแสดงในรูป 1B พบว่า เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณ Acetate 10.80 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ได้ปริมาณ EPS และน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุดที่ 1158.67 ± 69.36 และ 1749.67 ± 61.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อคำนวณค่า EPS Yield พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.66 ± 0.02 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณ Acetate 5.40 กรัมต่อลิตร ดังนั้นความเข้มข้นของ Acetate ในช่วง 5.40-10.80 กรัมต่อลิตร จึงเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับนำไปการศึกษาแบบปัจจัยร่วมต่อไป

ขณะที่ผลของความเข้มข้น NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิต EPS และการเจริญเติบโตของ

เซลล์ *R. palustris* PP803 ดังแสดงในรูป 1C พบว่าในสภาวะที่ความเข้มข้น NaCl 1 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีปริมาณ EPS และน้ำหนักเซลล์แห้ง สูงสุดที่ 1570.00 ± 13.23 และ 1710.00 ± 15.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า EPS Yield ที่เกิดสูงสุด (0.92 ± 0.01) แต่เมื่อความเข้มข้น NaCl เป็น 2 กรัมต่อลิตร ค่า EPS Yield เท่ากับ 0.86 ± 0.01 (ลดลง 0.06) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการลดลงค่อนข้างน้อย ดังนั้นความเข้มข้น NaCl ในช่วง 1-2 กรัมต่อลิตร จึงเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับนำไปการศึกษาแบบปัจจัยร่วมต่อไป

นอกจากนี้การศึกษาผลของเวลาสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่มีต่อการผลิต EPS และการเจริญเติบโตของเซลล์ *R. palustris* PP803 ดังแสดงในรูป 1D พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. palustris* PP803 ในสภาวะแบบมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ส่งผลให้ได้ปริมาณ EPS และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 1250.67 ± 49.56 และ 1890.00 ± 37.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณค่า EPS Yield แล้วพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.66 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. palustris* PP803 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้น เวลาสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่วง 48-72 ชั่วโมง จึงเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับนำไปการศึกษาแบบปัจจัยร่วมต่อไป

จากผลการทดลองที่ได้ศึกษาปัจจัยที่ผลต่อการผลิต EPS คือ ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนของอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน ความเข้มข้น NaCl และเวลาในการผลิต ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นแยกเป็นปัจจัยอิสระ ทำให้ได้ช่วงของข้อมูลที่จะนำไปศึกษาแบบปัจจัยร่วม ที่จะทำได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุด เพื่อให้ได้ผลผลิต EPS สูงสุด ซึ่งสามารถศึกษาด้วยวิธีการ RSM ดังผลการทดลองต่อไป



รูป 1 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอน (A), ความเข้มข้น Acetate (B), ความเข้มข้น NaCl (C) และเวลา (D) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิต EPS (EPS Yield) จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 (อักษร a-d แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยในกลุ่มชุดการทดลองนั้น ๆ เมื่อนำแต่ละค่าเฉลี่ยมาเปรียบเทียบกัน โดยเรียงลำดับจากค่ามาก a ไปยังค่าน้อย d)

2. การศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS โดยใช้ Central Composite Design (CCD)

จากศึกษาข้างต้นทำให้ทราบถึงปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิต EPS จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 ซึ่งมีทั้งหมด 3 ปัจจัยคือ ความเข้มข้น Acetate (Acetate concentration; X_1) ความเข้มข้น NaCl (NaCl concentration; X_2) และเวลาในการเพาะเลี้ยง (Time; X_3) และตาราง 1 แสดงถึงระดับของปัจจัยชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการออกแบบการทดลองศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS โดยใช้ Central Composite Design (CCD)

จากการศึกษา Central Composite Design (CCD) (ตาราง 2) พบว่าชุดการทดลองที่ 16 มีค่า EPS Yield เท่ากับ 0.93 ซึ่งสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองทั้งหมด 20 ชุด โดยสภาวะสำหรับผลิต EPS ดังนี้ ความเข้มข้น Acetate 8.10 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น NaCl 1.50 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 60 ชั่วโมง ซึ่งสภาวะดังกล่าวเหมือนกับ

ชุดการทดลอง 15-20 เนื่องจากค่าระดับกึ่งกลางของแต่ละปัจจัย ซึ่งโปรแกรมได้พยากรณ์ว่าจะเป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิต EPS ซึ่งสอดคล้องกับค่า EPS Yield ที่โปรแกรมพยากรณ์ (Predicted) ว่าในสภาวะดังกล่าวจะมี EPS Yield เท่ากับ 0.92 ซึ่งใกล้เคียงมากกับผลที่ทดลองได้ (Actual) ทั้งนี้โปรแกรมได้คำนวณผลดังกล่าวเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต EPS สูงสุดคือ ความเข้มข้น Acetate 7.82 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น NaCl 1.49 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ 62.83 ชั่วโมง ซึ่งจะเป็นสภาวะที่จะนำไปใช้ต่อไป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัย คือ ความเข้มข้น Acetate ความเข้มข้น NaCl และเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้ง P-value ของโมเดล Quadratic มี $P < 0.05$ และ Lack of fit ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมเดลที่ถูกสร้างจากความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสามมีความน่าเชื่อถือทางสถิติ ส่วนการวิเคราะห์ทาง

ค่าสถิติ R^2 และ Adjusted R^2 มีค่า 0.9331 และ 0.8728 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกัน ($P > 0.05$) แสดงให้เห็นว่า โมเดลที่ใช้ในการคำนวณนี้ อยู่ในระดับที่น่าเชื่อถือ และทำให้เกิดสมการถดถอยสำหรับการผลิต EPS โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 ที่แต่ละปัจจัยต้องมีค่า P-value > 0.05 (ตาราง 3) จึงจะมีผลต่อการผลิต EPS ดังสมการ $EPS\ Yield = 0.92 - 0.031X_1^2 - 0.051X_2^2 - 0.031X_3^2 - 0.02X_1X_2 - 0.02X_2X_3$

นอกจากนี้ สมการถดถอยสำหรับการผลิต EPS โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803

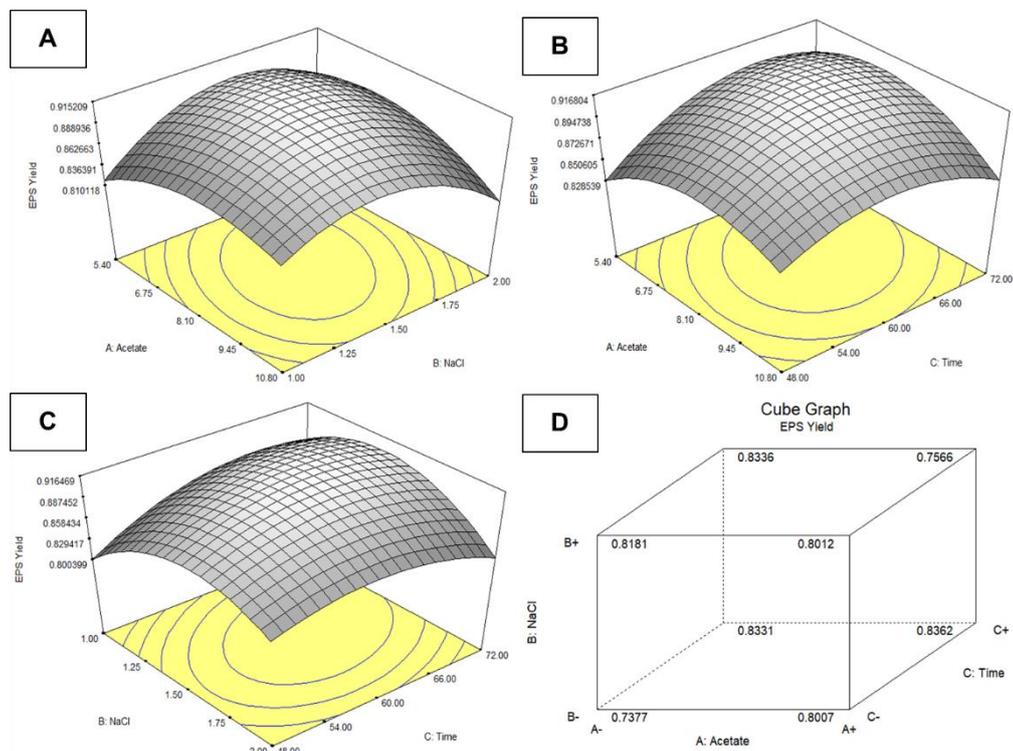
ทำให้สามารถคำนวณแล้ว แสดงผลของปัจจัยร่วมทั้งสามที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS สูงสุด โดยแสดงเป็นภาพ 3D surface และ Contour plot ดังภาพ 2A-C และภาพ 2D ซึ่งเป็นภาพ Cube graph แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของความเข้มข้น NaCl ซึ่งสภาวะที่ปริมาณ NaCl สูงขึ้นเป็นปัจจัยที่ส่งผลให้การผลิต EPS เพิ่มขึ้นเสมอ สอดคล้องกับตาราง 3 ปัจจัยความเข้มข้น NaCl (X_2^2) ที่มีค่า Coefficient Estimate สูงสุด

ตาราง 2 ผลผลิต EPS จากการออกแบบด้วย Central Composite Design (CCD) ที่เป็นผลจากความเข้มข้น Acetate ความเข้มข้น NaCl และเวลาในการเพาะเลี้ยง ในสภาวะแบบมีแสง-มีอากาศเล็กน้อย

Run number	Acetate conc. (X_1)	NaCl conc. (X_2)	Time (X_3)	EPS Yield	
	(g/L)	(g/L)	(h)	Actual	Predicted
1	5.40	1.00	48.00	0.74	0.74
2	10.80	1.00	48.00	0.78	0.80
3	5.40	2.00	48.00	0.79	0.82
4	10.80	2.00	48.00	0.82	0.80
5	5.40	1.00	72.00	0.81	0.83
6	10.80	1.00	72.00	0.86	0.84
7	5.40	2.00	72.00	0.85	0.83
8	10.80	2.00	72.00	0.75	0.76
9	3.56	1.50	60.00	0.85	0.83
10	12.64	1.50	60.00	0.81	0.82
11	8.10	0.66	60.00	0.78	0.77
12	8.10	2.34	60.00	0.77	0.77
13	8.10	1.50	39.82	0.82	0.81
14	8.10	1.50	80.18	0.84	0.85
15	8.10	1.50	60.00	0.92	0.92
16	8.10	1.50	60.00	0.93	0.92
17	8.10	1.50	60.00	0.89	0.92
18	8.10	1.50	60.00	0.91	0.92
19	8.10	1.50	60.00	0.92	0.92
20	8.10	1.50	60.00	0.92	0.92

ตาราง 3 ค่าคงที่และตัวแปรที่สัมพันธ์ต่อการผลิต EPS โดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสง PP803

Factor	Coefficient Estimate	Prob > F
Intercept	0.92	< 0.0001
X ₁ -Acetate	-3.46E-03	0.5691
X ₂ -NaCl	2.33E-04	0.9692
X ₃ -Time	0.013	0.0559
X ₁ ²	-0.031	0.0003
X ₂ ²	-0.051	< 0.0001
X ₃ ²	-0.031	0.0003
X ₁ X ₂	-0.02	0.0263
X ₁ X ₃	-0.015	0.0794
X ₂ X ₃	-0.02	0.0263



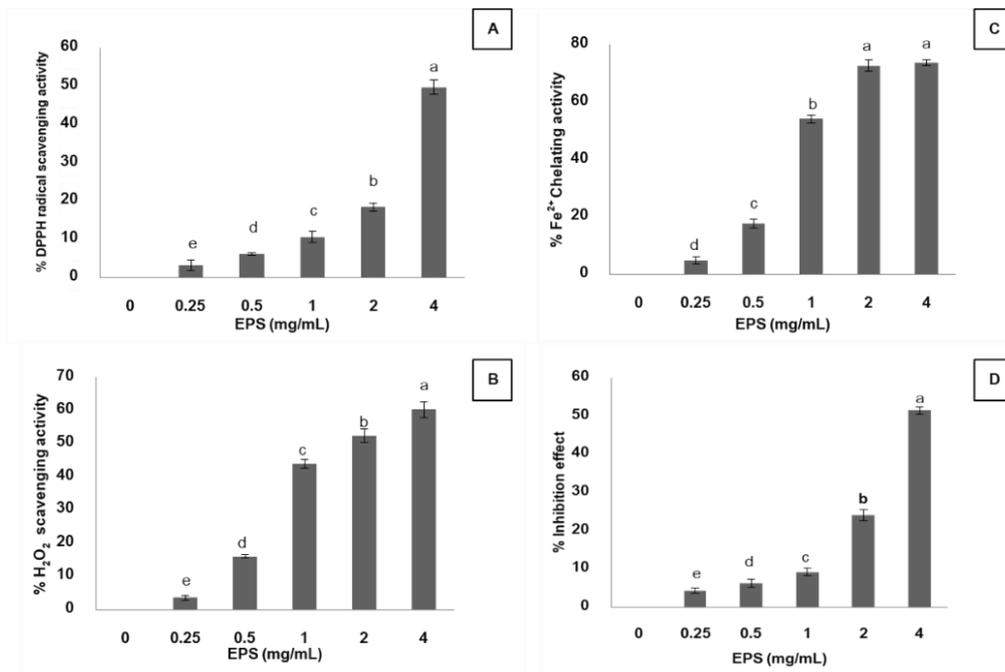
รูป 2 3D surface รวมถึง contour plot (A-C) และ Cube graph (D) ที่แสดงผลของปัจจัยร่วมทั้งสามที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS สูงสุด

3. ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ EPS ในหลอดทดลอง

จากการทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ EPS จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 ในหลอดทดลอง พบว่าการทดลองที่ใช้ EPS ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อ DPPH Radical scavenging activity สูงสุด (49.69 ± 1.90%) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ที่มีความสามารถลดลงตามปริมาณ EPS (รูป 3A) สอดคล้องกับผลการทดลอง H₂O₂ ซึ่งพบว่าปริมาณ EPS ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อ H₂O₂ Scavenging activity มีค่าเท่ากับ 60.20 ± 2.39% (รูป 3B)

ขณะที่การทดสอบความสามารถในการจับกับ Fe²⁺ ของ EPS พบว่าที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร มีผลต่อ Fe²⁺ Chelating activity สูงสุด (73.70±1.03%) แต่ไม่มีความแตกต่าง เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมี Fe²⁺ Chelating activity เท่ากับ 72.62±1.90% (รูป 3C) การทดสอบ Lipid peroxidation inhibition พบว่าการใช้ EPS ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อ Lipid peroxidation activity ได้ 51.44±0.92% สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ซึ่งมีความสามารถลดลงตามปริมาณ EPS (รูป 3D) จากการทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ EPS ของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 ทั้งหมดพบว่า EPS ที่ผลิตได้สามารถดองอนุมูลอิสระได้ดี และมีศักยภาพสูง สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระได้



รูป 3 ผล EPS ความเข้มข้น 0.25 - 4.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อ %DPPH Radical scavenging activity (A) %H₂O₂ Scavenging activity (B) %Fe²⁺Chelating activity (C) และ %Lipid peroxidation inhibition (D) ในหลอดทดลอง (อักษร a-e แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ของค่าเฉลี่ยในกลุ่มชุดการทดลองนั้น ๆ เมื่อนำแต่ละค่าเฉลี่ยมาเปรียบเทียบกัน โดยเรียงลำดับจากค่ามาก a ไปยังค่าน้อย e)

วิจารณ์

1. การศึกษาสภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการสร้าง EPS

การศึกษาคัดเลือกสภาวะทางกายภาพที่มีผลต่อการสร้าง EPS มีความสำคัญอย่างมากต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต EPS จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เนื่องจากศึกษาในขั้นตอนดังกล่าว ทำให้ได้ทราบข้อมูลปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิต รวมไปถึงช่วงระดับของปัจจัยที่ส่งเสริมให้การผลิต EPS มีปริมาณสูงสุด จึงได้มีการศึกษาผลของชนิดแหล่งคาร์บอน อัตราส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ NaCl และเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ Acetate เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งเสริมให้มีปริมาณ EPS สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Butyrate และ Propionate เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลน้ำหนักรเซลล์แห้งของชุดการทดลองที่ใช้ Acetate เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลสูงกว่าแหล่งอื่น (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ทั้งนี้ก็เนื่องมาจาก Acetate เป็นเกลือของกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอน 2 อะตอม เป็นองค์ประกอบจึงทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 สามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีจำนวนมากกว่า จากการศึกษาของ Kanta et al. [14] พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในนาข้าวจะมีความสามารถใช้อcetate เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตในธรรมชาติได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น นอกจากนี้ยังพบอีกว่า Acetate ยังผลต่อการผลิต EPS จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น เช่น Butyrate Propionate Succinate และ Malonate [11] และที่สำคัญ Acetate มีปริมาณมากพอกวีสตวรรษของเกลือทั้งจากภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม [15] จึงเหมาะที่จะเป็นตัวเลือกนำมาใช้ผลิต EPS เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเมื่อเพิ่มขนาดการผลิต

จากการศึกษาบทบาทของ NaCl พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 สามารถผลิต EPS ได้สูงสุด (1570.00±13.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้น NaCl 1 กรัมต่อลิตร แต่ผลการทดลอง น้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า สูงสุด

(1742.00±19.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ความเข้มข้น NaCl 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเกลือมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของผู้วิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น NaCl 0.25 กรัมต่อลิตร และมีการเจริญเติบโตน้อยลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือ [8] ส่วนการเจริญเติบโตน้อยลงแต่มีปริมาณ EPS เพิ่มขึ้นนั้นอาจเกิดจากแบคทีเรียใช้ EPS เพื่อเป็นตัวดูดซับปริมาณ Na^+ ซึ่งเป็นกลไกป้องกันในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญโต ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีเรีย *Rhodospseudomonas acidophila* ที่ลดการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือ 12.6% (w/v) แต่ยังสามารถผลิต EPS [11]

การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง สำหรับการผลิต EPS ก่อนหน้านี้ พบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการผลิต EPS และน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น [16] สอดคล้องกับการผลการทดลองนี้ โดยพบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมงทำให้ผลิต EPS ได้สูงสุด (1250.67±49.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และน้ำหนักเซลล์สูงสุด (1890.00±37.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ค่า EPS Yield ที่เวลาเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ดังนั้นช่วงระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง จึงเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการศึกษาร่วมด้วยวิธี RSM เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงซึ่งส่งผลต่อการลดต้นทุนในการผลิต EPS ต่อไป

จากการศึกษา Central Composite Design พบว่าความเข้มข้น NaCl เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลมากที่สุดต่อการผลิต EPS ซึ่งเห็นได้จากค่า Coefficient estimate (ตาราง 3) สอดคล้องกับการศึกษาของ Seesuriyachan et al. [17] ซึ่งทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต EPS จาก *Lactobacillus confusus* โดยออกแบบการทดลองด้วย CCD พบว่าความเข้มข้น NaCl ร่วมกับปริมาณน้ำตาล Sucrose ส่งผลมากที่สุดต่อการผลิต EPS ซึ่งผลผลิตได้สูงถึง 85.82กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษา

ดังกล่าวก็พบว่าเมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้นก็ส่งผลต่อ น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเช่นกัน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้นจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แต่จะส่งเสริมการผลิต EPS ซึ่งเป็นผลจากการที่ส่วนหนึ่งของกลไกการรอดชีวิตในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต [18]

ส่วนผลสำคัญที่ได้จากศึกษา CCD ในครั้งนี้คือชุดสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต EPS สูงสุด คือ Acetate ความเข้มข้น 7.82 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น NaCl 1.49 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 62.83 ชั่วโมง และชุดสมการถดถอยที่ได้ซึ่งจะนำไปสู่การผลิต EPS อย่างมีประสิทธิภาพใช้ระยะเวลาที่น้อยลงแต่ให้ผลผลิตที่มากขึ้น สามารถเพิ่มศักยภาพตลอดจนนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ

2. ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ EPS ในหลอดทดลอง

กลไกของสารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปแล้ว ก็จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม อาจจะไปรวมตัวกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นมาให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไป [1] ซึ่งวิธีการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH Radical model และ H_2O_2 model เป็นที่นิยมเพื่อประเมินความสามารถของสารต้านอนุมูลที่มีผลลด DPPH Radical และ Superoxide radical ที่ไม่มีเสถียรภาพให้น้อยลง [19] จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ EPS ส่งผลให้ค่า DPPH Radical scavenging activity และ H_2O_2 Scavenging activity เพิ่มขึ้นแบบแปรผันตามความเข้มข้นของ EPS ซึ่งในชุดการทดลองที่ใช้ EPS ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ H_2O_2 อยู่ในระดับปานกลาง ซึ่งอาจเนื่องมาจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ EPS เป็นพวก Polygalacturonic acid โดยประมาณ 50% แล้วยังมีองค์ประกอบอื่นเป็นโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่เป็นสาร

ให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลให้อนุมูลอิสระน้อยลง [2] สอดคล้องกับการศึกษาของ Liu et al. [20] ที่พบว่าความสามารถ DPPH Radical scavenging activity และ H_2O_2 Scavenging activity ของ EPS จาก *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 ที่มืองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตนั้น สามารถลดอนุมูลอิสระได้ 50% โดยประมาณเช่นกัน ขณะที่การทดสอบ Fe^{2+} Chelating activity มีความสามารถสูงถึง 92.4% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ ในชุดการทดลองที่ใช้ EPS ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถ 73.7% สำหรับการทดสอบ Fe^{2+} Chelating activity โดยกลไกการลดอนุมูลอิสระด้วยกระบวนการ Metal chelating นั้นเกิดจากสาเหตุว่าโลหะหนัก เช่น Fe^{2+} , Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา Oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภทเช่น Peroxyl radical, Hydroxyl radical และ Alkyl radical รวมถึง Singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ [19] ดังนั้นจากผลการทดลองนี้ที่แสดงให้เห็นว่า EPS จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 มีความสามารถจับ Fe^{2+} ได้ดีมาก ส่งผลมาจากที่โครงสร้างที่จับกับโลหะหนักได้ดีต้องมีหมู่ฟังก์ชัน เช่น $-OH$, $-SH$, $-COOH$, $-PO_3H_2$, $C=O$, $-NR_2$, $-S-$ และ $-O-$ [19] ซึ่งโครงสร้างของ EPS จาก PP803 มีลักษณะเป็น 1,4-Linked α -galacturonic acid residues [9] ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน Carboxyl group อาจส่งผลให้จับ Fe^{2+} ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามควรศึกษาต่อไปในอนาคต

ส่วนกระบวนการ Lipid peroxidation คือปรากฏการณ์ที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไขมันที่บริเวณ Lipid bilayer ที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดอนุมูลอิสระจากกระบวนการดังกล่าว [21] ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้ $FeCl_2-H_2O_2$ ในการกระตุ้นให้เกิด Lipid peroxidation ซึ่งพบว่าในชุดการทดลองที่ใช้ EPS ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation อยู่ในระดับ 51.44% โดยมีรายงานในปัจจุบันพบว่า EPS จากแบคทีเรียมีความสามารถยับยั้ง Hydroxyl radical และ H_2O_2 ได้ดี

ใกล้เคียงกับความสามารถในการ Fe^{2+} Chelating ส่งผลการยับยั้ง Lipid peroxidation ที่อยู่ในระดับปานกลาง [12] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำข้อมูลไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต EPS จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* PP803 ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ในการศึกษาที่ต้องการเพิ่มขนาดการผลิตและลดต้นทุน นอกจากนี้ข้อมูลความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ EPS ในหลอดทดลองที่ได้ จะนำไปสู่การศึกษาเพื่อศึกษากลไกของ EPS ต่อการต้านอนุมูลอิสระและศึกษาในระดับสัตว์ทดลองต่อไปเพื่อเป็นแนวทางในพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนวิจัยสนับสนุนจาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ และขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ที่ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มไม่สะสมซัลเฟอร์สำหรับการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Neha K, Haider MR, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur J Med Chem*, 2019;178: 687-704.
2. Wang J, Hu S, Nie S, Yu Q, Xie M. Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev*, 2016.
3. Raza W, Makeen K, Wang Y, Xu Y, Qirong S. Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresource technol*, 2011;102(10): 6095-6103.

4. Abdelhamid S.A, Mohamed S.S, Selim M.S. Medical application of exopolymers produced by marine bacteria. *Bull Natl Res Cent*, 2020;44(1): 1-14.
5. Imhoff JF, Trüper HG. Anoxygenic phototrophic purple bacteria. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology, The Proteobacteria, part a introductory essay*. Springer-US; 2005, p. 119-132.
6. Chandy T, Rao GH, Wilson RF, Das GS. Development of poly (Lactic acid)/chitosan co-matrix microspheres: controlled release of taxol-heparin for preventing restenosis. *Drug Deliv*, 2001;8(2): 77-86.
7. Sasaki K, Watanabe M, Suda Y, Ishizuka A, Noparatnaraporn N. Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *J Biosci Bioeng*, 2005;100(5): 481-488.
8. Nunkaew T, Kantachote D, Nitoda T, Kanzaki H. Selection of salt tolerant purple non sulfur bacteria producing 5-aminolevulinic acid (ALA) and reducing methane emissions from microbial rice straw degradation. *Appl Soil Ecol*, 2015;86: 113-120.
9. Nunkaew T, Kantachote D, Nitoda T, Kanzaki H, Ritchie RJ. Characterization of exopolymeric substances from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains and their ability to adsorb sodium ions. *Carbohydr Polym*, 2015;115: 334-341.
10. Liu J, Luo J, Ye H, Sun Y, Lu Z, Zeng X. Production, characterization and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydr Polym*, 2009;78(2): 275-281.

11. Sheng GP, Yu HQ, Yue Z. Factors influencing the production of extracellular polymeric substances by *Rhodopseudomonas acidophila*. Int Biodeter Biodegr, 2006;58(2): 89-93
12. Liu J, Luo J, Ye H, Sun Y, Lu Z, Zeng X. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS - 3. Carbohydr Polym, 2010;82(4): 1278-1283.
13. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci Technol Int, 2002;8(3): 121-137.
14. Kantha T, Kantachote D, Klongdee N. Potential of biofertilizers from selected *Rhodopseudomonas palustris* strains to assist rice (*Oryza sativa* L. subsp. indica) growth under salt stress and to reduce greenhouse gas emissions. Ann Microbiol, 2015;65: 2109–2118.
15. Dungani R, Karina M, Subyakto AS, Hermawan D, Hadiyane A. Agricultural waste fibers towards sustainability and advanced utilization: A review. Asian J Plant Sci, 2016;15(1-2): 42-55.
16. Nookongbut P, Kantachote D, Megharaj M. Arsenic contamination in areas surrounding mines and selection of potential As-resistant purple non sulfur bacteria for use in bioremediation based on their detoxification mechanisms. Ann Microbiol, 2016;66(4): 1419–1429.
17. Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Chaiyaso, T., Leksawasdi, N. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. Biosci Biotech Bioch, 2012;110905: 1-6.
18. Prasertsan P, Wichienchot S, Doelle H, Kennedy JF. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydr Polym, 2008;71(3): 468-475.
19. Yuan YV, Bone DE, Carrington MF. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated *in vitro*. Food Chem, 2005;91: 485–494.
20. Liu J, Luo J, Ye H, Sun Y, Lu Z, Zeng X. Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. Carbohydr Polym, 2010;79(1): 206-213.
21. Abuja, P.M., Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clinica Chimica Acta, 306, 1–17.