

การผลิตไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์จากวัชพืชโดยใช้ไซแลเนสจาก *Aureobasidium pullulans*

นางสาวธัญชา ผาติพงศ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF XYLOOLIGOSACCHARIDES FROM WEEDS USING A XYLANASE FROM
Aureobasidium pullulans

Miss Tanutchra Patipong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไซลอลออลิโกแซ็กคาไรด์จากวัชพืชโดยใช้ไซแลเนสจาก <i>Aureobasidium pullulans</i>
โดย	นางสาวธันชชา ผาติพงศ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล อาจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็นส่วหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรเทพ ถนอมแก้ว)

ธัญชา ผาติพงษ์ : การผลิตไซลอลอลิโกแซ็กคาไรด์จากวัชพืชโดยใช้ไซแลเนสจาก *Aureobasidium pullulans* (PRODUCTION OF XYLOOLIGOSACCHARIDES FROM WEEDS USING A XYLANASE FROM *Aureobasidium pullulans*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: ผศ. ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล,
อ. ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส, 105 หน้า.

เมื่อคัดกรอง *Aureobasidium pullulans* จำนวน 30 สายพันธุ์ ในอาหารสูตร production medium ที่มีซังข้าวโพด 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อหาสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ไซแลเนสที่ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7 และอุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) พบว่า *A. pullulans* AP 46 สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลเนสได้สูงสุดที่ 2.70 ± 0.11 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์นี้มีความเสถียรสูงที่ภาวะดังกล่าว โดยมีแอกติวิตีคงเหลือประมาณ 60% หลังจากเก็บเป็นเวลา 4 วัน เมื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเท่ากับ 5.19 ± 0.08 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่มีฟางข้าวเข้มข้น 3.89% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีโซเดียมไนเตรดเข้มข้น 0.75% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเป็น 5.5 และเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์ไซแลเนสหยาบที่ผลิตได้มาย่อยไซแลนที่สกัดจากชีวมวลของพืชโตเร็วและวัชพืช ได้แก่ หญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก และผักตบชวา เพื่อผลิตไซลอลอลิโกแซ็กคาไรด์ จากการสกัดไซแลน พบว่าสามารถสกัดไซแลนจากหญ้าเนเปียร์ได้ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ $28.33 \pm 3.33\%$ (w/w) และพบว่าไซแลนที่สกัดได้จากพืชทุกชนิดประกอบด้วยพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงเป็นส่วนใหญ่ เมื่อย่อยไซแลนจากพืชชนิดต่างๆ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 7 และอุณหภูมิห้อง พบว่า การย่อยไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคาและหญ้าแฝก ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการย่อยไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าแฝกให้ปริมาณโดยรวมของไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสสูงสุด ดังนั้น จึงหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซลอลอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้ไซแลนที่สกัดจากหญ้าแฝกเป็นสารตั้งต้น พบว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 27.94 ยูนิต์ต่อกรัมไซแลน และใช้เวลาในการย่อยเท่ากับ 92 ชั่วโมง 19 นาที จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 23.65 ± 1.34 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน เมื่อนำไซลอลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และนำไปทดสอบสมบัติการเป็นพรีไบโอติก พบว่าสามารถกระตุ้นการเติบโตของ *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลูโคส

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5571993723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: HYDROLYSIS / XYLOBIOSE / XYLOTRIOSE / OPTIMIZATION

TANUTCHA PATIPONG: PRODUCTION OF XYLOOLIGOSACCHARIDES FROM WEEDS USING A XYLANASE FROM *Aureobasidium pullulans*. ADVISOR: ASST. PROF. DR.SEHANAT PRASONGSUK, CO-ADVISOR: ASST. PROF. DR.PONGTHARIN LOTRAKUL, DR.PANUWAT PADUNGROS, 105 pp.

Thirty strains of *Aureobasidium pullulans* were screened in the production medium containing 1% (w/v) corn cob as carbon source for the production of xylanase functioning well at pH 7 and room temperature (28±2°C). It was found that *A. pullulans* AP 46 produced the highest xylanase activity at 2.70±0.11 unit/ml and this enzyme was highly stable at this condition with approximately 60% of its original activity remained after 4-day storage. When the xylanase production of *A. pullulans* AP 46 was optimized, this strain yielded the highest xylanase activity at 5.19±0.08 unit/ml when cultured in the production medium containing 3.89% (w/v) rice straw as carbon source and 0.75% (w/v) sodium nitrate as nitrogen source at pH 5.5 for 72 hours. The crude xylanase was used to hydrolyze xylans extracted from biomasses of fast-growing plants and weeds, including cogon grass, napier grass, vetiver grass and water hyacinth, in order to produce xylooligosaccharides. After the extraction, the highest yield of xylan at 28.33±3.33% (w/w) was obtained from napier grass and the extracted xylans from all plants comprised the majority of high-molecular-weight polymers. When these xylans was hydrolyzed at pH 7 and room temperature, the amounts of reducing sugars in cogon grass and vetiver grass xylan hydrolysates were the highest and not significantly different from each other. Moreover, the hydrolysis of vetiver grass xylan provided the highest amount of xylobiose and xylotriose combined. Therefore, the optimization of xylooligosaccharide production was carried out using the vetiver grass xylan as substrate. When the xylanase was used for xylan hydrolysis at the concentration of 27.94 unit/g xylan for 92 hour 19 minutes, the highest amount of reducing sugars was achieved at 23.65±1.34 mg/100 mg xylan. The produced xylooligosaccharides were partially purified and tested for their prebiotic property. It was found that they can significantly stimulate the growth of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei* when compared with glucose.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.ภาณุวัฒน์ ผดุงรส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ ถนนแก้ว ที่กรุณาเป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และงบประมาณในการทำวิจัย ในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณ ศูนย์ส่งเสริมการวิจัยในภูมิภาคเอเชียของมูลนิธิเกาหลีเพื่อการศึกษาขั้นสูง ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการศึกษา และให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ชีวมวลพืช	5
2.2 ไชแลน	7
2.3 การย่อยไชแลน	9
2.4 <i>Aureobasidium pullulans</i>	12
2.5 ไชโลออลิโกแซ็กคาไรด์.....	17
2.6 โปรไบโอติก.....	19
2.7 โพรไบโอติก.....	20
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	23
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	23
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	24
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	26
3.4 พืชที่ใช้ในงานวิจัย.....	28
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.5.1 การคัดเลือก <i>Aureobasidium pullulans</i>	29

3.5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส	30
3.5.3 การเตรียมไซแลนและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของไซแลน	33
3.5.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์.....	34
3.5.5 การเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน.....	36
3.5.6 การทดสอบสมบัติของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ แบคทีเรีย.....	37
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	39
4.1 การคัดเลือก <i>Aureobasidium pullulans</i>	39
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส	41
4.3 การเตรียมไซแลนและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของไซแลน.....	47
4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์	52
4.5 การเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน	57
4.6 การทดสอบสมบัติของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย	58
บทที่ 5 การอภิปรายผลการวิจัย	60
5.1 การคัดเลือก <i>Aureobasidium pullulans</i>	60
5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส	62
5.3 การเตรียมไซแลนและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของไซแลน.....	67
5.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์	68
5.5 การเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน	71
5.6 การทดสอบสมบัติของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย.....	72
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	74
6.1 การคัดเลือก <i>Aureobasidium pullulans</i>	74
6.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส.....	74

6.3 การเตรียมโซลแลนและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของโซลแลน.....	74
6.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโซโลออลิโกแซ็กคาไรด์	74
6.5 การเตรียมโซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน	75
6.6 การทดสอบสมบัติของโซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย	75
6.7 ข้อเสนอแนะ	75
รายการอ้างอิง	76
ภาคผนวก.....	94
ภาคผนวก ก	95
ภาคผนวก ข	97
ภาคผนวก ค	100
ภาคผนวก ง.....	103
ภาคผนวก จ	104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	105

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 โครงสร้างของไซแลนชนิดต่างๆ	9
ตารางที่ 2 เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลน	12
ตารางที่ 3 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย	27
ตารางที่ 4 แผนการทดลองแบบ CCD ที่ใช้ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไซแลเนส	32
ตารางที่ 5 แผนการทดลองแบบ CCD ที่ใช้ในการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ใน การย่อย ต่อการผลิตไซลอลิโกแซ็กคาไรด์	36
ตารางที่ 6 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับผลิต ไซแลเนส	43
ตารางที่ 7 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนอง (แอกติวิตีของไซแลเนส) ต่อปัจจัยที่ศึกษา สำหรับการศึกษความเข้มข้นของแหล่ง คาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสของ <i>A. pullulans</i>	45
ตารางที่ 8 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในหญ้าชนิดต่างๆ และผักตบชวา .	49
ตารางที่ 9 ปริมาณไซแลนที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ	49
ตารางที่ 10 สัญญาณมวลโมเลกุลของไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี gel permeation chromatography	50
ตารางที่ 11 ปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ที่เกิดการจากย่อยไซแลนจากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยควบคุมปริมาณไซแลน เริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ใน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร	53

ตารางที่ 12 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนอง (น้ำตาลรีดิวซ์) ต่อปัจจัยที่ศึกษา สำหรับการศึกษาปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ 56

ตารางที่ 13 การเติบโตของแบคทีเรีย *L. brevis* และ *L. casei* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับสารชนิดอื่นๆ โดยควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 mg C/ml 59



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 การยี้ดเกาะกันของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	7
รูปที่ 2 โครงสร้างของกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง	8
รูปที่ 3 โครงสร้างของอะราบิโนไซแลนในรำข้าวสาลี	8
รูปที่ 4 โครงสร้างของกลูคูโรโนอะราบิโนไซแลนในหญ้า.....	8
รูปที่ 5 โครงสร้างของอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน	9
รูปที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ <i>Aureobasidium pullulans</i> แบบต่างๆ.....	14
รูปที่ 7 ไชแลเนสแอกติวิตีจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ต่างๆ หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่มี 1% (w/v) ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าที่ ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน.....	40
รูปที่ 8 แอกติวิตีที่เหลือของไชแลเนสที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> AP 46 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	41
รูปที่ 9 การเติบโตและการผลิตไชแลเนสของ <i>A. pullulans</i> AP 46 ในอาหารสูตรพื้นฐาน บน เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	42
รูปที่ 10 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไชแลเนสของ <i>A. pullulans</i> AP 46 เมื่อเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	43
รูปที่ 11 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟางข้าวและ โซเดียม ไนเตรตต่อการผลิตไชแลเนสจาก <i>A. pullulans</i> AP 46	45
รูปที่ 12 ผลของ pH ต่อการผลิตไชแลเนสจาก <i>A. pullulans</i> AP 46 เมื่อเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน	46
รูปที่ 13 การเติบโตและการผลิตไชแลเนสของ <i>A. pullulans</i> AP 46 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	47

รูปที่ 14 GPC chromatogram ของไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคา (A) ไซแลนที่สกัดได้จาก หญ้าเนเปียร์ (B) ไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าแฝก (C) ไซแลนที่สกัดได้จากผักตบชวา (D) beechwood xylan (E)	51
รูปที่ 15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดการจากย่อยไซแลนจากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมงโดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และ ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร.....	53
รูปที่ 16 ปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรออส ที่เกิดการจากย่อยไซแลนจากหญ้าคา หญ้า เนเปียร์ หญ้าแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ใน สภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมงโดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้น เท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร	54
รูปที่ 17 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการ ย่อยต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น.....	56
รูปที่ 18 Mass spectrum ของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบก่อนผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์....	57
รูปที่ 19 Mass spectrum ของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อผ่านกระบวนการดูดซับบนถ่านกัม มันต์และชะด้วย 15% (v/v) เอทานอล.....	58

บทที่ 1

บทนำ

ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharides) เป็นน้ำตาลสายสั้น ๆ ซึ่งมีหน่วยย่อยคือ น้ำตาลไซโลส (xylose) ตั้งแต่ 2 ถึง 10 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลของไซโลสเชื่อมกันด้วยพันธะปีตา-1,4-ไซโลซิดิก (β -1,4-xylosidic linkage) (Carvalho และคณะ, 2013) ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์มีรสหวาน (Makelainen และคณะ, 2010) และมีสมบัติเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) คือไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร แต่สามารถเป็นแหล่งอาหารของโพรไบโอติก (probiotic) ได้ โพรไบโอติกนั้นเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม bifidobacteria และ lactobacilli (Chapla, Pandit และ Shah, 2012) แบคทีเรียเหล่านี้มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ในแง่ต่างๆ เช่น สามารถลดการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้โดยการสร้างสารยับยั้ง แย่งพื้นที่ยึดเกาะบนผนังลำไส้ และแย่งสารอาหารในการเติบโต นอกจากนี้ ยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหาร มีบทบาทในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและการป้องกันการเจริญของเนื้องอก (Fuller, 1989) อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล (Hughes และคณะ, 2007) โดยเฉพาะโมเลกุลที่ประกอบด้วยไซโลสต่ำกว่า 4 หน่วยจะแสดงสมบัติพรีไบโอติกได้สูงกว่าโมเลกุลใหญ่ๆ (Carvalho และคณะ, 2013) ดังนั้น ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ทางการค้าจึงมีไซโลไบโอส (xylobiose) และไซโลไตรโอส (xylotriose) เป็นส่วนผสมหลักในผลิตภัณฑ์ (Gullon และคณะ, 2008) ด้วยสมบัติดังกล่าวของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จึงทำให้มีการนำไปใช้เป็นอาหารเสริม หรือเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มและอาหารประเภทต่างๆ (Vazquez และคณะ, 2000; Kumar, Pushpa และ Prabha, 2012) และยังสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำ เหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Carvalho และคณะ, 2013)

ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้จากการย่อยสลายไซแลน (xylan) เพื่อให้ได้โมเลกุลที่เล็กลง ไซแลนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ของน้ำตาลไซโลส และเป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในผนังเซลล์พืช แต่ไซแลนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นจึงมีการศึกษาวัตถุดิบอื่นๆ ที่มีราคาถูก และมีไซแลนเป็นองค์ประกอบเพื่อนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ วัชพืชเป็นวัตถุดิบหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากไม่มีมูลค่า และไม่ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ หรืออาจต้องกำจัดทิ้ง หาก

สามารถนำวัชพืชมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไฮลอสอลิโกแซ็กคาไรด์ ก็จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตลง และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัชพืช อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการกำจัดวัชพืชอีกด้วย อย่างไรก็ตาม โครงสร้างของไซแลนในผนังเซลล์พืชจะเชื่อมติดอยู่กับลิกนิน (lignin) ด้วยพันธะที่แข็งแรง ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการย่อยสลาย (Rabetafika และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงต้องทำการสกัดไซแลนด้วยต่างก่อน ซึ่งจะทำให้เกิดการสลายพันธะระหว่างไซแลนและลิกนิน (Peng และคณะ, 2009) จากนั้นจึงย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์มีข้อดีกว่าการย่อยด้วยกรดคือ ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะ ทำให้เกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวน้อย และไม่เกิดเฟอพิวราล (furfural) ซึ่งเป็นสารพิษ นอกจากนี้ยังไม่ก่อให้เกิดปัญหาการกัดกร่อน จึงไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ (Chapla, Pandit และ Shah, 2012; Carvalho และคณะ, 2013)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนคือเอนไซม์ในกลุ่มไซแลเนส (xylanases) โดยเอนไซม์กลุ่มนี้จะกระตุ้นปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะที่เชื่อมระหว่างหน่วยย่อยในไซแลนให้ได้ไฮลอสอลิโกแซ็กคาไรด์ (Subramaniyan และ Prema, 2002) ไซแลเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด รวมถึง *Aureobasidium pullulans* (Leathers, Kurtzman และ Detroy, 1984; Leathers, 1986; Li และคณะ, 1993) การผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* นิยมใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบแทนไซแลนบริสุทธิ์ เนื่องจากมีปริมาณมากและราคาต่ำ ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้ (Nasr และคณะ, 2013; Bankeeree และคณะ, 2014)

Aureobasidium pullulans ซึ่งเป็นราชนิดหนึ่งที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) (Leathers, Kurtzman และ Detroy, 1984) มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” หรือ “black yeast” เนื่องจากสามารถผลิตสารสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ จึงทำให้โคโลนีมีสีดำ (Lingappa, Sussman และ Bernstein, 1963) *A. pullulans* มีการแพร่กระจายทั่วโลก สามารถพบได้ในสภาพภูมิอากาศหลากหลายตั้งแต่ร้อนจัดไปจนถึงหนาวจัด (Deshpande, Rale และ Lynch, 1992) สำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนก็มีการพบ *A. pullulans* โดย Punnapayak และคณะ (2003) สามารถคัดแยก *A. pullulans* จากอากาศได้จำนวน 3 สายพันธุ์ Lotrakul และคณะ (2009) สามารถคัดแยก *A. pullulans* จากผนังห้องน้ำได้จำนวน 10 สายพันธุ์ Prongsuk และคณะ (2005) และ Manitchotpisit และคณะ (2009) สามารถคัดแยก *A. pullulans* จากใบไม้และพื้นผิวต่างๆ ได้แก่ ผนังห้องน้ำ พื้นผิวที่ทาสี และพื้นผิวของไม้ ได้จำนวน 5 สายพันธุ์ และ 45 สายพันธุ์

ตามลำดับ นอกจากนี้ Manitchotpisit และคณะ (2009) ยังได้ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *A. pullulans* เหล่านี้โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 บริเวณ ได้แก่ ITS IGS *EF-1 α* *BT2* และ *RPB2* ร่วมกับความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharides) และการผลิตไซแลเนส พบว่าสามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์เหล่านี้ได้เป็น 12 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนในประเทศไทย

ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งคัดเลือก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนจากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อนำมาผลิตไซแลเนสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำไซแลเนสที่ได้ไปใช้ในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากชีวมวลของหญ้าและวัชพืชบางชนิดที่มีในประเทศไทย โดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต แล้วทดสอบสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ผลการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริม หรือสารปรุงแต่งอาหารจากวัตถุดิบที่มีต้นทุนต่ำต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากวัชพืชโดยใช้ไซแลเนสจาก *A. pullulans*

ขอบเขตของงานวิจัย

1. คัดเลือก *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสซึ่งสามารถย่อยไซแลเนสได้ดีที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส)
2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซแลเนส
3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากไซแลเนสที่สกัดได้จากหญ้าและผักตบชวา
4. ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากชีวมวลพืชที่มีมูลค่าต่ำ และมีสมบัติเป็นพรีไบโอติก
เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมในอนาคต



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีวมวลพืช

ชีวมวลพืชเป็นทรัพยากรประเภทหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้ (renewable resource) ที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก และจัดเป็นแหล่งวัตถุดิบสำคัญสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel) และผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่มีมูลค่าสูง (high-value bioproduct) โดยทั่วไปชีวมวลพืชจะเป็นสารประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน (Moure และคณะ, 2006) โดยปริมาณขององค์ประกอบเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด

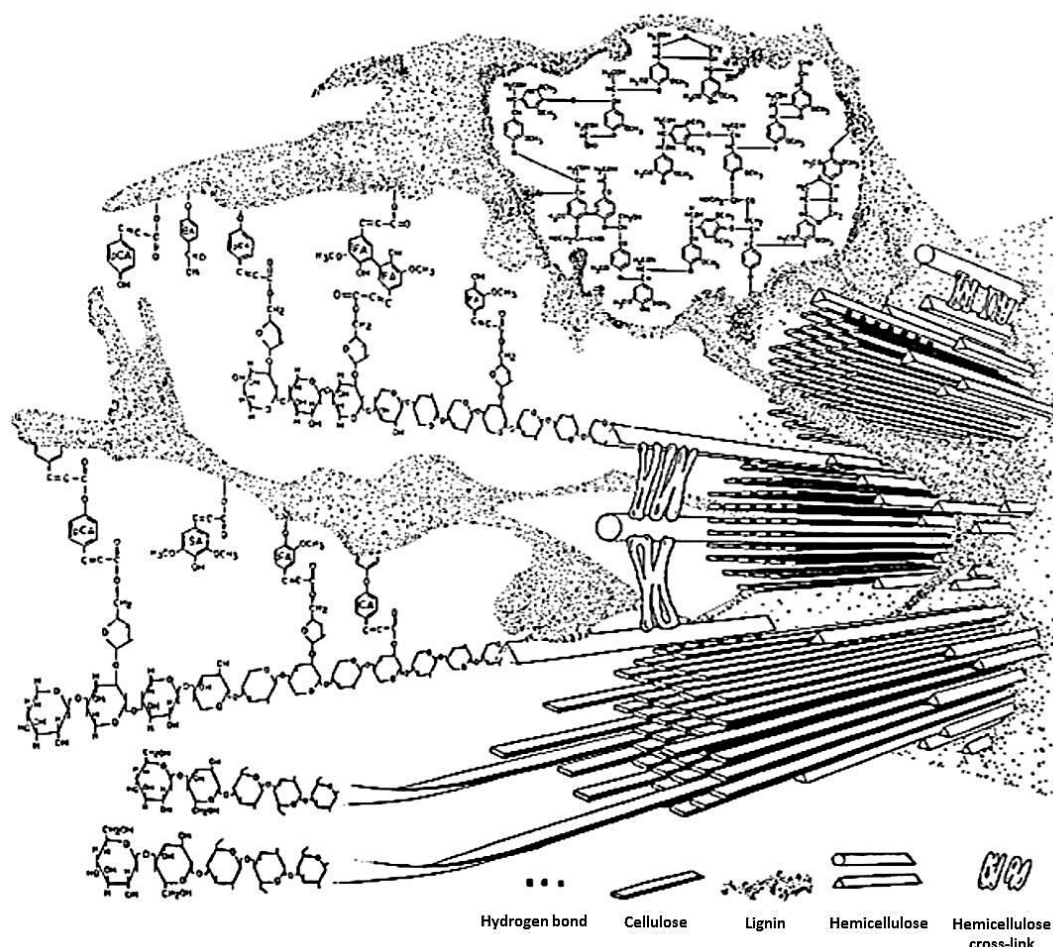
เซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่มีปริมาณสูงสุดในชีวมวลพืช พบประมาณ 40-55% ในไม้เนื้อแข็ง 45-50% ในไม้เนื้ออ่อน และ 25-40% ในพืชวงศ์หญ้า (Kumar และคณะ, 2009) เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะปีตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic linkage) โดยไม่มีการแตกกิ่ง และมีพันธะไฮโดรเจนยึดทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล โมเลกุลของเซลลูโลสจะเรียงตัวกันเป็นสายยาว กลุ่มของสายจะรวมตัวกันเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งไมโครไฟบริลจะมีส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) สลับกับส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous) กลุ่มของไมโครไฟบริลจะรวมตัวกันเป็นไฟบริล (fibril) และกลายเป็นเส้นใยเซลลูโลส (Sjostrom, 1993)

เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบของชีวมวลพืชซึ่งพบประมาณ 24-40% ในไม้เนื้อแข็ง 25-35% ในไม้เนื้ออ่อน และ 35-50% ในพืชวงศ์หญ้า (Kumar และคณะ, 2009) เฮมิเซลลูโลสเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่มีการแตกกิ่ง ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลห้าคาร์บอน ได้แก่ ไซโลส อะราบิโนส แรมโนส น้ำตาลหกคาร์บอน ได้แก่ กาแลกโตส กลูโคส และแมนโนส และกรดน้ำตาล ได้แก่ กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid, 4-O-methyl- glucuronic acid) และกรดกาแลคทูโรนิก (galacturonic acid) องค์ประกอบเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช โดยจะพบแมนโนสเป็นน้ำตาลหลักในเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้ออ่อน และพบไซโลสเป็นน้ำตาลหลักในเฮมิเซลลูโลสของไม้เนื้อแข็งและพืชล้มลุกทางเศรษฐกิจ (Sjostrom, 1993; Taherzadeh

และ Karimi, 2008) เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างหลายรูปแบบ เช่น กาแลกโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) อะราบินอกลูคูโรโนไซแลน (arabinoglucuronoxylyan) อะราบินอกาแลกแตน (arabinogalactan) กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylyan) กลูโคแมนแนน (glucomannan) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชเช่นกัน (Sjostrom, 1993) เฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่ยึดโครงสร้างระหว่างเซลลูโลสและลิกนินด้วยพันธะไฮโดรเจนและพันธะโคเวเลนต์ตามลำดับ (Freudenberg, 1965)

ลิกนินเป็นองค์ประกอบของชีวมวลพืชซึ่งพบประมาณ 18-25% ในไม้เนื้อแข็ง 25-35% ในไม้เนื้ออ่อน และ 10-30% ในพืชวงศ์หญ้า (Kumar และคณะ, 2009) ลิกนินสามารถสังเคราะห์ได้จาก coniferyl alcohols sinapyl alcohol และ p-coumaryl alcohol ผ่านปฏิกิริยา polymerization ได้หน่วยย่อยของ phenylpropane ชนิดต่างๆ ได้แก่ guaiacylpropane syringylpropane และ 4-hydroxyphenylpropane ตามลำดับ หน่วยย่อยเหล่านี้เป็นองค์ประกอบในลิกนินซึ่งมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ที่มีโครงสร้างซับซ้อนเป็นสามมิติ ในไม้เนื้ออ่อนจะพบหน่วยย่อย guaiacylpropane เป็นส่วนใหญ่ ในไม้เนื้อแข็งจะพบ guaiacylpropane และ syringylpropane โดยมีสัดส่วน ของหน่วยย่อยทั้งสองชนิดแปรผันระหว่าง 4:1 ถึง 1:2 ส่วนในหญ้าหรือพืชปีเดียว (annual plant) จะพบทั้ง guaiacylpropane syringylpropane และ 4-hydroxyphenylpropane (Sjostrom, 1993; Monteil-Rivera และคณะ, 2013) ลิกนินเป็นองค์ประกอบที่ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรงและมีบทบาทในการป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ (Mao, Zhang และ Xu, 2012)

โครงสร้างของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินจะยึดเกาะกันดังรูปที่ 1 โดยเฮมิเซลลูโลสจะเชื่อมติดกับเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน และเชื่อมติดกับลิกนินด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Peng และคณะ, 2009)

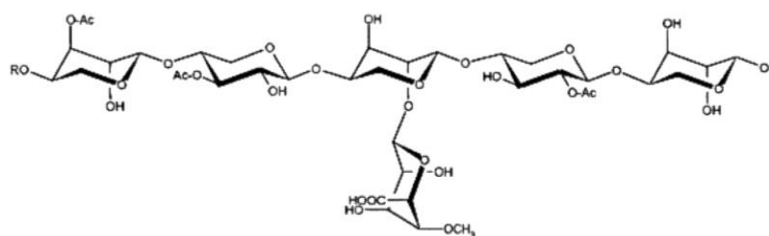


รูปที่ 1 การยึดเกาะกันของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Bidlack, 1992)

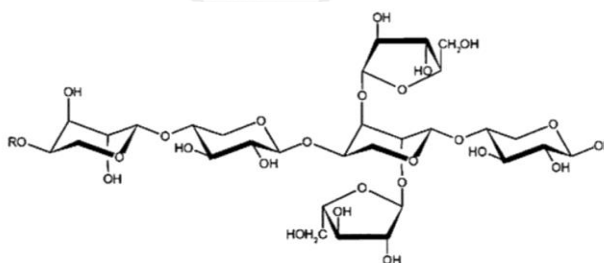
2.2 ไซแลน

ไซแลนเป็นโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็ง และพบมากในพืชปีเดียวและธัญพืช ได้แก่ ข้าว ข้าวฟ่าง อ้อย และข้าวโพด เป็นต้น (Ebringerova และ Heinze, 2000; Kayserilioğlu และคณะ, 2003) โครงสร้างของไซแลนประกอบด้วยหน่วยย่อยของไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะปีตา-1,4-ไซโลซิดิก (β -1,4-xylosidic linkage) เป็นไซหลัก และมีไซข้างเป็นน้ำตาลอะราบิโนส กรดกลูคูโรนิก หมู่อะซีทิล หรือสารประกอบฟีนอล ซึ่งจะเชื่อมต่อกับไซโลสในไซหลักที่ตำแหน่ง C2 และ C3 (Ebringerova และ Heinze, 2000) โครงสร้างของไซแลนในพืชชนิดต่างๆ จะมีไซข้างแตกต่างกัน เช่น ในไม้เนื้อแข็งพบกลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) ซึ่งมีหมู่อะซีทิลและกรดกลูคูโรนิกเป็นไซข้าง (รูปที่ 2) ในชั้นแป้งเอนโดสเปิร์ม (starchy endosperm) และชั้นรำ (bran)

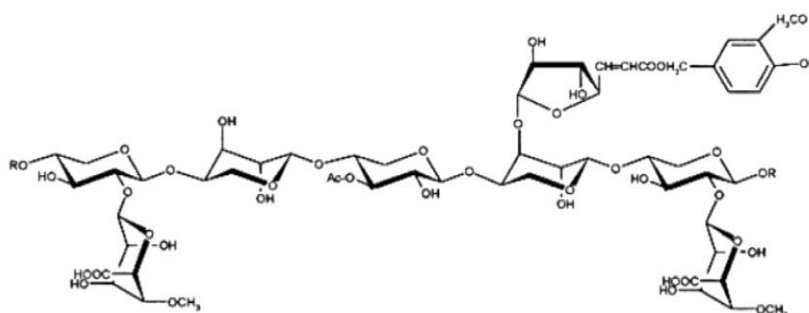
ของเมล็ดธัญพืชพบอะราบินโนไซแลน (arabinoxylan) ซึ่งมีน้ำตาลอะราบินโนสเป็นโซ่ข้าง (รูปที่ 3) ในหญ้าและชั้นรำของเมล็ดธัญพืชพบกลูคูโรนอะราบินโนไซแลน (glucuronoarabinoxylan) ซึ่งมีหมู่อะซีทิล กรดกลูคูโรนิก น้ำตาลอะราบินโนส และกรดเพอรูลิกเป็นโซ่ข้าง (รูปที่ 4) ในไม้เนื้ออ่อนพบอะราบินโนกลูคูโรนไซแลน (arabinoglucuronoxylan) ซึ่งมีกรดกลูคูโรนิกและน้ำตาลอะราบินโนสเป็นโซ่ข้าง (รูปที่ 5) นอกจากนี้ยังพบโฮโมไซแลน (homoxylan) ซึ่งไม่มีโซ่กิ่งในสาหร่ายทะเล และพบเฮเทอโรไซแลน (heteroxylan) ซึ่งมีโซ่กิ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดหรือออลิโกแซ็กคาไรด์ในรำของธัญพืช เมล็ดพืช และกัมจากยางพืช (ตารางที่ 1) (Ebringerová, 2005; Sedlmeyer, 2011)



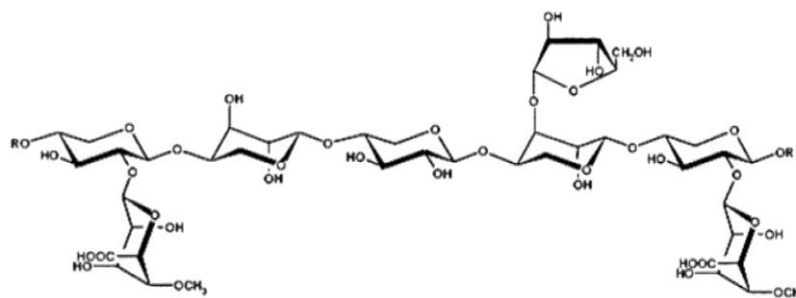
รูปที่ 2 โครงสร้างของกลูคูโรนไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Vazquez และคณะ, 2000)



รูปที่ 3 โครงสร้างของอะราบินโนไซแลนในรำข้าวสาลี (Vazquez และคณะ, 2000)



รูปที่ 4 โครงสร้างของกลูคูโรนอะราบินโนไซแลนในหญ้า (Vazquez และคณะ, 2000)



รูปที่ 5 โครงสร้างของอะราบินอกลูคูโรโนไซแลนในไม้เนื้ออ่อน (Vazquez และคณะ, 2000)

ตารางที่ 1 โครงสร้างของไซแลนชนิดต่างๆ

ชนิดของไซแลน	โซ่ข้าง	แหล่งที่มา
กลูคูโรโนไซแลน	หมู่อะซีทิล กรดกลูคูโรนิก	ไม้เนื้อแข็ง
อะราบินโนไซแลน	น้ำตาลอะราบินอส	ชั้นแป้งเอนโดสเปิร์ม และชั้นรำ ของเมล็ดธัญพืช
กลูคูโรโนอะราบินโนไซแลน	หมู่อะซีทิล กรดกลูคูโรนิก น้ำตาลอะราบินอส กรดเฟอร์ุลิก	หญ้า และชั้นรำของเมล็ดธัญพืช
อะราบินอกลูคูโรโนไซแลน	กรดกลูคูโรนิก น้ำตาลอะราบินอส	ไม้เนื้ออ่อน
ไฮโมไซแลน	-	สาหร่ายทะเล
เฮเทอโรไซแลน	น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อลิโกแซ็กคาไรด์	รำของธัญพืช เมล็ดพืช และกัมจากยางพืช

2.3 การย่อยไซแลน

2.3.1 การย่อยไซแลนด้วยกรด

การย่อยด้วยกรดเป็นการใช้กรดในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะในเฮมิเซลลูโลสสายยาวได้ เฮมิเซลลูโลสสายสั้นลงจนได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั้นไม่จำเพาะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น กรดอะซีติก รวมทั้งเฟอูฟิวราล (furfural) ซึ่งเป็นสารพิษ และเมื่อ

ย่อยชีวมวลที่ไม่ได้มีการกำจัดลิกนินออก จะมีส่วนย่อยของลิกนิน (lignin fragment) เกิดขึ้นร่วมด้วย นอกจากนี้การย่อยด้วยกรดยังมีต้นทุนสูงเนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์ที่ทำจากวัสดุทนการกัดกร่อนซึ่งมีราคาแพง และต้องมีค่าใช้จ่ายในการกำจัดสารพิษ (Wyman และคณะ, 2005; Chapla, Pandit และ Shah, 2012; Carvalho และคณะ, 2013)

2.3.2 การย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์

การย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกับสารตั้งต้นมากกว่าการย่อยด้วยกรด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า ไม่เกิดเฟอูฟิวรัล (furfural) ซึ่งเป็นสารพิษ นอกจากนี้ยังไม่ก่อให้เกิดปัญหาการกัดกร่อน จึงไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ (Chapla, Pandit และ Shah, 2012; Carvalho และคณะ, 2013) ในการย่อยไซแลนโดยสมบูรณ์อาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน (ตารางที่ 2) โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลักคือ

2.3.2.1 เอนไซม์ย่อยโซ่หลักของไซแลน

2.3.2.1.1 เอนโดไซแลเนส (endoxylanase, EC 3.2.1.8) จะสลายพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิกในโซ่หลักของไซแลนแบบสุ่มได้ออลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008)

2.3.2.1.2 เอกโซไซแลเนส (exoxylanase) จะสลายพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิกจากปลายรีดิวซ์ (reducing end) ในโซ่หลักของไซแลน หรือในไซโลอออลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อย 3 ตั้งแต่หน่วยขึ้นไป ได้ไซโลโบโอสและไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008; Tenkanen และคณะ, 2013)

2.3.2.1.3 บีตา-ไซโลซิเดส (β -xylosidase, EC 3.2.1.37) จะสลายพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิกจากปลายนอนรีดิวซ์ (non-reducing end) ของไซโลโบโอสและไซโลอออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008; Tenkanen และคณะ, 2013)

2.3.2.2 เอนไซม์ย่อยโซ่ข้างของไซแลน

2.3.2.2.1 แอลฟา-แอล-อะราบินอซิเดส (α -L-arabinosidase, EC 3.2.1.55) จะสลายพันธะแอลฟา-1,2- และแอลฟา-1,3- ที่เชื่อมระหว่างโซ่ข้างอะราบินอส์กับโซ่หลักของ

ไซแลนได้อะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Manin และคณะ, 1994; Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008)

2.3.2.2.2 แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (α -glucuronidase, EC 3.2.1.139) จะสลายพันธะแอลฟา-1,2-ที่เชื่อมระหว่างไซข้างกรดกลูคูโรนิก (4-O-methyl glucuronic acid) กับไซหลักของไซแลนได้อะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Whistler และ Richard, 1980; Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008)

2.3.2.2.3 อะซีทิล ไซแลน เอสเทอเรส (acetyl xylan esterase, EC 3.1.1.72) จะสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมระหว่างหมู่อะซีทิลกับไซหลักของไซแลนได้อะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย และทำให้เอนไซม์ที่ย่อยสลายไซหลักของไซแลนเข้าทำงานได้ดีขึ้น (Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008)

2.3.2.2.4 เฟอร์ูโลอิล เอสเทอเรส (feruloyl esterase, EC 3.1.1.73) จะสลายพันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมระหว่างอะราบินอสในไซข้างกับกรดเฟอร์ูอิลิกของลิกนินได้อะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย การทำงานของเอนไซม์นี้ช่วยให้ไซแลนเป็นอิสระจากลิกนิน และทำให้เอนไซม์ย่อยสลายไซแลนอื่นๆ เข้าทำงานได้ดีขึ้น (Howard และคณะ, 2004; Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008)

ตารางที่ 2 เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลน (Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008)

เอนไซม์	EC	พันธะที่ย่อยสลาย	สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์หลัก
เอนโดไซแลเนส	3.2.1.8	พันธะปีตา 1,4 ภายในโครงสร้าง	โซ่หลัก	อลิโกแซ็กคาไรด์
เอกโซไซแลเนส	n.c.	พันธะปีตา 1,4 ที่ปลายรีดิวซ์	โซ่หลัก	ไซโลส และไซโลไบโอส
ปีตา-ไซโลซิเดส	3.2.1.37	พันธะปีตา 1,4 ที่ปลายนอนรีดิวซ์	อลิโกแซ็กคาไรด์	ไซโลส
อะราบินซิเดส	3.2.1.55	พันธะแอลฟา-1,2 และแอลฟา-1,3 ที่เชื่อมระหว่างโซ่ข้าง กับโซ่หลัก	โซ่ข้าง	อะราบินอส
กลูคูโรนิเดส	3.2.1.139	พันธะแอลฟา-1,2 ที่เชื่อมระหว่างโซ่ข้าง กับโซ่หลัก	โซ่ข้าง	กรดกลูคูโรนิก
อะซีทิลไซแลน เอสเทอเรส	3.1.1.72	พันธะเอสเทอร์	โซ่ข้าง	กรดอะซีติก
เพอรูโลอิลเอส เทอเรส	3.1.1.73	พันธะเอสเทอร์	โซ่ข้าง	กรดเพอรูลิก

n.c.: ยังไม่มีกำหนด

2.4 *Aureobasidium pullulans*

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

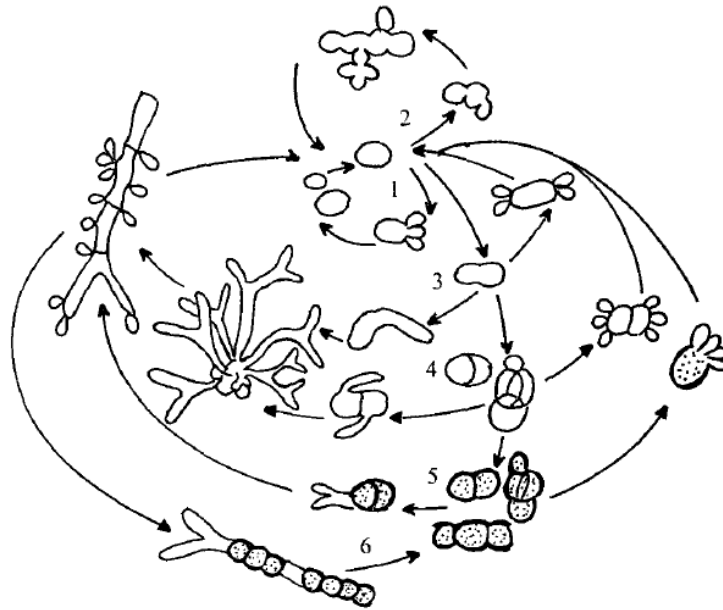
Class Dothideomycetes

Order Dothideales

Family Aureobasidaceae

Genus *Aureobasidium*Species *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans เป็นเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” (black yeast) เนื่องจากสามารถผลิตสารสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ จึงทำให้โคโลนีมีสีดำ (Lingappa, Sussman และ Bernstein, 1963) *A. pullulans* มีรูปร่างของเซลล์ได้หลายลักษณะ (polymorphic) ได้แก่ บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hyphae) และเส้นใยเทียม (pseudohyphae) ซึ่งมักขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (Ramos และ Acha, 1975) โดยลักษณะเหล่านี้จะปรากฏในระยะต่างๆ ของการเติบโต (รูปที่ 6) เมื่อเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหาร Malt extract agar (MEA) ส่วนใหญ่พบว่า ในระยะแรกโคโลนีของ *A. pullulans* จะมีลักษณะโคโลนีเรียบและเป็นเมือก มันวาว มีสีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เช่น สีชมพู สีส้ม สีเหลือง เมื่อเวลาผ่านไป โคโลนีจะเปลี่ยนแปลงมีลักษณะเหมือนกำมะหยี่ และเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียวมะกอก สีแดง เหลืองน้ำตาลอ่อนและดำ เป็นต้น มีเส้นใยสั้นๆ ขึ้นรอบๆ โคโลนี หลังจากนั้นอาจเปลี่ยนเป็นสีดำ เนื่องจากมีการผลิตเมลานิน และมีผนังหนาขึ้น เรียกว่า คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) (Hermandes-Nijhof, 1977) คลาไมโดสปอร์จะเชื่อมต่อกันเป็นโซ่ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของ *A. pullulans* เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเส้นใยมีลักษณะเรียบ โปร่งใส ผนังบาง และมีความกว้างของเส้นใยประมาณ 2-16 ไมโครเมตร (Deshpande, Rale และ Lynch, 1992)



รูปที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ *Aureobasidium pullulans* แบบต่างๆ (Ramos และ Acha, 1975)

- 1 บลาสโตสปอร์เกิดการแตกหน่อเพื่อสร้างบลาสโตสปอร์ใหม่
- 2 บลาสโตสปอร์เกิดการแตกหน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่ที่เชื่อมติดกันแบบไม่มีผนังกันเกิดเป็นเส้นใยเทียม หรือเกิดบลาสโตสปอร์ใหม่ที่หลุดออกเป็นอิสระ
- 3 บลาสโตสปอร์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์พอง ซึ่งสามารถเกิดการแตกหน่อได้ บลาสโตสปอร์ใหม่ เกิดการสร้างเส้นใยแท้แบบมีผนังกัน หรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์พองแบบมีผนังกัน
- 4 เซลล์พองแบบมีผนังกันสามารถเกิดการแตกหน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่ เกิดการสร้างเส้นใยแท้ หรือเกิดการสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น และมีสีเข้มขึ้น กลายเป็นเป็นคลาไมโดสปอร์
- 5 คลาไมโดสปอร์สามารถเกิดการแตกหน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่ หรือเกิดการสร้างเส้นใยแท้ ซึ่งเส้นใยแท้ก็สามารถเกิดการแตกหน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่ด้วยเช่นกัน
- 6 เส้นใยสร้างเมือสีและผนังเซลล์ให้หนาขึ้น กลายเป็นเป็นคลาไมโดสปอร์

การจัดจำแนก *A. pullulans* สามารถทำได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ สรีรวิทยา เช่น สัณฐานวิทยาของโคโลนี สัณฐานวิทยาของเซลล์ (Hermandes-Nijhof, 1977) การ

ใช้แหล่งอาหาร (Yurlova และ De Hoog, 1997) การสร้างเมลานิน (Dennis และ Buhagiar, 1973) การสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) (De Hoog และ Yurlova, 1994) การสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (Yurlova และ De Hoog, 1997) และลักษณะของเส้นใย (Takeo และ De Hoog, 1991) เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ประกอบการจัดจำแนก โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) (Yurlova, De Hoog และ Van den Ende, 1999; Punnapayak และคณะ, 2003) นอกจากนี้ Zalar และคณะ (2008) ยังได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ อีก 4 ตำแหน่งร่วมกับ ITS ได้แก่ partial large subunit of rDNA (LSU) β -tubulin (*TUB*) translation elongation factor (*EF1 α*) และ elongase (*ELO*) ทำให้สามารถจัดจำแนก *A. pullulans* ได้เป็น 4 varieties ได้แก่ *A. pullulans* var. *pullulans* *A. pullulans* var. *melanogenum* *A. pullulans* var. *aubasidani* และ *A. pullulans* var. *subglaciale* ซึ่งปัจจุบันได้มีการยกระดับ varieties ดังกล่าวขึ้นเป็นชนิด (Gostincar และคณะ, 2014)

Aureobasidium pullulans มีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลายในธรรมชาติ สามารถพบได้ทั้งในอากาศ (Punnapayak และคณะ, 2003) บนผิวใบไม้ (Ramos และ Acha, 1975; Prasongsuk และคณะ, 2005; Manitchotpisit และคณะ, 2009) ผลไม้ ในดิน (Ramos และ Acha, 1975) เศษฟาง หญ้าแห้ง (Cooke, 1959) ในฟองน้ำทะเล (Shigemori และคณะ, 1998) นาเกลือ (Gunde-Cimerman และคณะ, 2000) หิน (Urzi และคณะ, 1999) น้ำแข็งในทะเลเขตหนาว ทุ่งหญ้า พรุ น้ำจืด น้ำทะเล ดินตะกอนในทะเล (Zalar และคณะ, 2008) ผนังห้องน้ำ และผนังทาสี (Prasongsuk และคณะ, 2005; Lotrakul และคณะ, 2009) โดยสามารถพบได้ในหลากหลายสภาพภูมิอากาศ ทั้งในเขตร้อน ได้แก่ บราซิล อินเดีย จีน ไทย มาเลเซีย และจาไมกา เขตอบอุ่น ได้แก่ เยอรมัน แคนาดา เดนมาร์ก รัสเซีย สาธารณรัฐเช็ก ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ โปแลนด์ ออสเตรเลีย อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา เขตแห้งแล้งและแถบเมดิเตอร์เรเนียน ได้แก่ อิตาลี ฝรั่งเศส อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และอัฟริกาได้รวมทั้งเขตหนาว ได้แก่ อลาสกา แอนตาร์กติกา และชายฝั่งทะเลอาร์กติก (Gaur และคณะ, 2010)

การผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans*

A. pullulans สามารถผลิตไซแลเนสได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาวะที่ใช้ในการผลิต Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้รายงานถึงความสามารถในการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งสามารถผลิตไซแลเนสได้ในช่วง 7.70-94.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยใช้ oat spelt xylan เป็นแหล่งคาร์บอน และมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาถึงการใช้วัสดุอื่นๆ ที่มีราคาต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนแทนไซแลเนสบริสุทธิ์ Karni, Deopurkar และ Rale (1993) ได้ศึกษาการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* NCIM 1050 โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กากอ้อย ฟางข้าว ชี้อ้อย แกลบ รำข้าวสาลี พบว่าสามารถผลิตไซแลเนสได้ในช่วง 0.1-10.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Nasr และคณะ (2013) ได้รายงานถึงความสามารถในการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* SN090 ซึ่งสามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุด 2.73 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ beechwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อศึกษาการผลิตไซแลเนสโดยใช้ รำข้าว รำข้าวสาลี กากอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้รำข้าวสาลีให้ผลการผลิตไซแลเนสไม่แตกต่างจากการใช้ beechwood xylan Bankeeree และคณะ (2014) ได้ศึกษาการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* CBS 135684 โดยใช้ จมูกข้าวสาลี รำข้าวสาลี และซังข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเท่ากับ 4.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน และได้เสนอว่า แม้การใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิต จะได้แอกติวิตีของไซแลเนสน้อยกว่าการใช้ beechwood xylan 1.76 เท่า แต่ซังข้าวโพดเป็นวัสดุที่มีราคาต่ำ จึงจัดเป็นวัสดุที่น่าสนใจสำหรับใช้ในการผลิตไซแลเนส นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการผลิตไซแลเนสในภาวะ solid state fermentation โดย Leite และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตเฮมิเซลลูเลสในภาวะ solid state fermentation โดยใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเท่ากับ 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

ไซแลเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 20-25 kDa และสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ประมาณ 3.0-5.0 และในช่วงอุณหภูมิประมาณ 35-55 องศาเซลเซียส (Leathers, 1986; Li และคณะ, 1993; Vadi, Strohfus และ West, 1996; Verjans และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตาม Bankeeree และคณะ (2014) ได้รายงานถึง *A. pullulans* ที่ผลิตไซแลเนสที่ทนร้อน ซึ่งมีมวลโมเลกุล 72 kDa และสามารถทำงานได้ดีที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

จากรายงาน แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของไซแลนสที่มีแหล่งกำเนิดจาก *A. pullulans* ต่างสายพันธุ์

2.5 ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ คือน้ำตาลสายสั้นๆ ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยของไซโลสตั้งแต่ 2 ถึง 10 โมเลกุล แต่ละโมเลกุลของไซโลสเชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลซิดิก (β -1,4-xylosidic linkage) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_5nH_{8n+2}O_{4n+1}$ โดยที่ n มีค่าเท่ากับ 2 ถึง 6 (Aachary และ Prapulla, 2008) แหล่งที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ หน่อไม้ ผลไม้ ผัก นม และน้ำผึ้ง (Vazquez และคณะ, 2000) และสามารถผลิตได้จากการย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบในวัสดุลิกโนเซลลูโลสชนิดต่างๆ เช่น เปลือกข้าว รำข้าว ชังข้าวโพด เป็นต้น (Moure และคณะ, 2006)

การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีหลัก ได้แก่

1) การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้สารเคมี

การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้สารเคมี เป็นการย่อยไซแลนด้วยกรด ซึ่งมักจะทำให้เกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารพิษ เช่น เฟอร์ราล ในปริมาณมาก (Akpinar, Erdogan และ Bostanci, 2009) นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดปัญหาการกัดกร่อนของอุปกรณ์ (Jain, Kumar และ Satyanarayana, 2015) จากรายงานของ Akpinar, Erdogan และ Bostanci (2009) ซึ่งผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากไซแลนที่สกัดได้จากต้นยาสูบ ต้นฝ้าย ต้นทานตะวัน และฟางข้าวสาลี โดยใช้กรดซัลฟิวริก พบว่าเมื่อย่อยโดยใช้กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 0.25 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที จะได้ปริมาณของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุด โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 8-13% ของปริมาณไซแลนเริ่มต้น

2) การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยกระบวนการ autohydrolysis

Autohydrolysis เป็นวิธีการย่อยด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูง เช่น 140-200 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถทำให้เกิดการย่อยไซแลนได้ โดยที่อุณหภูมิสูงจะทำให้น้ำจะมีสภาวะเป็นกรดอ่อน และมีการปลดปล่อยหมู่อะซีทิลออกจากโครงสร้างของไซแลนซึ่งจะทำให้ระบบมีสภาวะเป็น

กรดมากขึ้น กรดที่เกิดขึ้นในระบบนี้จะเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะในโครงสร้างของไซแลน และได้เป็นไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ (Nabarlatz, Farriol และ Montané, 2005) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากวิธีการนี้จะเป็นอย่างไม่จำเพาะ จึงทำให้ได้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลหลากหลาย ซึ่งรวมถึงไซโลสด้วย และได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ เช่น ลิกนิน เป็นต้น แม้ว่าวิธีการนี้จะสามารถลดปัญหาการกีดกร่อนของอุปกรณ์ได้ แต่ก็ยังจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิและความดันสูงได้ (Vazquez และคณะ, 2000; Samanta และคณะ, 2015)

จากรายงานของ Chen และคณะ (2014) ซึ่งผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากหญ้ามิสแคนthusช้าง (*Miscanthus giganteus*) โดยกระบวนการ autohydrolysis พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาที่ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะได้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 13.5% ของน้ำหนักหญ้าเริ่มต้น

3) การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์

การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เป็นการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซแลเนสที่มีกลไกการย่อยสลายแบบเอนโด ซึ่งจะให้เกิดการสลายพันธะปีตา-1,4-ไซโลซิดิกในโครงสร้างของไซแลนแบบสุ่มได้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

จากรายงานของ Boonchuay และคณะ (2014) ได้ผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพด้วยต่าง โดยใช้เอนไซม์ไซแลเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces thermovulgaris* ที่ความเข้มข้น 129.43 ยูนิตต่อกรัมซังข้าวโพดที่ปรับสภาพแล้ว ทำปฏิกิริยาที่ 53.80 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.17 พบว่าได้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 16.30% ของน้ำหนักซังข้าวโพดเริ่มต้น

จากรายงานของ Li และคณะ (2012) ได้ผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จากไซแลนที่ได้จากซังข้าวโพด ต้นถั่ว และกากอ้อย ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ไซแลเนสที่ผลิตได้จาก *Streptomyces rameus* L2001 และผ่านการทำบริสุทธิ์ พบว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น 15.0% 10.5% และ 13.3% ของปริมาณไซแลนเริ่มต้น ตามลำดับ โดยมีไซโลไปโอส ไซโลไตรโอส ไซโลเตตระโอส และไซโลเพนตะโอส เกิดขึ้นในปริมาณที่ใกล้เคียง

กัน เมื่อย่อยไซแลนที่ได้จากซังข้าวโพดและกากอ้อย ส่วนการย่อยไซแลนที่ได้จากต้นถั่วจะมีเพียงไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสเกิดขึ้นเท่านั้น และมีปริมาณใกล้เคียงกัน

จากรายงานของ Samanta และคณะ (2012) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์จาก natural grass (*Sehima nervosum*) โดยทำการหาภาวะที่ทำให้ได้ไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสสูงสุด พบว่าจะได้ไซโลไบโอสสูงสุดเท่ากับ 11% เมื่อทำการผลิตที่ pH 5.03 อุณหภูมิ 45.19 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10.11 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 17.41 ยูนิต และจะได้ไซโลไตรโอสสูงสุดเท่ากับ 7.06% เมื่อทำการผลิตที่ pH 5.11 อุณหภูมิ 40.33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16.55 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 13.20 ยูนิต

2.6 프리ไบโอติก

ฟรีไบโอติก คือส่วนของอาหารที่ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร แต่สามารถกระตุ้นการเติบโตหรือกระตุ้นกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ได้ เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม bifidobacteria และ lactobacilli โดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ ซึ่งฟรีไบโอติกจะทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเติบโตของแบคทีเรียดังกล่าว (Gibson และ Roberfroind, 1995; Gibson และคณะ, 2004) ในธรรมชาติ สามารถพบฟรีไบโอติกได้ในนม น้ำผึ้ง ผัก และผลไม้ เช่น หัวหอม กระเทียม กล้วย มะเขือเทศ น้ำอ้อย ในปริมาณ 0.3-6.0% ของน้ำหนักสด (Aachary และ Prapulla, 2011) ฟรีไบโอติกส่วนใหญ่จะเป็นคาร์โบไฮเดรตสายสั้น ได้แก่ อินนูลิน (inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharides) ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharides) ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomaltooligosaccharides) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharides) แลคตูโลส (lactulose) (Rycroft และคณะ, 2001) และบีตากลูแคน (β -glucan) (Gardiner และคณะ, 2002; Snart และคณะ, 2006) ซึ่งนอกจากจะช่วยให้เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้แล้ว ยังช่วยลดอาการท้องผูก รักษาสมดุลน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย และช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี อีกด้วย (Bengmark, 2005) ในปัจจุบันมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ โดยการเติมสารที่จัดเป็นฟรีไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ มากมาย เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และเพื่อเป็นทางเลือกแก่ผู้บริโภคในการดูแลสุขภาพ ในการลดความเสี่ยงหรือป้องกันโรคหลายชนิด

2.7 โพรไบโอติก

โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งใช้เสริมในอาหาร มีประโยชน์ต่อร่างกายเนื่องจากสามารถควบคุมความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ได้ (Fuller, 1989) และสามารถปกป้องร่างกายไม่ให้ได้รับอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ (Gibson และ Roberfroid, 1995) จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกมีหลายชนิด เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* *L. casei* *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *L. reuteri* *L. brevis* *L. cellobiosus* *L. curvatus* *L. fermentum* *L. plantarum* *L. rhamnosus* *L. salivarius* *L. gasseri* *L. johnsonii* *L. helveticus* และ *L. farciminis* กลุ่ม bifidobacteria ได้แก่ *Bifidobacterium bifidum* *B. infantis* *B. longum* *B. thermophilum* *B. adolescentis* *B. lactis* *B. animalis* และ *B. breve* แบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* *Enterococcus faecium* *Lactococcus lactis* *Propionibacterium freudenreichii* *Escherichia coli* Nissle 1917 *Bacillus clausii* และ *Bacillus oligonitrophilus* รวมถึงยีสต์บางชนิด ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces boulardii* (Penner, Fedorak และ Madsen, 2005) โพรไบโอติกพบเป็นองค์ประกอบในอาหารหมักชนิดต่างๆ เช่น โยเกิร์ต ซีส ผักดอง ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองหมัก เป็นต้น (Guo, 2009)

เมื่อโพรไบโอติกเข้าสู่ลำไส้ จะเกิดการแข่งกับกับแบคทีเรียก่อโรคเพื่อแย่งพื้นที่ยึดเกาะและสารอาหารต่างๆ โพรไบโอติกสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย และกรดอินทรีย์ซึ่งทำให้ค่า pH ของสิ่งแวดล้อมลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผ่านระบบภูมิคุ้มกันโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง cytokine และกระตุ้นการหลั่ง IgA โพรไบโอติกสามารถลดความเป็นพิษในลำไส้โดยจับกับสารพิษที่เกิดจากการย่อยอาหารหรือจุลินทรีย์และกำจัดออก โพรไบโอติกมีบทบาทในการช่วยให้เยื่อและเนื้อเยื่อในลำไส้คงสภาพสมบูรณ์และสามารถทำงานได้อย่างปกติ โดยยับยั้งการสร้างสารก่อมะเร็ง กระตุ้นการหลั่งเมือกและการแบ่งเซลล์ของเยื่อบุลำไส้ และสร้างสารอาหาร ได้แก่ กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) และวิตามิน กรดไขมันสายสั้นเป็นแหล่งพลังงานหลักของเซลล์ผิวของลำไส้ใหญ่ (colonocyte) ซึ่งหากเซลล์ดังกล่าวลดจำนวนลงจะทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้ใหญ่ โพรไบโอติกสามารถสร้างเอนไซม์บางชนิดซึ่งช่วยในการย่อยสารอาหาร เช่น เอนไซม์แลกเทส (lactase) ที่ช่วยในการย่อยแลค

โทสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้ ทำให้บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ คลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเสีย ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายไม่สามารถย่อยแลคโทสเนื่องจากไม่มีเอนไซม์แลคเทส นอกจากนี้ โพรไบโอติกยังมีประโยชน์ต่อร่างกายในด้านอื่นๆ เช่น ลดคอเลสเตอรอลในน้ำเลือด ลดความดันโลหิต ลดอาการแพ้ ลดการติดเชื้อ และลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Guo, 2009)

Lactobacillus

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ จัดเป็น facultative anaerobe อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ พบเป็น normal flora ในร่างกายเช่น ในทางเดินอาหาร และช่องคลอด สามารถใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารอย่างแพร่หลาย เช่น การผลิตนมเปรี้ยว ซีส โยเกิร์ต เครื่องดื่ม ขนมปัง ผักหมัก และสามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกได้ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายประการ เช่น สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ ป้องกันอาการท้องร่วง ป้องกันการอักเสบของลำไส้ ลดอาการท้องผูก ลดอาการท้องเสียที่เกิดจากการที่ร่างกายขาดเอนไซม์แลคเทส และช่วยในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และพบในลำไส้ ได้แก่ *L. brevis* และ *L. casei* (Axelsson, 1998; Sultana และคณะ, 2000)

ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นสารที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) เนื่องจากไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร (Vazquez และคณะ, 2000) และสามารถกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย หรือแบคทีเรียโพรไบโอติก หลายชนิด เช่น *Bifidobacterium adolescentis* *B. bifidum* *Lactobacillus brevis* *L. plantarum* (Manisseri และ Gudipati, 2012) จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าไซโลไบโอสไม่ถูกย่อยสลายโดยน้ำลาย แพนครีเอติน (pancreatin) น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (gastric juice) และน้ำย่อยจากลำไส้เล็ก (brush border enzymes) (Okazaki และคณะ, 1991; Joo และคณะ, 1998) และไม่พบไซโลไบโอสในอุจจาระและปัสสาวะภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากรับประทาน ซึ่งแสดงว่าไซโลไบโอสถูกย่อยสลายในร่างกายโดยแบคทีเรียในทางเดินอาหาร (Okazaki และคณะ, 1991) ความสามารถในการใช้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ของ

แบคทีเรียจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด จากรายงานของ Moura และคณะ (2007) พบว่า *B. adolescentis* และ *L. brevis* สามารถใช้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในการเติบโตได้ดี โดย *B. adolescentis* สามารถใช้ทั้งไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส และไซโลเตตระโอสได้ ส่วน *L. brevis* นั้น จะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อให้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มี ไซโลไบโอสเป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ และ จากรายงานของ Gobinath และคณะ (2010) พบว่า เมื่อทดลองโดยให้หนูกินไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ ก็พบว่า *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ในลำไส้ใหญ่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มีประโยชน์จะช่วยให้การยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น *Clostridium perfringens* *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* เป็นต้น (Gibson และ Roberfroid, 1995) นอกจากนี้ ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ยังแสดงสมบัติอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น เสริมสร้างการทำงานของลำไส้ เพิ่มการดูดซึมแคลเซียม ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ลดไขมันและคลอเรสเตอรอล (Aachary และ Prapulla, 2011; Singh, Banerjee และ Arora, 2015)

เนื่องจากไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์มีสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย และยังมีเสถียรในช่วง pH กว้าง (2.5-8.0) มีกลิ่นรสที่ยอมรับได้ ไม่ทำให้ฟันผุ และให้พลังงานต่ำ จึงสามารถใช้ผสมในอาหารชนิดต่างๆ เช่น นมถั่วเหลือง นมผง เครื่องดื่ม โยเกิร์ต ลูกอม เค้ก เยลลี่ แยม และใช้เป็นอาหารสุขภาพสำหรับเด็กและผู้สูงอายุ Mumtaz และคณะ (2008) ได้ศึกษาการเสริมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในโยเกิร์ต พบว่าการเสริมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ไม่เกิน 3.5 % จะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพและรสชาติของโยเกิร์ต จากการศึกษาของ Okazaki, Fujikawa และ Matsumoto (1990) พบว่า เมื่อให้กลุ่มตัวอย่างเพศชาย อายุ 50-60 ปี บริโภคไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณ 1-2 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จะสามารถเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacteria* ได้ถึง 10-30 % จากรายงานของ Tateyama และคณะ (2005) พบว่า เมื่อให้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณ 4.2 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถลดอาการท้องผูกในสตรีมีครรภ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ Sheu และคณะ (2008) ได้รายงานว่าการบริโภคไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณ 4 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สามารถควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ชนิดที่ 2

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์

	บริษัท/ประเทศ
1. 10 kDa MW membrane cut-off Vivaflow 50	Sartorius/Germany
2. CHNS/O elemental analyzer รุ่น 2400 Series II	PerkinElmer/USA
3. Gel permeation chromatography (GPC) (model LC-10A dvp)	Shimadzu/USA
4. High performance liquid chromatography (model 2690)	Waters/USA
5. Mass spectrometer รุ่น Micromass Quattro Micro	Shimadzu/USA
6. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH 30 RF200	Olympus/Japan
7. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirrer) รุ่น C-MAG HS 10	Ika/Germany
8. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น SPL15	Labcon/The Republic of South Africa
9. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/Germany
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/USA
11. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dryer) รุ่น LL3000	Thermo Fisher Scientific/USA
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Rotofix32	Hettich/Germany
13. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	Scientific Industries/ USA
14. เครื่องระเหยสารภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) รุ่น N-N series	Tokyo Rikakikai Co., Ltd/Japan

- | | |
|---|---|
| 15. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
(UV/VIS spectrophotometer) รุ่น 2800 | Unico/USA |
| 16. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
(UV/VIS spectrophotometer) รุ่น HP 8453 | Agilent/USA |
| 17. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter) รุ่น PP-50 | Sartorius/Germany |
| 18. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV 123 | ISSOC/Thailand |
| 19. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) | Binder/Germany |
| 20. ตู้อบความร้อนสูง (hot air oven) | Memmert/Germany |
| 21. เตาเผาเถ้า (muffle furnace) | Fisher Scientific/UK |
| 22. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) | Ta Chang Medical
Instrument Factory/
Taiwan |
| 23. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) | Boeco/Germany |

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี

- | | |
|--|--------------------------------|
| 1. Acetic acid, glacial (CH ₃ COOH) | บริษัท/ประเทศ
Merck/Germany |
| 2. Acetone (C ₃ H ₆ O) | Qrec/ New Zealand |
| 3. Ammonium sulphate ((NH ₄) ₂ SO ₄) | Ajax/Australia |
| 4. L-asparagine (C ₄ H ₈ N ₂ O ₃) | Sigma/USA |
| 5. Beechwood xylan | Sigma/USA |
| 6. Beef extract | HiMedia/India |
| 7. Cetyl trimethylammonium bromide
(CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃ Br, CTAB) | Ajax/Australia |
| 8. Decahydronaphthalene (C ₁₀ H ₁₈) | Fluka/Switzerland |
| 9. 3, 5-dinitrosalicylic acid (C ₇ H ₄ N ₂ O ₇) | Sigma/USA |

10. Disodium ethylenediamine tetraacetate ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$, EDTA)	Vivantis/Malaysia
11. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck/Germany
12. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	Ajax/Australia
13. Ethanol, 95% (C_2H_5OH)	องค์การสุรากรม สรรพสามิต/ประเทศไทย
14. Ethanol, absolute (C_2H_5OH)	Merck/Germany
15. 2-Ethoxyethanol ($C_4H_{10}O_2$)	Merck/ Germany
16. Ferric nitrate nanohydrate ($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$)	Loba Chemie/India
17. Gas pack	Becton, Dickinson and Company Sparks/USA
18. Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Ajax/Australia
19. Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma/USA
20. Hydrochloric acid (HCl)	Ajax/Australi
21. Malt extract	HiMedia/India
22. Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Ajax/Australia
23. Manganese sulphate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	Merck/Germany
24. Oxalic acid dihydrate ($HO_2CCO_2H \cdot 2H_2O$)	Carlo Erba/Italy
25. Peptone	HiMedia/India
26. Phenol (C_6H_6O)	Merck/Germany
27. Potassium acetate ($C_2H_3KO_2$)	Ajax/Australia
28. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Ajax/Australia
29. Potassium permanganate ($KMnO_4$)	Merck/Germany
30. Potassium sodium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)	Ajax/Australia
31. Silver nitrate ($AgNO_3$)	Poch/Poland
32. Silver sulphate (Ag_2SO_4)	Carlo Erba/Italy

33. Skim milk	HiMedia/India
34. Sodium acetate trihydrate ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Ajax/Australia
35. Sodium bisulfite (NaHSO_3)	J.T.Baker/USA
36. Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	Ajax/Australia
37. Sodium borohydride (NaBH_4)	HiMedia/India
38. Sodium chloride (NaCl)	Ajax/Australia
39. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck/Germany
40. Sodium hydroxide (NaOH)	Ajax/Australia
41. Sodium lauryl sulphate ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$)	Ajax/Australia
42. Sodium nitrate (NaNO_3)	Ajax/Australia
43. Sodium sulfite (NaSO_3)	Scharlau/Spain
44. Sulfuric acid (H_2SO_4)	J.T.Baker/USA
45. Tertiary butyl alcohol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)	Panreac/Spain
46. Tri-ammonium citrate ($\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$)	Sigma/USA
47. Tween 80	Ajax/Australia
48. Xylobiose ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_9$)	Megazyme/ Ireland
49. Xylose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$)	Sigma/USA
50. Xylotriose ($\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$)	Megazyme/ Ireland
51. Yeast extract	HiMedia/India
52. Yeast nitrogen base	HiMedia/India
53. ถ่านกัมมันต์ (Activated charcoal)	Sigma/USA

3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งได้รับมาจาก Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, the United States Department of Agriculture และหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะ

วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย *Lactobacillus brevis* และ *L. casei* ซึ่งได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	สถาบัน
<i>Aureobasidium pullulans</i>	NRRL Y2311-1	Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, the United States Department of Agriculture
	NRRL 58516	
	NRRL 58519	
	NRRL 58522	
	NRRL 58523	
	NRRL 58525	
	NRRL 58526	
	NRRL 58527	
	NRRL 58528	
	NRRL 58529	
	NRRL 58536	
	NRRL 58538	
	NRRL 58540	
	NRRL 58541	
	NRRL 58542	
	NRRL 58544	
	NRRL 58547	
	NRRL 58550	
	NRRL 58551	
	NRRL 58552	
NRRL 58554		
NRRL 58557		
NRRL 58558		

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

จุลินทรีย์	สายพันธุ์	สถาบัน
<i>Aureobasidium pullulans</i>	AP 22	หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	AP 44	
	AP 46	
	AP 73	
	BCU 1	
	BCU 2	
	BCU 3	
	SR-5	
<i>Lactobacillus brevis</i>	TISTR 868	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
<i>Lactobacillus casei</i>	TISTR 390	

การเก็บ stock culture ทำโดยเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารสูตร Yeast Malt (YM) broth (Atlas, 1993) และเลี้ยง *L. brevis* และ *L. casei* ในอาหารสูตร de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (De Man, Rogosa และ Sharpe, 1960) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อในหลอด microcentrifuge โดยเติมสารละลายกลีเซอรอลให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20% (v/v) นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บระยะสั้น และเก็บรักษาด้วยวิธี lyophilization โดยใช้ skim milk เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% (w/v) สำหรับการเก็บระยะยาว

3.4 พืชที่ใช้ในงานวิจัย

พืชที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ หญ้าคา (*Imperata cylindrical* (L.) Raeusch.) หญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum* Schumach.) หญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) และ ผักตบชวา (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) ซึ่งได้จากการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ อำเภopakเกร็ด จังหวัดนนทบุรี ทำการเก็บรักษาตัวอย่างโดยตากแห้ง และอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การคัดเลือก *Aureobasidium pullulans*

3.5.1.1 การศึกษาการผลิตไซแลนเนส

ศึกษาความสามารถในการผลิตไซแลนเนสของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้จากประเทศไทย จำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งได้จาก Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, the United States Department of Agriculture และหน่วยปฏิบัติการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ และสายพันธุ์อ้างอิง (NRRL Y2311-1) ซึ่งได้จาก Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, the United States Department of Agriculture โดยเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารสูตร basal medium broth (Leathers, Kurtzman และ Detroy, 1984) ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ โดยปรับให้ความหนาแน่นเซลล์ของหัวเชื้อเท่ากับ 2.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรด้วยอาหารสูตร production medium ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 1% (v/v) ลงในอาหารสูตร production medium (Leathers, Kurtzman และ Detroy, 1984) สำหรับการผลิตไซแลนเนส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มี 1% (w/v) ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เก็บเอนไซม์หยาบโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ($3,000 \times g$) เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสไปตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลนเนส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลนเนสทำได้โดยบ่มเอนไซม์ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ในสารละลาย 1% (w/v) ไซแลนที่เตรียมใน 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยเติมสารละลาย dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 0.90 มิลลิลิตร และต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller, 1959) เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างจากสารละลายไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ

คำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ 1 ยูนิตเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายไซแลนให้ได้ไซโลสปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.5.1.2 การศึกษาความเสถียรของไซแลเนสที่อุณหภูมิห้อง

บ่มเอนไซม์หยาบจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดจากข้อ 3.5.1.1 ในสารละลาย 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลเนสทุกวัน จนครบ 7 วัน หาแอกติวิตีที่เหลือ (residual activity) โดยคิดแอกติวิตีเริ่มต้นของเอนไซม์เป็น 100% ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส

3.5.2.1 การศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ในอาหารสูตรพื้นฐาน (base medium)

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.1 ในอาหารสูตร production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี 1% (w/v) ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน นับเซลล์โดยใช้วิธี standard plate count และนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที (8,000 × g) เป็นเวลา 2 นาที ไปวัดแอกติวิตีของไซแลเนส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พร้อมทั้งสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเติบโตและการผลิตเอนไซม์เทียบกับเวลา เพื่อกำหนดเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์

3.5.2.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในอาหารสูตร production medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 1% (w/v) และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.67% (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว

150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวัดแอกติวิตีของไซแลเนสในเวลาที่มีการผลิตเอนไซม์สูงที่สุดตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.5.2.1 ในการทดลองนี้ทำการแปรผันแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด และแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด แหล่งคาร์บอนที่ศึกษาใช้เศษวัสดุทางการเกษตรที่มีมากในประเทศไทย ได้แก่ ชังข้าวโพด กากอ้อย และฟางข้าว ซึ่งเตรียมได้โดยนำเศษวัสดุดังกล่าวไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ให้เป็นผงละเอียดสม่ำเสมอ วิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในเศษวัสดุต่างๆ ตามวิธีของ (Goering และ Van Soest, 1970) สำหรับแหล่งไนโตรเจน เป็นสารอินทรีย์ 2 ชนิด และสารอนินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ แอล-แอสพาราจีน (L-asparagine) เปปโตน (peptone) โซเดียมไนเตรต (sodium nitrate) และแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ออกแบบการทดลองแบบ Factorial Design (FD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 16.0 (SPSS Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.5.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากข้อ 3.5.2.2 ที่ส่งผลให้มีการผลิตไซแลเนสได้สูงที่สุดมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในอาหารสูตร production medium ที่ปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน 5 ระดับความเข้มข้น เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวัดแอกติวิตีของไซแลเนสในเวลาที่มีการผลิตเอนไซม์สูงที่สุดตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.5.2.1 วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (X_1) และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (X_2) ซึ่งประกอบด้วย 12 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 4) และใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 6 (Stat-Ease Inc., US) จากนั้นตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตไซแลเนส

โดยนำค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลให้ผลิตไซแลเนสได้สูงสุดจากการคำนวณมาทำการทดลองซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบแอกติวิตีของไซแลเนสที่ได้กับค่าทำนายที่ได้จากสมการ

ตารางที่ 4 แผนการทดลองแบบ CCD ที่ใช้ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไซแลเนส

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		รหัสปัจจัย	
	คาร์บอน (%)	ไนโตรเจน (%)	X_1	X_2
1	5.00	1.20	+1	+1
2	5.41	0.80	+1.414	0
3	5.00	0.40	+1	-1
4	4.00	0.23	0	-1.414
5	3.00	0.40	-1	-1
6	2.59	0.80	-1.414	0
7	3.00	1.20	-1	+1
8	4.00	1.37	0	+1.414
9	4.00	0.80	0	0
10	4.00	0.80	0	0
11	4.00	0.80	0	0
12	4.00	0.80	0	0

3.5.2.4 การศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตไซแลเนส

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในความเข้มข้นที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากข้อ 3.5.2.3 ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 เก็บตัวอย่างมาวัดแอกติวิตีของไซแลเนสในเวลาที่มีการผลิตเอนไซม์สูงที่สุดตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.5.2.1 ออกแบบการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย

โปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.5.2.5 การศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลนของ *A. pullulans* ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (optimized medium)

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และ pH ที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน นับเซลล์โดยใช้วิธี standard plate count และนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ($8,000 \times g$) เป็นเวลา 2 นาที ไปวัดแอกติวิตีของไซแลนส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พร้อมทั้งสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเติบโตและการผลิตเอนไซม์เทียบกับเวลา เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์เมื่อผลิตในอาหารสูตรที่เหมาะสม

3.5.3 การเตรียมไซแลนและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของไซแลน

อบแห้งตัวอย่างพืช ได้แก่ หญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก และผักตบชวา ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร จนเป็นผงละเอียดสม่ำเสมอ นำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินตามวิธีของ (Goering และ Van Soest, 1970) จากนั้นสกัดไซแลนจากผงชีวมวลพืชโดยเติมสารละลาย 12% (w/v) NaOH ที่มี 1% (w/v) NaBH_4 ผสมกับผงชีวมวลพืชด้วยอัตราส่วน 1 (กรัม) : 25 (มิลลิลิตร) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เก็บส่วนใสและปรับ pH ให้เป็นกลางด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ก่อนจะนำไปตกตะกอนด้วย 95% (v/v) เอทานอลปริมาตรสามเท่า จากนั้นนำตะกอนไซแลนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Akpinar, Erdogan และ Bostanci (2009) และ Samanta และคณะ (2012)) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณปริมาณไซแลนที่สกัดได้ นำไซแลนที่สกัดได้ และ beechwood xylan มาวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยวิธี gel permeation chromatography (GPC) โดยใช้เครื่อง Shimadzu Class-VP V6.14 SP2 ที่บรรจุ Shodex PLgel column และใช้ refractive index detector ทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้

น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที (ส่งวิเคราะห์ที่วิทยาลัยปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ปริมาณไซแลนที่สกัดได้สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณไซแลน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของไซแลนที่สกัดได้ (g)} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืช (g)}}$$

$$\text{ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไซแลน (\%)} \times 100}{\text{ปริมาณเฮมิเซลลูโลส (\%)}}$$

3.5.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

3.5.4.1 การศึกษาชนิดของไซแลนที่เหมาะสม

เตรียมเอนไซม์หยาบให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นด้วยเครื่องอัลตราฟิลเตรชัน Viva Flow 25 (Sartorius, Germany) โดยใช้ membrane cut off ที่ 10,000 Da และทำแห้งเอนไซม์ด้วยวิธี lyophilization โดยแช่แข็งเอนไซม์ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งที่ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นนำเอนไซม์ดังกล่าวมาเตรียมเป็นสารละลาย โดยละลายในสารละลาย 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) แล้วนำไปย่อยไซแลนที่สกัดได้จากพืชทั้ง 4 ชนิดและ beechwood xylan โดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 U/g แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ย่อยที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสเพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid และตรวจสอบปริมาณ ไซโลส ไซโลไบโอส และ ไซโลไตรโอส ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่อง WATERS 2690 Separation Module ที่บรรจุ Thermo Hypersil APS-2 column และใช้ refractive index detector ทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้ 80% (v/v) acetonitrile เป็นเฟสเคลื่อนที่ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที (ส่งวิเคราะห์ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะ

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.5.4.2 การศึกษาปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

คัดเลือกชุดทดลองที่ให้ปริมาณรวมของไซโลโบโอสและไซโลไตรโอสสูงสุดมาหา ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ ในการย่อย ควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ย่อยที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำ เดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสเพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วาง แผนการทดลองแบบ CCD ที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ (X_1) และเวลาที่ใช้ใน การย่อย (X_2) ซึ่งประกอบด้วย 12 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 5) และใช้วิธีพินผิวตอบสนอง ใน การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยที่เหมาะสมต่อการผลิต ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 6 (Stat-Ease Inc., US) จากนั้นตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยนำค่าปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยที่ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดจากการคำนวณมาทำการ ทดลองซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้กับค่าทำนายที่ได้จากสมการ และ ตรวจสอบปริมาณไซโลส ไซโลโบโอส และไซโลไตรโอส ในไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งได้จาก การผลิตที่ภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 5 แผนการทดลองแบบ CCD ที่ใช้ในการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อย ต่อการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		รหัสปัจจัย	
	ปริมาณเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมไซแลน)	เวลา (ชั่วโมง)	X ₁	X ₂
1	34.00	120.00	+1	+1
2	37.31	96.00	+1.414	0
3	34.00	72.00	+1	-1
4	26.00	62.06	0	-1.414
5	18.00	72.00	-1	-1
6	14.69	96.00	-1.414	0
7	18.00	120.00	-1	+1
8	26.00	129.94	0	+1.414
9	26.00	96.00	0	0
10	26.00	96.00	0	0
11	26.00	96.00	0	0
12	26.00	96.00	0	0

3.5.5 การเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน

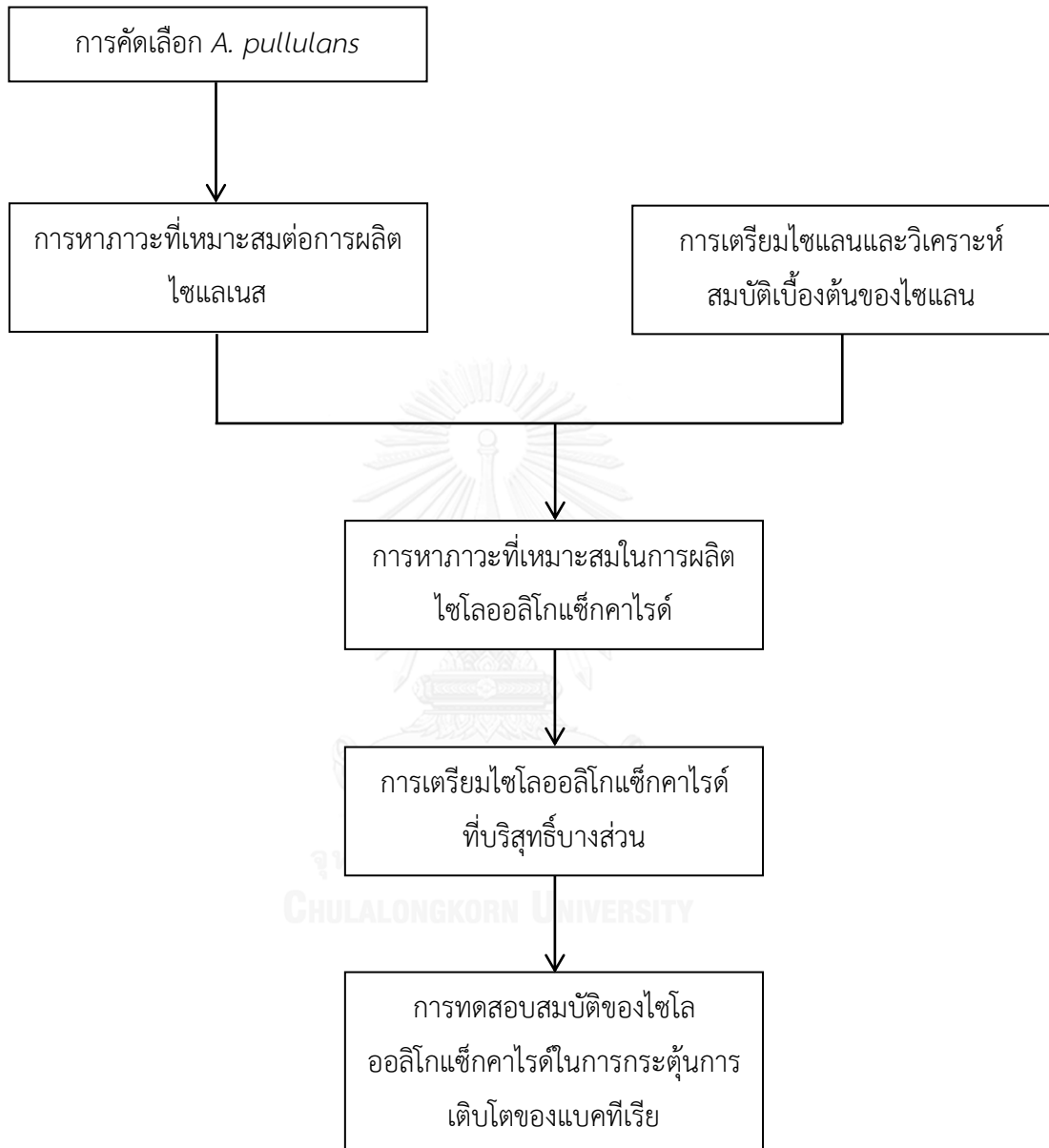
นำไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตในภาวะที่เหมาะสม ซึ่งได้จากข้อ 3.5.4 มาทำแห้งด้วยวิธี lyophilization จากนั้นเพิ่มความบริสุทธิ์โดยการกรองผ่านถ่านกัมมันต์เริ่มจากละลายไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในน้ำกลั่น จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2% (w/v) แล้วเติมถ่านกัมมันต์ จนความเข้มข้นของถ่านกัมมันต์เท่ากับ 20% ผสมด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมากรองผ่าน filter crucible Por. 3 ขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไซโลสด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงชะด้วย 15% (v/v) เอทานอล ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ เพื่อทำการแยกไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ออกจากกัน นำส่วนใสของเอทานอลไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้ง และทำแห้งด้วยวิธี lyophilization (ดัดแปลงจาก Pellerin และคณะ (1991), Wang และ Lu (2013) และ Chen และคณะ (2014)) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry โดยใช้ mass

spectrometer แบบ ESI รุ่น Micromass Quattro Micro โหมด Electrospray positive โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย

3.5.6 การทดสอบสมบัติของไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย

ศึกษาสมบัติของไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *L. brevis* และ *L. casei* โดยเลี้ยงในอาหารสูตร MRS broth ที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อมาวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับค่า OD₆₀₀ ให้เท่ากับ 0.1 โดยเจือจางด้วย MRS broth ถ้ายหัวเชื้อที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์แล้วปริมาณ 1% (v/v) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS broth ซึ่งทำการแปรผันสารที่เติมเพิ่มลงไปในการได้แก่ กลูโคส ไซโลส ไซแลน ไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ ไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ ปีตากลูแคนจากยีสต์ (food grade) (บริษัท โปรโนวา แลบบอราทอรีส์ จำกัด, ประเทศไทย) และชุดควบคุมซึ่งไม่เติมสารเพิ่ม โดยควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 2 mg C/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่งและไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเติบโตของแบคทีเรียด้วยการนับเซลล์โดยวิธี standard plate count ออกแบบการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

แผนผังการทดลอง



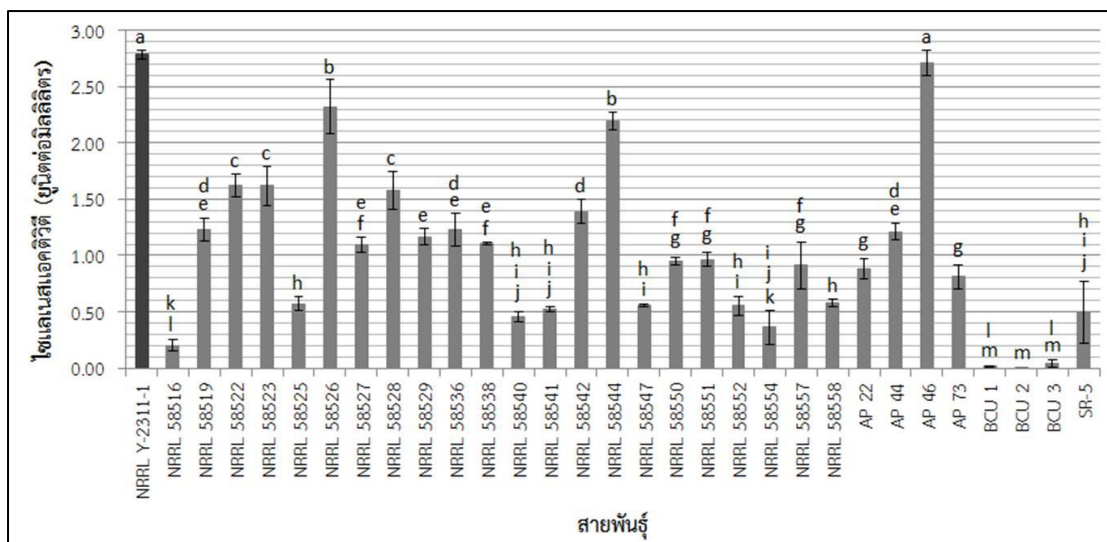
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือก *Aureobasidium pullulans*

4.1.1 การศึกษาการผลิตไซแลนเนส

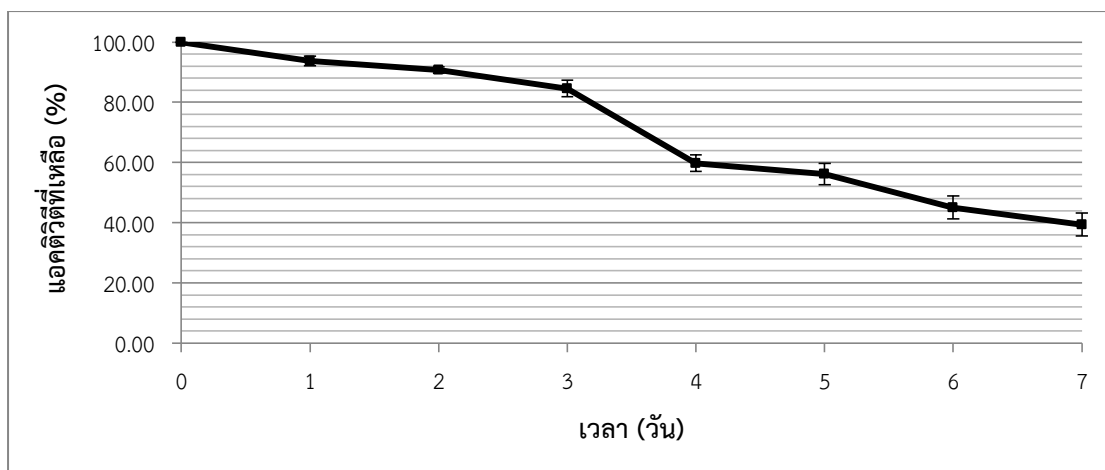
เมื่อนำ *A. pullulans* มาเลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่มี 1% (w/v) ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน แล้วตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลนเนสที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง พบว่า *A. pullulans* แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตไซแลนเนสได้แตกต่างกัน สายพันธุ์ AP 46 สามารถผลิตไซแลนเนสได้สูงสุด โดยให้แอกติวิตีเท่ากับ 2.70 ± 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากสายพันธุ์อ้างอิง NRRL Y2311-1 ที่ให้แอกติวิตีเท่ากับ 2.78 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ NRRL 58526 และ NRRL 58544 ให้แอกติวิตีของไซแลนเนสรองลงมาเท่ากับ 2.32 ± 0.25 และ 2.19 ± 0.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สายพันธุ์อื่นๆ ให้แอกติวิตีของไซแลนเนสอยู่ในช่วง 0.02-1.62 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วน BCU 2 นั้นเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตไซแลนเนส (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ไซแลเนสแอกติวิตีจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ หลังจากเลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่มี 1% (w/v) ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.1.2 การศึกษาความเสถียรของไซแลเนสที่อุณหภูมิห้อง

ทำการศึกษาความเสถียรของไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุด โดยบ่มเอนไซม์หยาบในสารละลาย 50 mM Sodium phosphate buffer pH 7 ที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบแอกติวิตีทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 มีความเสถียรสูงที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง โดยสามารถตรวจพบแอกติวิตีมากกว่า 80% เมื่อบ่มเอนไซม์นาน 3 วัน หลังจากบ่มเอนไซม์นาน 4 วัน พบว่าแอกติวิตีลดลงเหลือ 60% และค่อยๆ ลดลงเหลือ 40% เมื่อบ่มครบ 7 วัน (รูปที่ 8)

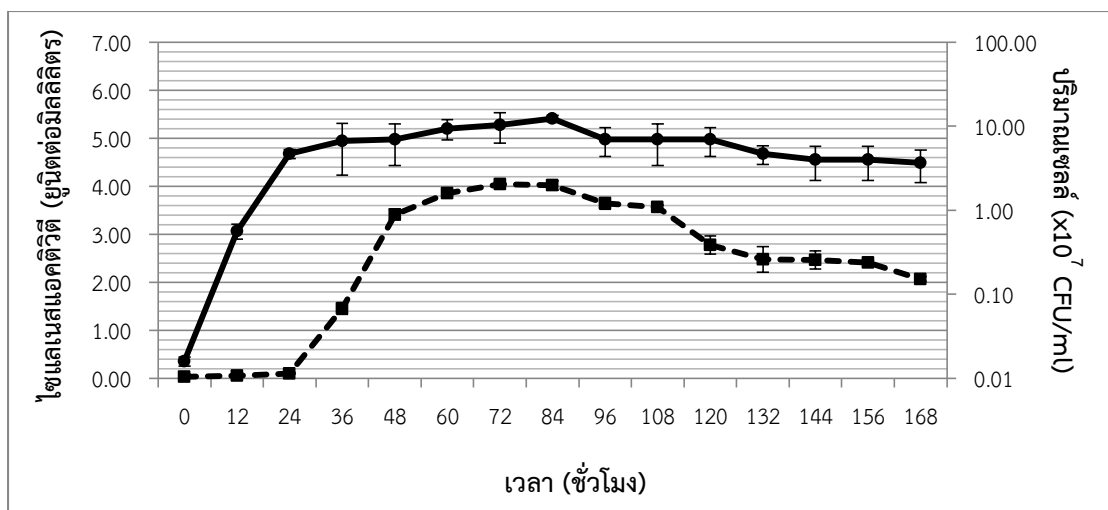


รูปที่ 8 แอกติวิตีที่เหลือของไซแลเนสที่ผลิตจาก *A. pullulans* AP 46 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ pH 7 และ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส

4.2.1 การศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ในอาหารสูตรพื้นฐาน (base medium)

จากผลการศึกษาในข้อ 4.1 พบว่า *A. pullulans* AP 46 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไซแลเนสซึ่งมีความเสถียรและสามารถทำงานได้ดีที่ pH 7 และ อุณหภูมิห้อง จึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาทำการศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสในอาหารพื้นฐาน ซึ่งก็คืออาหารสูตร production medium ที่มีซังข้าวโพดเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเก็บตัวอย่างเอนไซม์มาตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลเนสทุก 12 ชั่วโมง พบว่า *A. pullulans* AP 46 ให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 4.05 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง และจากการตรวจสอบการเติบโตโดยนับเซลล์ด้วยวิธี standard plate count พบว่า *A. pullulans* AP 46 มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 0-24 ชั่วโมง และ ปริมาณเซลล์เริ่มคงที่เมื่อทำการเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 9)

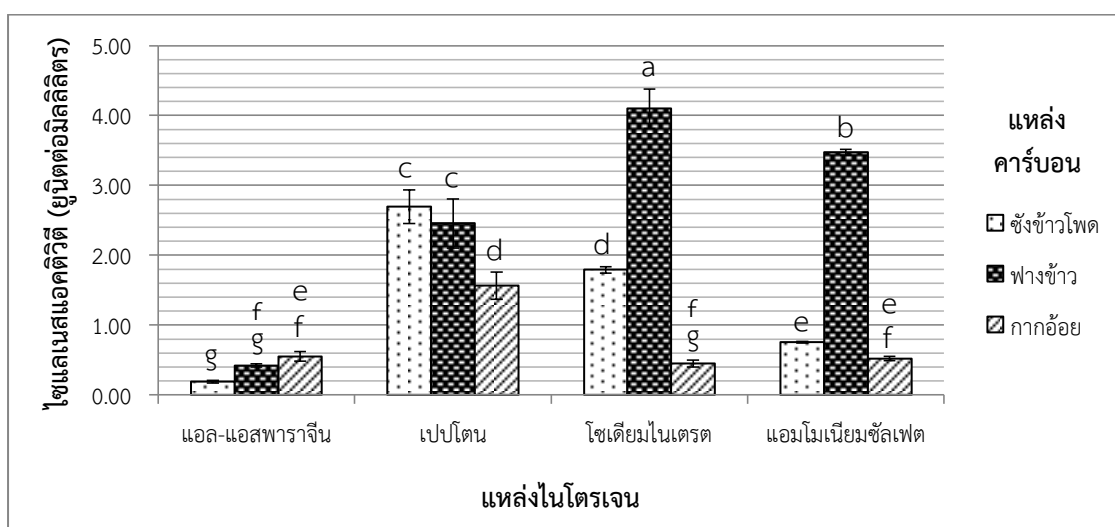


รูปที่ 9 การเติบโตและการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* AP 46 ในอาหารสูตรพื้นฐาน บนเครื่องเขยาที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ● แสดงปริมาณเซลล์ ($\times 10^7$ CFU/ml) และ ■ แสดงไซแลเนสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลเนส โดยเลี้ยง *A. pullulans* AP 46 ในอาหารสูตร production medium ที่แปรผันชนิดของคาร์บอนเป็น ชั่งข้าวโพด ฟางข้าว และกากอ้อย ที่ความเข้มข้น 1% (w/v) และชนิดของไนโตรเจนเป็น แอล-แอสพาราจिन เปปโตน โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.67% (w/v) เก็บเอนไซม์ที่เวลา 72 ชั่วโมง ตามข้อมูลที่ได้จากข้อ 4.2.1 แล้วนำมาตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลเนส พบว่า *A. pullulans* AP 46 สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดในอาหารที่มีฟางข้าวและโซเดียมไนเตรต ซึ่งให้แอกติวิตีเท่ากับ 4.10 ± 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ อาหารที่มีฟางข้าวและแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งให้แอกติวิตีเท่ากับ 3.47 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อาหารที่มีชั่งข้าวโพดและเปปโตน ซึ่งให้แอกติวิตีเท่ากับ 2.70 ± 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มีฟางข้าวและเปปโตน ซึ่งให้แอกติวิตีเท่ากับ 2.46 ± 0.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสูตรอาหารอื่นๆ พบว่าทำให้ *A. pullulans* AP 46 ผลิตไซแลเนสได้ต่ำกว่า 2.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 10) ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ

เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในวัสดุต่างๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าซังข้าวโพด ฟางข้าว และกากอ้อย มีองค์ประกอบของเซลลูโลสเท่ากับ $28.79 \pm 0.51\%$ $34.05 \pm 0.50\%$ และ $36.77 \pm 0.23\%$ เฮมิเซลลูโลสเท่ากับ $41.60 \pm 0.59\%$ $30.94 \pm 0.26\%$ และ $27.86 \pm 1.15\%$ และลิกนินเท่ากับ $6.29 \pm 0.38\%$ $3.79 \pm 0.28\%$ และ $9.62 \pm 0.50\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)



รูปที่ 10 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตไซแลนเนสของ *A. pullulans* AP 46 เมื่อเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในแหล่งคาร์บอนที่ใช้สำหรับผลิตไซแลนเนส

ชนิด	องค์ประกอบ (%)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ซังข้าวโพด	28.79 ± 0.51	41.60 ± 0.59	6.29 ± 0.38
ฟางข้าว	34.05 ± 0.50	30.94 ± 0.26	3.79 ± 0.28
กากอ้อย	36.77 ± 0.23	27.86 ± 1.15	9.62 ± 0.50

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาในข้อ 4.2.2 พบว่าฟางข้าวและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* AP 46 ดังนั้นจึงเลือกฟางข้าวและโซเดียมไนเตรตมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยเลี้ยง *A. pullulans* AP 46 ในอาหารสูตร production medium ที่ปรับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนด้วยแผนการทดลองแบบ CCD โดยมีค่าแอกติวิตีของไซแลเนสเป็นค่าตอบสนอง (ตารางที่ 7) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนกับแอกติวิตีของไซแลเนส โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 6 (Stat-Ease Inc., USA) จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ

$$Y = -0.19990 + 2.05944X_1 + 2.87266 X_2 - 0.30606 X_1^2 - 3.01133 X_2^2 + 0.42500 X_1X_2$$

โดย Y คือ แอกติวิตีของไซแลเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

X_1 คือ ความเข้มข้นของฟางข้าว (%)

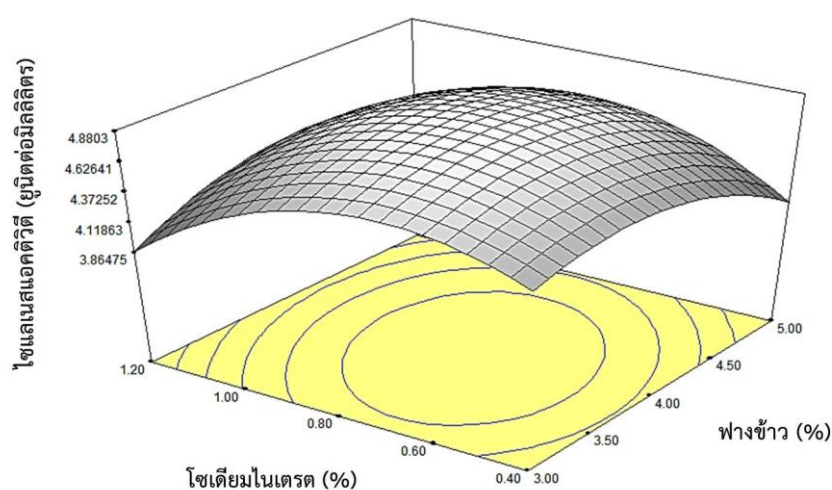
X_2 คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรต (%)

และมี coefficient of determination หรือ R^2 เท่ากับ 0.95 แสดงว่าสมการดังกล่าวอธิบายความแปรปรวนของตัวแปร X ได้ 95%

จากค่าตอบสนอง สามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (contour plot) (รูปที่ 11) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้แอกติวิตีของไซแลเนสสูงสุด และสามารถทำนายได้ว่า เมื่อปรับความเข้มข้นของฟางข้าวเท่ากับ 3.89% (w/v) และโซเดียมไนเตรตเท่ากับ 0.75% (w/v) จะทำให้ได้แอกติวิตีของไซแลเนสสูงสุดที่ 4.88 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการทดลองซ้ำที่ภาวะดังกล่าว พบว่า *A. pullulans* AP 46 สามารถผลิตไซแลเนสได้ 5.19 ± 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าทำนายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.06$) แสดงว่าสามารถนำสมการที่ได้มาใช้ในการอธิบายการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 ได้อย่างแม่นยำ

ตารางที่ 7 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนอง (แอกติวิตีของไซแลเนส) ต่อปัจจัยที่ศึกษา สำหรับการศึกษาคความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans*

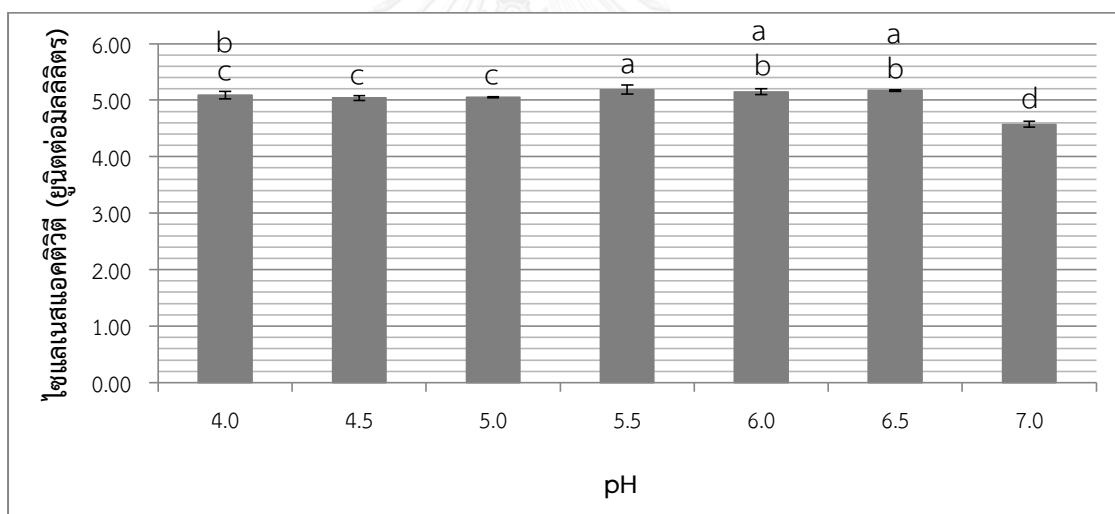
ชุดการทดลอง	ปัจจัย		รหัสปัจจัย		แอกติวิตีของไซแลเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
	ฟางข้าว (%)	โซเดียมไนเตรด (%)	X ₁	X ₂	
1	5.00	1.20	+1	+1	4.09
2	5.41	0.80	+1.414	0	4.25
3	5.00	0.40	+1	-1	3.85
4	4.00	0.23	0	-1.414	4.20
5	3.00	0.40	-1	-1	4.25
6	2.59	0.80	-1.414	0	4.44
7	3.00	1.20	-1	+1	3.81
8	4.00	1.37	0	+1.414	3.79
9	4.00	0.80	0	0	4.95
10	4.00	0.80	0	0	4.81
11	4.00	0.80	0	0	4.96
12	4.00	0.80	0	0	4.77



รูปที่ 11 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟางข้าวและโซเดียมไนเตรดต่อการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46

4.2.4 การศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตไซแลเนส

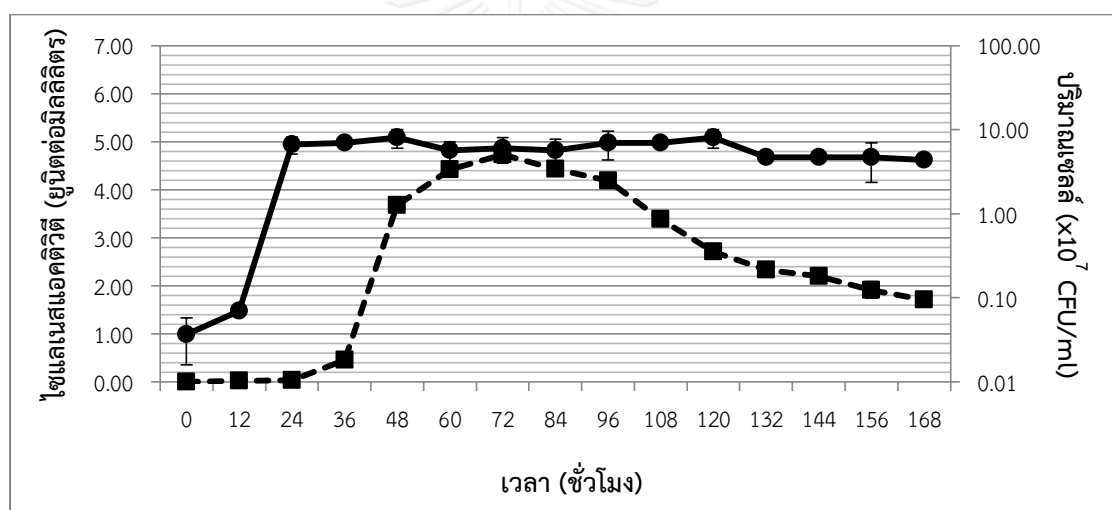
จากการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นในอาหารต่อการผลิตไซแลเนส โดยเลี้ยง *A. pullulans* AP 46 ในอาหารที่มีฟางข้าว 3.89% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรท 0.75% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า *A. pullulans* AP 46 ให้แอกติวิตีของไซแลเนสสูงสุดที่ 5.19 ± 0.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.5 รองลงมาได้แก่อาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 6.5 6.0 4.0 5.0 และ 4.5 ซึ่งให้ค่าแอกติวิตีไม่แตกต่างจากอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 7.0 นั้นให้ค่าแอกติวิตีต่ำสุดที่ 4.57 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 ผลของ pH ต่อการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 เมื่อเลี้ยงที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.2.5 การศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ในอาหารสูตรที่เหมาะสม (optimized medium)

เมื่อเลี้ยง *A. pullulans* AP 46 ในอาหารสูตรที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยฟางข้าว 3.89% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรต 0.75% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 5.5 เก็บตัวอย่างเอนไซม์มาตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลเนสทุก 12 ชั่วโมง พบว่า *A. pullulans* AP 46 ให้แอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 4.73 ± 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง และจากการตรวจสอบการเติบโตโดยนับเซลล์ด้วยวิธี standard plate count พบว่า *A. pullulans* AP 46 มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วง 0-24 ชั่วโมง และปริมาณเซลล์เริ่มคงที่เมื่อทำการเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 การเติบโตและการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* AP 46 ในอาหารสูตรที่เหมาะสม บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ● แสดงปริมาณเซลล์ ($\times 10^7$ CFU/ml) และ ■ แสดงไซแลเนสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3 การเตรียมไซแลเนสและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของไซแลเนส

จากการวิเคราะห์ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก และผักตบชวา พบว่ามีองค์ประกอบของเซลลูโลสเท่ากับ $34.20 \pm 1.23\%$ $30.67 \pm 0.70\%$

30.74±0.34% และ 24.88±0.65% เฮมิเซลลูโลสเท่ากับ 33.64±0.67% 32.98±0.54% 36.15±0.53% และ 21.82±0.50% ลิกนินเท่ากับ 5.59±0.79% 3.48±0.27% 5.03±0.44% และ 2.90±0.30% ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

เมื่อทำการสกัดไซแลนจากพืชดังกล่าว พบว่าสามารถสกัดไซแลนจากหญ้าเนเปียร์ได้ใน ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 28.33±3.33% ซึ่งเมื่อคำนวณเป็นปริมาณไซแลนสัมพัทธ์โดยเทียบกับปริมาณ เฮมิเซลลูโลสในพืชจะได้เท่ากับ 85.91±10.09% รองลงมาได้แก่ หญ้าคา และหญ้าแฝก ซึ่งให้ปริมาณ ไซแลนเท่ากับ 23.17±2.75% (ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์เท่ากับ 68.87±8.19%) และ 21.00±1.80% (ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์เท่ากับ 58.09±4.99%) ตามลำดับ ส่วนผักตบชวานั้นให้ปริมาณไซแลนน้อย ที่สุดเท่ากับ 10.50±0.50% (ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์เท่ากับ 48.12±2.29%) (ตารางที่ 9)

เมื่อวิเคราะห์มวลโมเลกุลของไซแลนที่สกัดได้จากพืชทั้ง 4 ชนิด และ beechwood xylan มาตรฐาน ด้วยวิธี gel permeation chromatography พบว่าไซแลนที่สกัดได้มีมวลโมเลกุลสูง และ มีรูปแบบการกระจายของมวลโมเลกุลที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยปริมาณของไซแลนในแต่ละ ตัวอย่างจะแปรผันตรงกับพื้นที่ใต้สัญญาณของโครมาโตแกรมที่ได้ (ตารางที่ 10) (รูปที่ 14 A-E) ไซแลนจากหญ้าคา มีการกระจายของมวลโมเลกุลในช่วง 2,100-22,584,000 กรัมต่อโมล โดยมีมวล โมเลกุลส่วนใหญ่ประมาณ 32,900 1,076,600 และ 5,089,400 กรัมต่อโมล (รูปที่ 14 A) ไซแลนจาก หญ้าเนเปียร์มีการกระจายของมวลโมเลกุลเป็นสองช่วงคือ 8,000-143,200 และ 251,300- 19,622,300 กรัมต่อโมล โดยมีมวลโมเลกุลส่วนใหญ่ประมาณ 16,100 และ 1,024,900 กรัมต่อโมล (รูปที่ 14 B) ไซแลนจากหญ้าแฝกก็มีการกระจายของมวลโมเลกุลเป็นสองช่วงเช่นกันคือ 2,600- 108,100 และ 251,300-19,622,300 กรัมต่อโมล โดยมีมวลโมเลกุลส่วนใหญ่ประมาณ 1,138,900 และ 4,215,600 กรัมต่อโมล (รูปที่ 14 C) ไซแลนจากผักตบชวามีการกระจายของมวลโมเลกุลในช่วง 1,200-34,431,000 กรัมต่อโมล โดยมีมวลโมเลกุลส่วนใหญ่ประมาณ 4,058,600 กรัมต่อโมล (รูปที่ 14 D) สำหรับมวลโมเลกุลของ beechwood xylan พบว่ามีการกระจายอยู่ในช่วง 108,100- 29,915,700 กรัมต่อโมล โดยมีมวลโมเลกุลส่วนใหญ่ประมาณ 436,000 กรัมต่อโมล (รูปที่ 14 E) นอกจากนี้ ยังพบองค์ประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำประมาณ 430 กรัมต่อโมล ในไซแลนจากพืชทุกชนิด

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในหญ้าชนิดต่างๆ และผักตบชวา

ชนิด	องค์ประกอบ (%)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
หญ้าคา	34.20±1.23	33.64±0.67	5.59±0.79
หญ้าเนเปียร์	30.67±0.70	32.98±0.54	3.48±0.27
หญ้าแฝก	30.74±0.34	36.15±0.53	5.03±0.44
ผักตบชวา	24.88±0.65	21.82±0.50	2.90±0.30

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 9 ปริมาณไซแลนที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ

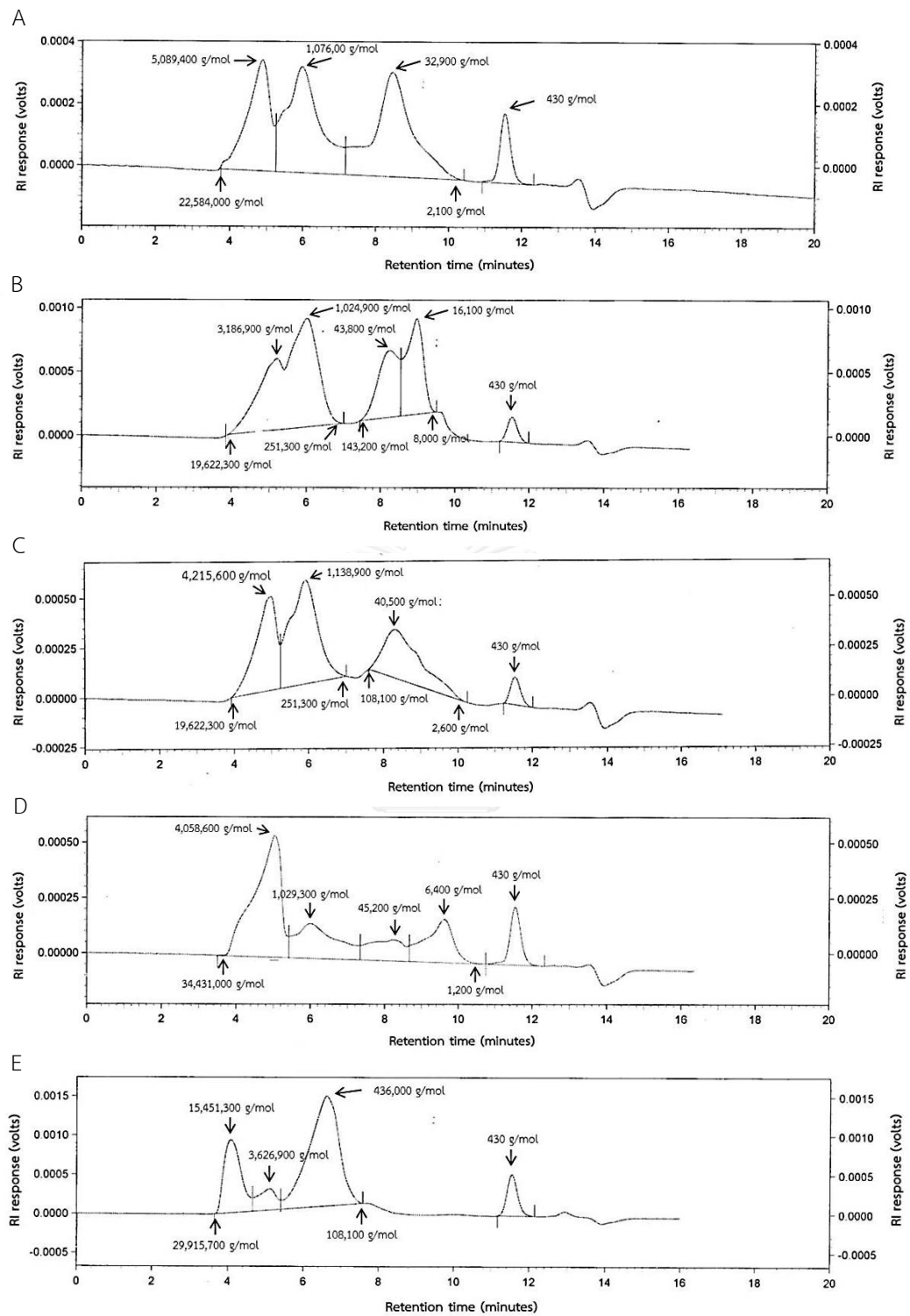
ชนิด	ปริมาณไซแลน (%)	ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์ (%)*
หญ้าคา	23.17±2.75	68.87±8.19
หญ้าเนเปียร์	28.33±3.33	85.91±10.09
หญ้าแฝก	21.00±1.80	58.09±4.99
ผักตบชวา	10.50±0.50	48.12±2.29

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์คือ ปริมาณไซแลนที่สกัดได้เมื่อเทียบกับปริมาณเฮมิเซลลูโลสในตัวอย่าง

ตารางที่ 10 สัญญาณมวลโมเลกุลของไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี gel permeation chromatography

แหล่งของไซแลน	สัญญาณมวลโมเลกุล (molecular weight, g/mol)
หญ้าคา	428.14
	32,916.75
	1,076,632.54
	5,089,440.01
หญ้าเนเปียร์	429.34
	16,139.63
	43,848.93
	1,024,943.68
	3,186,937.16
หญ้าแฝก	431.76
	40,529.48
	1,138,905.00
	4,215,634.98
ผักตบชวา	426.34
	6,445.21
	45,162.66
	1,029,275.18
	4,058,630.36
Beechwood	427.54
	436,029.63
	3,626,932.72
	15,451,299.12

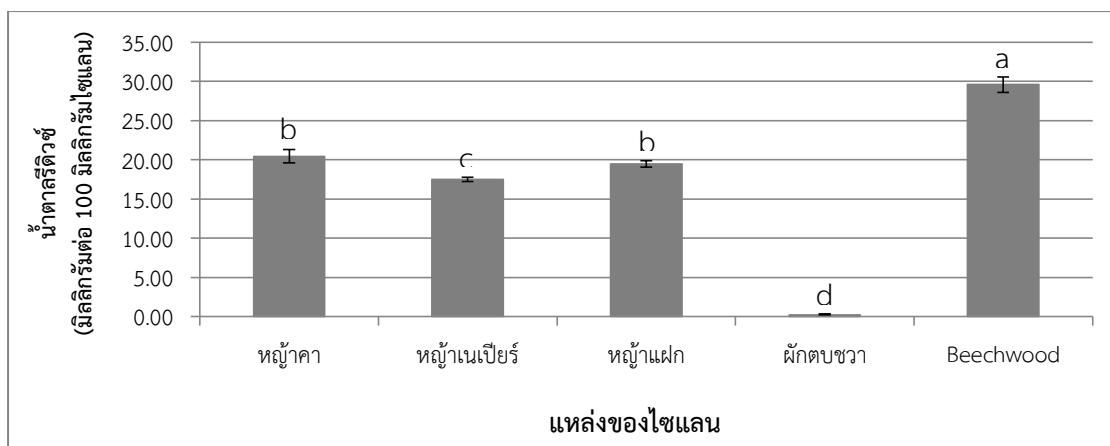


รูปที่ 14 GPC chromatogram ของไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคา (A) ไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าเนเปียร์ (B) ไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าแฝก (C) ไซแลนที่สกัดได้จากผักตบชวา (D) beechwood xylan (E)

4.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

4.4.1 การศึกษาชนิดของไซแลนที่เหมาะสม

เมื่อทำการย่อยสลายไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ด้วยเอนไซม์หยาบที่เตรียมได้ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมงโดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าการย่อย beechwood xylan ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 29.58 ± 0.98 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน รองลงมาได้แก่ การย่อยไซแลนจากหญ้าคา หญ้าแฝก และหญ้าเนเปียร์ ซึ่งให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.44 ± 0.84 19.44 ± 0.40 และ 17.50 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ตามลำดับ โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยไซแลนจากหญ้าคาและหญ้าแฝกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการย่อยไซแลนจากผักตบชวานั้นให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดเท่ากับ 0.23 ± 0.12 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน (รูปที่ 15) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไซแลนจากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก และผักตบชวา ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าการย่อยไซแลนจากหญ้าแฝกให้ปริมาณรวมของไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสสูงสุด โดยมีปริมาณไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสเท่ากับ 5.65 ± 0.18 และ 3.02 ± 0.18 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ตามลำดับ และพบไซโลสในปริมาณเล็กน้อยเพียง 0.30 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน รองลงมาได้แก่การย่อยไซแลนจากหญ้าคาและหญ้าเนเปียร์ ซึ่งให้ปริมาณของไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการย่อยไซแลนจากผักตบชวานั้นพบว่าไม่มีน้ำตาลทั้งสามชนิดดังกล่าวเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม การย่อย beechwood xylan ให้ปริมาณไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อยไซแลนจากพืชชนิดอื่นๆ โดยมีปริมาณของไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสเท่ากับ 0.64 ± 0.04 13.50 ± 0.03 และ 7.03 ± 0.28 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ตามลำดับ (ตารางที่ 11) (รูปที่ 16)

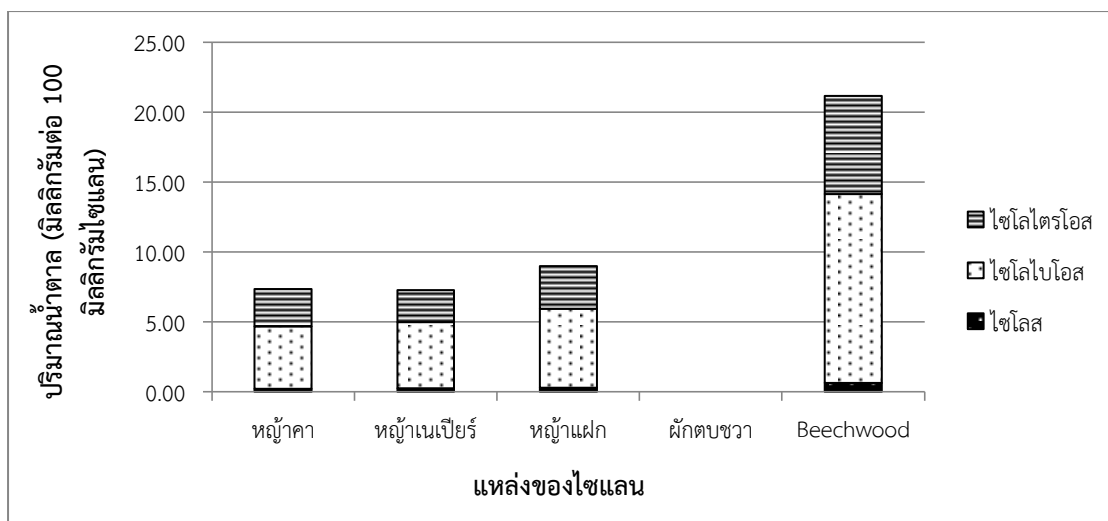


รูปที่ 15 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดการจากย่อยไซแลนจากกล้วยาคา กล้วยาเนเปียร กล้วยาแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมงโดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 หน่วยต่อกรัมไซแลน ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 11 ปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ที่เกิดการจากย่อยไซแลนจากกล้วยาคา กล้วยาเนเปียร กล้วยาแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 หน่วยต่อกรัมไซแลน ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

แหล่งของไซแลน	ปริมาณ (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน)		
	ไซโลส	ไซโลไบโอส	ไซโลไตรโอส
กล้วยาคา	0.20±0.04 ^c	4.48±0.57 ^c	2.66±0.35 ^{bc}
กล้วยาเนเปียร	0.24±0.03 ^c	4.74±0.10 ^c	2.30±0.11 ^c
กล้วยาแฝก	0.30±0.03 ^b	5.65±0.18 ^b	3.02±0.18 ^b
ผักตบชวา	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^d
Beechwood	0.64±0.04 ^a	13.50±0.03 ^a	7.03±0.28 ^a

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)



รูปที่ 16 ปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ที่เกิดการจากย่อยไซแลนจากกล้วยาคา กล้วยาเนเปียร กล้วยาแฝก ผักตบชวา และ beechwood xylan ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมงโดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัมไซแลน ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.4.2 การศึกษาปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

จากผลการย่อยไซแลนจากกล้วยาชนิดต่างๆ และผักตบชวาในข้อ 4.4.1 พบว่าการย่อยไซแลนจากกล้วยาแฝกให้ปริมาณรวมของไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกไซแลนจากกล้วยาแฝกเป็นวัตถุดิบในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ แล้วทำการปรับปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยด้วยแผนการทดลองแบบ CCD เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นค่าตอบสนองดังตารางที่ 12 ทำการย่อยที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที โดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้โปรแกรม Design Expert เวอร์ชัน 6 (Stat-Ease Inc., US) จะได้ความสัมพันธ์ดังสมการ

$$Y = - 2.94314 + 0.27290 X_1 + 0.08384 X_2 - 0.00383 X_1^2 - 0.00036 X_2^2 - 0.00064 X_1X_2$$

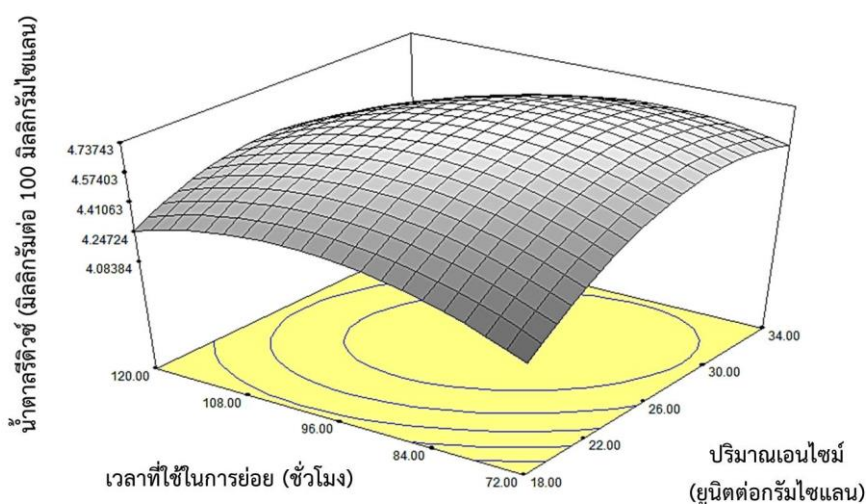
โดย Y คือ น้ำตาลรีตีวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
 X_1 คือ ปริมาณเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมไซแลน)
 X_2 คือ เวลาที่ใช้ในการย่อย (ชั่วโมง)

และมี coefficient of determination หรือ R^2 เท่ากับ 0.91 แสดงว่าสมการดังกล่าวอธิบายความแปรปรวนของตัวแปร X ได้ 91%

จากค่าตอบสนอง สามารถสร้างแผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (contour plot) (รูปที่ 17) เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลให้ได้น้ำตาลรีตีวซ์สูงสุด และสามารถทำนายได้ว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 27.94 ยูนิตต่อกรัมไซแลน และใช้เวลาในการย่อยเท่ากับ 92 ชั่วโมง 19 นาที จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีตีวซ์สูงสุดที่ 23.70 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน เมื่อทำการทดลองซ้ำที่ภาวะดังกล่าว พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีตีวซ์เท่ากับ 23.65 ± 1.34 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าทำนายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.96$) แสดงว่าสามารถนำสมการที่ได้มาใช้ในการอธิบายการผลิตไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ได้อย่างแม่นยำ เมื่อตรวจสอบปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีปริมาณ 0.47 ± 0.36 10.58 ± 0.77 และ 2.69 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ตามลำดับ และได้ปริมาณรวมของไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสเพิ่มขึ้นเป็น 1.53 เท่า

ตารางที่ 12 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนอง (น้ำตาลรีดิวซ์) ต่อปัจจัยที่ศึกษา สำหรับการศึกษาระดับปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

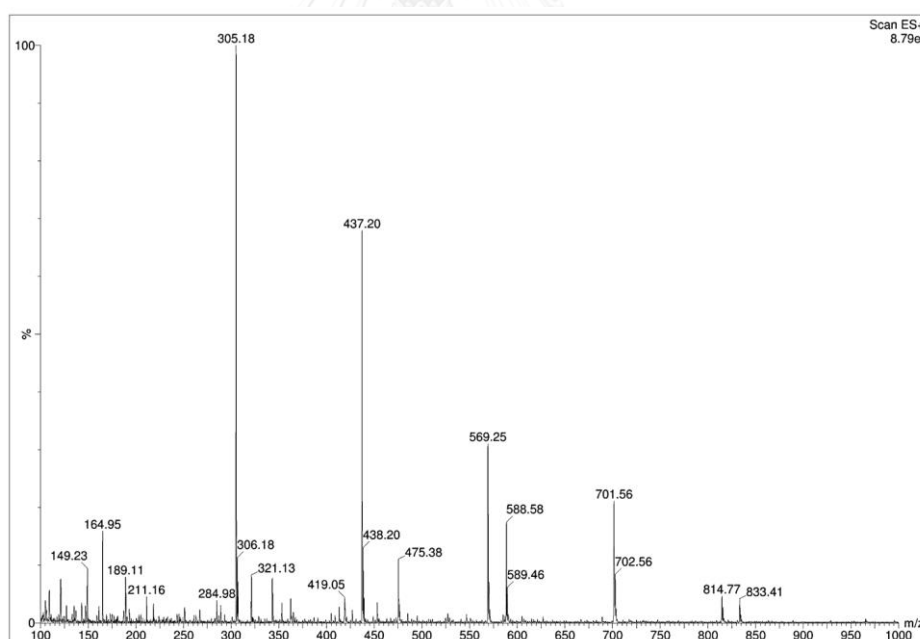
ชุดการทดลอง	ปัจจัย		รหัสปัจจัย		น้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน)
	ปริมาณเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมไซแลน)	เวลา (ชั่วโมง)	X ₁	X ₂	
1	34	120	+1	+1	21.15
2	37.31	96	+1.414	0	21.52
3	34	72	+1	-1	23.26
4	26	62.06	0	-1.414	21.06
5	18	72	-1	-1	21.03
6	14.69	96	-1.414	0	20.13
7	18	120	-1	+1	21.35
8	26	129.94	0	+1.414	21.38
9	26	96	0	0	23.38
10	26	96	0	0	23.78
11	26	96	0	0	23.44
12	26	96	0	0	23.87



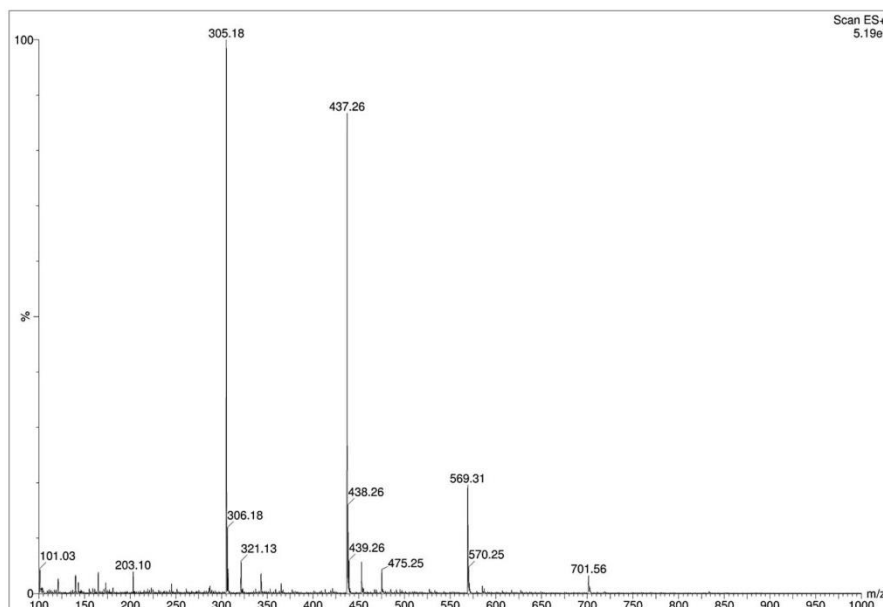
รูปที่ 17 พื้นผิวตอบสนองสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อย ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

4.5 การเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อนำไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากภาวะที่เหมาะสมไปวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry พบว่ามีไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยพบค่ามวลต่อประจุ (m/z) ที่ 305 ($M+Na$)⁺ และ 437 ($M+Na$)⁺ ตามลำดับ ส่วนไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์อื่นๆ ที่พบ ได้แก่ ไซโลเตตระโอส ไซโลเพนตะโอส และไซโลเฮกซะโอส ซึ่งมีค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 569 ($M+Na$)⁺ 701 ($M+Na$)⁺ และ 833 ($M+Na$)⁺ นอกจากนี้ยังพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไซโลสที่ค่ามวลต่อประจุเท่ากับ 189 ($M+K$)⁺ และสิ่งเจือปนอื่นๆ ด้วย (รูปที่ 18) หลังจากนั้นนำไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์มาเพิ่มความบริสุทธิ์โดยการดูดซับบนถ่านกัมมันต์ ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดไซโลสออกและชะด้วย 15% (v/v) เอทานอลอย่างช้าๆ พบว่าไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นโดยมีไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งยืนยันได้จากการหายไปของสัญญาณของไซโลส ไซโลเตตระโอส ไซโลเพนตะโอส ไซโลเฮกซะโอสและสิ่งเจือปนอื่นๆ (รูปที่ 19)



รูปที่ 18 Mass spectrum ของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่หยาบก่อนผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์



รูปที่ 19 Mass spectrum ของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อผ่านกระบวนการดูดซับบนถ่านกัมมันต์ และชะด้วย 15% (v/v) เอทานอล

4.6 การทดสอบสมบัติของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย

จากการทดสอบสมบัติของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย *L. brevis* และ *L. casei* โดยเปรียบเทียบการเติบโตของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมสารต่างๆ เพิ่มลงไป ได้แก่ กลูโคส ไซโลส ไซแลน ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ ปีตากุลแคนจากยีสต์ (food grade) (บริษัท โพรโนวา แลบบอราทอรีส์ จำกัด) และชุดควบคุมซึ่งไม่เติมสารเพิ่ม โดยควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 mg C/ml พบว่า ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ที่ผลิตได้สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. brevis* ได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $1.69 \pm 0.36 \times 10^8$ CFU/ml ซึ่งมากกว่าการเติมกลูโคส ($4.78 \pm 1.17 \times 10^7$ CFU/ml) และปีตากุลแคน ($5.00 \pm 1.45 \times 10^7$ CFU/ml) แต่เมื่อเลี้ยง *L. brevis* ในอาหารที่เติมไซแลน และไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ จะทำให้ *L. brevis* เติบโตได้น้อยลง โดยมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $3.11 \pm 0.19 \times 10^7$ และ $2.67 \pm 0.00 \times 10^7$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนการเติมไซโลสจะทำให้มีการเติบโตของ *L. brevis* น้อยที่สุด โดยมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $7.89 \pm 1.17 \times 10^6$ CFU/ml ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ *L. casei* พบว่า มีการเติบโต

สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมไซแลน ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ และไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธ์ โดยมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $6.56 \pm 1.95 \times 10^8$ $6.00 \pm 0.88 \times 10^8$ และ $6.11 \pm 1.64 \times 10^8$ CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสูงกว่าการเติมไซโลส ($4.78 \pm 0.84 \times 10^8$ CFU/ml) และปีตากุลแคน ($5.67 \pm 1.67 \times 10^8$ CFU/ml) ส่วนอาหารที่เติมกลูโคสจะทำให้ *L. casei* เจริญเติบโตได้น้อยที่สุด โดยมีจำนวนโคโลนีเท่ากับ $9.44 \pm 1.02 \times 10^7$ CFU/ml ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 การเติบโตของแบคทีเรีย *L. brevis* และ *L. casei* เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับสารชนิดอื่นๆ โดยควบคุมความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 mg C/ml

สารที่เติมลงใน MRS	จำนวนแบคทีเรีย(CFU/ml)	
	<i>L. brevis</i>	<i>L. casei</i>
ไม่เติม	$5.00 \pm 1.33 \times 10^{7b}$	$3.44 \pm 0.51 \times 10^{8b}$
กลูโคส	$4.78 \pm 1.17 \times 10^{7b}$	$9.44 \pm 1.02 \times 10^{7c}$
ไซโลส	$7.89 \pm 1.17 \times 10^{6c}$	$4.78 \pm 0.84 \times 10^{8ab}$
ไซแลน	$3.11 \pm 0.19 \times 10^{7bc}$	$6.56 \pm 1.95 \times 10^{8a}$
ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ	$2.67 \pm 0.00 \times 10^{7bc}$	$6.00 \pm 0.88 \times 10^{8a}$
ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธ์	$1.69 \pm 0.36 \times 10^{8a}$	$6.11 \pm 1.64 \times 10^{8a}$
ปีตากุลแคนจากยีสต์	$5.00 \pm 1.45 \times 10^{7b}$	$5.67 \pm 1.67 \times 10^{8ab}$

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรยกที่ต่างกันแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

บทที่ 5

การอภิปรายผลการวิจัย

5.1 การคัดเลือก *Aureobasidium pullulans*

5.1.1 การศึกษาการผลิตไซแลเนส

ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาแพง เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตสูง ซึ่งเป็นผลมาจากวัตถุดิบคือ ไซแลน และไซแลเนส และภาวะที่ใช้ในการผลิต ไซแลเนสมีความสำคัญต่อการผลิต โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไซแลนไปเป็นไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ แต่เนื่องจากไซแลเนสบริสุทธิ์ทางการค้ามีราคาสูง งานวิจัยนี้จึงทำการผลิตไซแลเนสหายาจาก *A. pullulans* เพื่อใช้ในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์แทนไซแลเนสบริสุทธิ์ การผลิตไซแลเนสโดยทั่วไปจะใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไซแลนบริสุทธิ์ทางการค้าเป็นวัตถุดิบที่มีราคาสูง ดังนั้น วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจึงเป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากมีราคาต่ำ และมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการผลิตไซแลเนสได้ (Chapla และคณะ, 2010; Bankeeree และคณะ, 2014; Kaushik, Mishra และ Malik, 2014) อย่างไรก็ตาม วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีองค์ประกอบและโครงสร้างที่ซับซ้อน ซึ่งอาจส่งผลต่อความสามารถในการผลิตไซแลเนสของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ จากรายงานของ Bankeeree และคณะ (2014) พบว่าการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนให้แอกติวิตีของไซแลเนสต่ำกว่าการใช้ beechwood xylan เป็นแหล่งคาร์บอน 1.76 เท่า อย่างไรก็ตาม ซังข้าวโพดมีราคาต่ำ ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ลงได้ จึงจัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจมากกว่า ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่ซับซ้อนในการผลิตไซแลเนสได้

นอกจากนี้ ไซแลเนสจาก *A. pullulans* สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ประมาณ 3.0-5.0 และช่วงอุณหภูมิประมาณ 35-55 องศาเซลเซียส (Leathers, 1986; Li และคณะ, 1993; Vadi, Strohfus และ West, 1996; Verjans และคณะ, 2010) แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งลดต้นทุนในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ จึงเลือกทำการผลิตที่ pH 7 และ

อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นภาวะที่ง่ายต่อการควบคุม สามารถลดการใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อน และลดค่าใช้จ่ายที่เกี่ยวข้องกับการให้ความร้อนลงได้ ดังนั้น จึงนำเอนไซม์หยาบที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ต่างๆ มาตรวจสอบแอกติวิตีของไซแลเนสที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตไซแลเนส ซึ่งสามารถทำงานได้ดีที่ภาวะดังกล่าว

จากการศึกษาพบว่า *A. pullulans* ทั้ง 30 สายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตไซแลเนสได้แตกต่างกัน โดยมีทั้งสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตไซแลเนส และสายพันธุ์ที่ผลิตไซแลเนสได้ ตั้งแต่ 0.02-2.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม *A. pullulans* ที่ใช้ในการศึกษานี้ให้ผลการผลิตไซแลเนสค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับรายงานฉบับอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิต และภาวะที่ใช้ในการตรวจสอบแอกติวิตีมีความแตกต่างกัน เช่น (Manitchotpisit และคณะ, 2009) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* หลายสายพันธุ์โดยใช้ oat spelt xylan เป็นแหล่งคาร์บอน และทำการตรวจสอบแอกติวิตีที่ pH 5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า มีการผลิตไซแลเนสอยู่ในช่วง 7.70-94.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สำหรับการศึกษานี้ *A. pullulans* AP46 เป็นสายพันธุ์ที่ให้แอกติวิตีของไซแลเนสสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวไปศึกษาในขั้นต่อไป

5.1.2 การศึกษาความเสถียรของไซแลเนสที่อุณหภูมิห้อง

ในงานวิจัยนี้จะทำการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง จึงต้องทำการศึกษาเสถียรภาพของไซแลเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* AP 46 ที่ภาวะดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน เพื่อยืนยันถึงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ตลอดระยะเวลาการใช้งาน ดังนั้น จึงทำการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์เมื่อปมที่ภาวะดังกล่าวทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากการศึกษาพบว่า ไซแลเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* AP 46 มีความเสถียรที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง โดยมีแอกติวิตีมากกว่า 80% เป็นเวลา 3 วัน และยังคงมีแอกติวิตีถึง 60% เมื่อปมเอนไซม์นาน 4 วัน สายพันธุ์ดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อไป

5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส

5.2.1 การศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ในอาหารพื้นฐาน (base medium)

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (Karni, Deopurkar และ Rale, 1993; Nasr และคณะ, 2013) ดังนั้น จึงทำการศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 เพื่อทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงสุด และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์และการเติบโต โดยเลี้ยง *A. pullulans* AP 46 ในอาหารพื้นฐาน ซึ่งมีซังข้าวโพด 1% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษา พบว่า *A. pullulans* AP 46 มีการเติบโตระยะ log phase ในช่วงเวลา 0-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ stationary phase อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนี้ไม่สามารถระบุช่วงเวลาของการเติบโตแบบ lag phase ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากอาหารที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อมีความใกล้เคียงกับอาหารสูตร production medium ส่งผลให้จุลินทรีย์ปรับตัวในอาหารได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้มีระยะ lag phase สั้นมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ สำหรับการผลิตไซแลเนส ซึ่งเป็นสารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) โดยทั่วไปจะมีการผลิตขึ้นในระหว่างที่จุลินทรีย์มีการเติบโตแบบ log phase (Agnihotri และคณะ, 2010; Kaur, Dutt และ Tyagi, 2011) แต่จากการศึกษา นี้ พบว่า *A. pullulans* AP 46 เริ่มผลิตไซแลเนสในปริมาณมากหลังจากเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเติบโตแบบ stationary phase เนื่องจากในระหว่างการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จะทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวบางส่วนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในซังข้าวโพด ได้แก่ กลูโคส ไซโลส และอะราบินโนส *A. pullulans* AP 46 จึงใช้น้ำตาลดังกล่าวในการเติบโตในระยะแรกจนเข้าสู่ stationary phase หลังจากนั้นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้หมดลง จุลินทรีย์จึงผลิตเอนไซม์ขึ้นมาย่อยซังข้าวโพดให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในการเติบโตต่อไป และพบว่า สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้น สารอาหารได้หมดลง เกิดการตายของเซลล์ ทำให้มีการปลดปล่อยสารอินทรีย์ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตสามารถนำไปใช้ในการเติบโตต่อไปได้โดยไม่ต้องอาศัยการผลิตไซแลเนส รวมทั้งมีการ

ปลดปล่อยโปรตีนจากเซลล์ที่ตาย ส่งผลให้แอกติวิตีของไซแลเนสลดลง เนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) (Flores, Pérez และ Huitrón, 1997; Pal และ Khanum, 2010; Grady Jr และคณะ, 2011) ดังนั้น จึงทำการเก็บเอนไซม์ที่เวลา 72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน ในการทดลองขั้นต่อไป

5.2.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเป็นปัจจัยสำคัญในการเติบโต (Rajput, Khanzada และ Shahzad, 2014) และการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (Nasr และคณะ, 2013) การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณที่สูงขึ้น โดยทั่วไป ไซแลเนสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตไซแลเนส แต่เนื่องจากไซแลเนสบริสุทธิ์ทางการค้ามีราคาสูง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ ชังข้าวโพด ฟางข้าว และกากอ้อย เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งวัสดุเหล่านี้เป็นวัสดุที่มีไซแลเนสเป็นองค์ประกอบ มีราคาต่ำ และมีปริมาณมาก (Gupta และ Kar, 2009) และมีรายงานว่าสามารถใช้กระตุ้นการผลิตไซแลเนสในจุลินทรีย์หลายชนิด (Chapla และคณะ, 2010; Bankeeree และคณะ, 2014; Kaushik, Mishra และ Malik, 2014) สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ทำการศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้แก่ แอล-แอสพาราจिन ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในอาหารสูตร production medium สำหรับผลิตไซแลเนส (Leathers, Kurtzman และ Detroy, 1984) เปปโตน ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ใช้ทั่วไปในอุตสาหกรรม โซเดียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีราคาถูก

เมื่อทำการแปรผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวและโซเดียมไนเตรตเป็นองค์ประกอบสามารถกระตุ้นการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 ได้สูงสุดเท่ากับ 4.10 ± 0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของฟางข้าว พบว่ามีปริมาณเฮมิเซลลูโลสสูงรองจากชังข้าวโพด แต่มีปริมาณลิกนินต่ำที่สุด ลิกนินเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์พืช โดยจะเชื่อมติดกับเฮมิเซลลูโลสด้วยพันธะโคเวเลนต์ ทำให้โครงสร้างของพืชมีความแข็งแรงและมีบทบาทในการ

ป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ (Mao, Zhang และ Xu, 2012) และลักษณะยังทำให้ เอนไซม์เข้าถึงเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ยาก (Kumar และ Wyman, 2009) จึงมีผลในการขัดขวางกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชัน (Novaes และคณะ, 2010) โดยปกติ *A. pullulans* จะมีการผลิตไซแลเนสแบบ constitutive ในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นไซแลเนสจะเข้าย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบในเฮมิเซลลูโลสได้อนุพันธ์ของไซแลนที่มีขนาดเล็กลง อนุพันธ์เหล่านี้จะมีบทบาทในการกระตุ้นการผลิตไซแลเนสแบบ inducible ซึ่งทำให้ได้ไซแลนสในปริมาณมาก (Lubomír และ Peter, 1998; Kulkarni, Shendye และ Rao, 1999) ด้วยเหตุนี้ การที่ฟางข้าวมีปริมาณลิกนินต่ำที่สุดจะทำให้ไซแลเนสเข้าถึงเฮมิเซลลูโลสได้ดีที่สุด (Guo และคณะ, 2009) เกิดการปลดปล่อยอนุพันธ์ของไซแลน และส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการผลิตไซแลเนสได้สูงสุด สำหรับซังข้าวโพดและกากอ้อยซึ่งมีปริมาณลิกนินสะสมอยู่บนเฮมิเซลลูโลสมากกว่า ทำให้ไซแลเนสเข้าถึงเฮมิเซลลูโลสได้น้อยกว่า จึงกระตุ้นการผลิตไซแลเนสได้น้อยกว่า สำหรับแหล่งไนโตรเจน พบว่า *A. pullulans* AP 46 สามารถใช้โซเดียมไนเตรตในการผลิตไซแลเนสได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซแลเนสก็มีความแตกต่างกันใน *A. pullulans* แต่ละสายพันธุ์ เช่น Yu และ Gu (2013) รายงานว่าเมื่อใช้เปปโตนและไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ *A. pullulans* 2012 ผลิตไซแลเนสได้สูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ส่วน Nasr และคณะ (2013) รายงานว่าเมื่อ *A. pullulans* ที่แยกได้จากพริก *Capsicum annum* ในประเทศอิหร่าน ใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จะทำให้สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงกว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า *A. pullulans* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยทุกสายพันธุ์ สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้ (Punnapayak และคณะ, 2003; Prasongsuk และคณะ, 2005; Lotrakul และคณะ, 2009; Manitchotpisit และคณะ, 2009) ดังนั้นความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของจุลินทรีย์จึงขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวและโซเดียมไนเตรตเป็นองค์ประกอบทำให้ *A. pullulans* AP 46 ผลิตไซแลเนสได้สูงสุด และเป็นวัตถุดิบที่มีราคาต่ำ ดังนั้น จึงเลือกฟาง

ข้าวและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา
ในขั้นต่อไป

5.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจน (C/N ratio) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการ
เติบโต และการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (Deshpande และคณะ, 2008) ในการศึกษา
พบว่า ฟางข้าวและโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จึง
นำมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยใช้วิธี response surface methodology (RSM)
และวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) วิธี RSM เป็นวิธีทางสถิติ
ที่ใช้ในงานวิจัยที่มีตัวแปรซับซ้อน วิธีการนี้อาศัยการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multiple
regression) และการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation) ในการประเมินผลของตัวแปรอิสระ
ตั้งแต่สองตัวขึ้นไปต่อตัวแปรตามต่างๆ และสามารถทำนายภาวะที่เหมาะสมโดยมีจำนวนชุด
การทดลองที่น้อยกว่าการออกแบบการทดลองแบบธรรมดา ทำให้ประหยัดเวลาและ
ทรัพยากรที่ใช้ในการทำการทดลอง (Jeong, Yang และ Park, 2009; Sugumaran และ
Ponnusami, 2015) จากการวิเคราะห์ด้วย RSM สามารถทำนายได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่
ประกอบด้วยฟางข้าวที่ความเข้มข้น 3.89% (w/v) และโซเดียมไนเตรตที่ความเข้มข้น
0.75% (w/v) ทำให้ *A. pullulans* AP 46 ผลิตไซแลเนสได้สูงสุด เท่ากับ 4.88 ยูนิตต่อ
มิลลิลิตร ดังนั้น จึงใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้น 3.89% (w/v) และโซเดียมไนเตรตที่ความ
เข้มข้น 0.75% (w/v) สำหรับการศึกษาการผลิตไซแลเนสในขั้นต่อไป ฟางข้าวและโซเดียม
ไนเตรตที่ความเข้มข้นดังกล่าวให้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 11.65
(ปริมาณคาร์บอนในฟางข้าวเท่ากับ 36.9% (w/w) (Nakagawa และคณะ, 2003)) ซึ่ง
ใกล้เคียงกับรายงานของ Lemos, Fontes และ Pereira (2001) และ Biswas และคณะ
(2010) ที่พบว่า เมื่อให้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนเท่ากับ 10 จะทำให้
Aspergillus awamori และ *Melanocarpus albomyces* ผลิตไซแลเนสได้สูงสุด
ตามลำดับ และจากการตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตไซแลเนสโดยทำการทดลองซ้ำอีก
ครั้งหนึ่ง พบว่าสามารถผลิตไซแลเนสได้ 5.19 ± 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากค่า

ทำนายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสามารถนำสมการที่ได้มาใช้ในการอธิบายการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 ได้อย่างแม่นยำ การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซแลเนสสามารถให้แอกติวิตีของไซแลเนสสูงขึ้น ซึ่งคิดเป็น 1.27 เท่า ของการผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของฟางข้าวเท่ากับ 1% (w/v) และไซเดียมไนเตรตเท่ากับ 0.67% (w/v)

5.2.4 การศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตไซแลเนส

pH เป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่ออัตราการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ (Bibi และคณะ, 2014) ดังนั้น การศึกษานี้จึงทำการแปรผัน pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 4-7 เพื่อหา pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 จากการศึกษา พบว่า *A. pullulans* AP 46 สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเท่ากับ 5.19 ± 0.08 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ดังนั้น จึงเลือกค่า pH ดังกล่าวไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป แต่เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 จะทำให้มีการผลิตไซแลเนสลดลงเหลือ 4.57 ± 0.05 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่า *A. pullulans* AP 46 สามารถเติบโตและผลิตไซแลเนสได้ในช่วง pH ที่ค่อนข้างเป็นกรด จากการศึกษาอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนสมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต เช่น Nasr และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาผลของ pH ในอาหารต่อการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* ที่แยกได้จากพริก *Capsicum annum* ในประเทศอิหร่าน โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 4 5 6 และ 7 พบว่า *A. pullulans* สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเมื่อ pH ของอาหารเท่ากับ 4 ซึ่งพบแอกติวิตีใกล้เคียงกับการผลิตที่ pH 5 และเมื่อปรับ pH ของอาหารเท่ากับ 6 และ 7 จะทำให้การผลิตไซแลเนสลดลง

5.2.5 การศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสของ *A. pullulans* ในอาหารที่เหมาะสม (optimized medium)

เนื่องจากการปรับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจส่งผลกระทบต่อระยะเวลาที่จุลินทรีย์ใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (Kheng และ Omar, 2005) ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาการเติบโตและการผลิตไซแลเนสจาก *A. pullulans* AP 46 อีกครั้งหนึ่ง เพื่อ

ตรวจสอบระยะเวลาที่สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุด และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์และการเติบโตหลังจากปรับองค์ประกอบของอาหาร โดยเลี้ยง *A. pullulans* AP 46 ในอาหารสูตรที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยฟางข้าว 3.89% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรต 0.75% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 5.5 จากการศึกษาพบว่า *A. pullulans* AP 46 มีรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์และการเติบโตเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงในอาหารพื้นฐาน กล่าวคือ จุลินทรีย์มีการเติบโตระยะ log phase ในช่วงเวลา 0-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะ stationary phase สำหรับการผลิตไซแลเนส พบว่า จุลินทรีย์เริ่มผลิตไซแลเนสในปริมาณมากหลังจากเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเติบโตแบบ stationary phase และผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงไปเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยมีแอกติวิตีเท่ากับ 4.73 ± 0.10 ยูนิิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าทำนายที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย RSM

5.3 การเตรียมไซแลนและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของไซแลน

ไซแลนเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช และเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตไซโกลออลิโกแซ็กคาไรด์ (Kumar, Pushpa และ Prabha, 2012) แต่เนื่องจากไซแลนบริสุทธิ์ทางการค้ามีราคาแพง ซึ่งจะส่งผลให้มีต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงทำการผลิตไซแลนจากพืชวงศ์หญ้า และผักตบชวา เพราะเป็นพืชที่เจริญเติบโตเร็ว มีปริมาณมาก และมีความจำเป็นจะต้องกำจัดทิ้งในบางกรณี สำหรับพืชวงศ์หญ้าที่เลือกใช้เป็นวัตถุดิบ ได้แก่ หญ้าคา หญ้าเนเปียร์ และหญ้าแฝก ซึ่งมีองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสสูง และมีปริมาณลิกนินต่ำ ส่วนผักตบชวานั้นก็เป็นวัชพืชในแหล่งน้ำ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทั้งทางสิ่งแวดล้อมและในเชิงเศรษฐกิจ (Xia และคณะ, 2013) หญ้าและผักตบชวาเป็นพืชที่ไม่มีเนื้อไม้ ซึ่งโดยทั่วไป พืชที่ไม่มีเนื้อไม้จะมีองค์ประกอบของลิกนินประมาณ 3-6% ซึ่งต่ำกว่าพืชที่มีเนื้อไม้ (15-40%) (Sarkanen และ Ludwig, 1971; Marques และคณะ, 2010) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงลดขั้นตอนในการกำจัดลิกนินลง โดยไม่ทำการปรับสภาพพืชก่อนนำไปสกัดไซแลน

เมื่อทำการสกัดไซแลนด้วยสารละลาย NaOH จะเกิดการสลายพันธะระหว่างไซแลนกับลิกนิน และไซแลนกับองค์ประกอบอื่นๆ ในผนังเซลล์พืช เกิดการกำจัดหมู่อะซีทิลและกรดยูโรนิกซึ่ง

เป็นโซ่ข้างในโครงสร้างของไซแลน ทำให้เอนไซม์เข้าถึงโครงสร้างของไซแลนได้ดีขึ้น (Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ NaBH_4 ร่วมในขั้นตอนการสกัดด้วย เนื่องจากสามารถทำให้ไซแลนที่สกัดได้มีความเสถียรในสารละลายต่างมากขึ้น โดย NaBH_4 จะรีดิวซ์หมู่คาร์บอนิลที่ปลายรีดิวซ์ (reducing end) ของไซแลนได้เป็นหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้ไซแลนไม่ถูกทำลายด้วย peeling reaction ที่จะเกิดขึ้นในสารละลายต่าง (Wang และคณะ, 2015) เมื่อพิจารณาปริมาณไซแลนที่สกัดได้โดยคิดจากน้ำหนักเริ่มต้นของพืช พบว่า สามารถสกัดไซแลนจากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ และหญ้าแฝก ได้มากกว่าผักตบชวา มาก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเฮมิเซลลูโลสและลิกนินในพืช และเมื่อพิจารณาหญ้าทั้งสามชนิด จะเห็นได้ว่าหญ้าเนเปียร์มีปริมาณลิกนินน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไซแลนที่สกัดได้มากที่สุด ปริมาณไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าทั้งสามชนิดในงานวิจัยนี้มีความใกล้เคียงกับรายงานของ Samanta และคณะ (2012) ซึ่งทำการสกัดไซแลนจาก natural grass (*Sehima nervosum*) ด้วยวิธีเดียวกันและได้ปริมาณไซแลนเท่ากับ 25.12% (ปริมาณไซแลนสัมพัทธ์เท่ากับ 89.39%)

เมื่อทำการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของ beechwood xylan และไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก และผักตบชวา ด้วยวิธี gel permeation chromatography พบองค์ประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูงเป็นส่วนใหญ่ และมีการกระจายของมวลโมเลกุลแตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างของไซแลนจากพืชแต่ละชนิด การพบสัญญาณมวลโมเลกุลหลายสัญญาณในไซแลนชนิดเดียวกัน โดยพบทั้งสัญญาณที่แสดงมวลโมเลกุลสูงและมวลโมเลกุลต่ำ แสดงถึงความหลากหลายขององค์ประกอบในไซแลนชนิดนั้นๆ ซึ่งอาจประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ ออลิโกแซ็กคาไรด์ ไซแลนที่รวมตัวกัน (aggregated xylan), ไซแลนที่ไม่รวมตัวกัน (non-aggregated xylan) และสารประกอบเชิงซ้อนลิกนิน-คาร์โบไฮเดรต (lignin-carbohydrate complex) (Panthapulakkal, Pakharenko และ Sain, 2013; Rabetafika และคณะ, 2014)

5.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

ไซแลนจากวัชพืชที่ใช้ในการศึกษานี้ มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยพันธะ β -1,4 เชื่อมระหว่างหน่วยย่อยของไซโลส มีน้ำตาลอะราบินโนสเป็นโซ่ข้าง (Ebringerová, 2005; Kurniati, Darmokoesoemo และ Puspaningsih, 2011; Sedlmeyer, 2011; Saha, Mukherjee และ

Ghosh, 2012) เมื่อนำมาย่อยสลายโดยใช้ไซแลเนสที่ยาบบที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* AP 46 ซึ่งมีแอกติวิตีของเอนโดไซแลเนส จะทำให้มีการสลายพันธะ β -1,4 อย่างสุ่ม ด้วยกลไกแบบเอนโด และเกิดผลิตภัณฑ์เป็นไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตาม พืชแต่ละชนิดอาจมีรายละเอียดในโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลต่อการถูกย่อย และชนิดของผลิตภัณฑ์ที่จะเกิดขึ้น ดังนั้น จึงทำการศึกษาย่อยไซแลนที่ได้จากพืชชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกชนิดของไซแลนที่ถูกย่อยได้ดีและให้ปริมาณรวมของไซโลไปโอสและไซโลไตรโอสสูงสุด แล้วทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยแปรผันปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อย

5.4.1 การศึกษาชนิดของไซแลนที่เหมาะสม

เมื่อทำการย่อยสลาย beechwood xylan และไซแลนที่สกัดได้จากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก และผักตบชวา ที่ pH 7 อุณหภูมิห้อง ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมงโดยควบคุมปริมาณไซแลนเริ่มต้นเท่ากับ 2% (w/v) และปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัม พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนแต่ละชนิด มีความแตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างระหว่างไซแลนแต่ละชนิด จึงทำให้ถูกย่อยได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากโครงสร้างที่แตกต่างกัน และความจำเพาะของเอนไซม์ต่อไซแลนชนิดนั้นๆ ซึ่งจะส่งผลต่อ degree of polymerization (DP) ของผลิตภัณฑ์ด้วย (Akpınar, Erdogan และ Bostancı, 2009) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยไซแลนจากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ และหญ้าแฝก เท่ากับ 20.44 ± 0.84 19.44 ± 0.40 และ 17.50 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ซึ่งมีความใกล้เคียงกันมากกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยไซแลนจากผักตบชวาและ beechwood xylan ซึ่งเท่ากับ 0.23 ± 0.12 และ 29.58 ± 0.98 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ซึ่งอาจเนื่องจากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ และหญ้าแฝก มีความใกล้ชิดกันทางอนุกรมวิธาน โดยอยู่ในวงศ์ Poaceae เช่นกันเดียวกัน จึงมีโครงสร้างของไซแลนที่คล้ายคลึงกันมากกว่าผักตบชวาและ beechwood ซึ่งอยู่ในวงศ์ Pontederiaceae และ Fagaceae (The Plant List, 2010) การย่อยไซแลนจากผักตบชวาให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำมาก อาจเนื่องมาจากเมแทบอลิต์ทุติยภูมิบางชนิดที่พบเป็นองค์ประกอบในผักตบชวา เช่น แทนนิน (Lalitha, Sripathi และ

Jayanthi, 2012) ซึ่งไม่พบในหญ้าโดยทั่วไป (MacAdam และคณะ, 2013) สามารถยับยั้งการทำงานของไซแลเนสได้ (Okunowo และคณะ, 2010; Nsahlai, Fon และ Basha, 2011) นอกจากนี้ ความบริสุทธิ์ของไซแลนก็มีผลต่อการย่อยเช่นกัน โดยการย่อย beechwood xylan ทางการค้าซึ่งมีความบริสุทธิ์ 90% นั้นให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

จากการตรวจสอบปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ในผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าการย่อยไซแลนจากหญ้าคา หญ้าเนเปียร์ หญ้าแฝก และ beechwood xylan ให้ปริมาณไซโลไบโอสสูงสุด รองลงมาเป็นไซโลไตรโอส และพบไซโลสในปริมาณเพียงเล็กน้อย แสดงว่าเอนไซม์ที่ยใช้ในการย่อยมีกลไกการทำงานแบบ endo-mechanism (Christov และคณะ, 1997) โดยจะย่อยไซหลักของไซแลนแบบสุ่มได้อลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Carvalho, Duarte และ Gírio, 2008) ส่วนการย่อยไซแลนจากผักตบชวานั้นพบว่า ไม่มีทั้งไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียงเล็กน้อย แม้ว่าการย่อย beechwood xylan จะให้ปริมาณน้ำตาลทุกชนิดสูงที่สุด แต่เป็นวัตถุดิบที่หาได้ยากกว่า และมีราคาสูงกว่าหญ้ามาก ดังนั้นจึงทำการพิจารณาการย่อยไซแลนจากหญ้าทั้งสามชนิด และพบว่าการย่อยไซแลนจากหญ้าแฝกให้ปริมาณรวมของไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ไซแลนจากหญ้าแฝกในการศึกษาขั้นต่อไป

5.4.2 การศึกษาปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

ปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการย่อยเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสมโดยวิธี RSM โดยใช้ไซแลนจากหญ้าแฝกเป็นวัตถุดิบในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ และปรับปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยด้วยแผนการทดลองแบบ CCD สามารถทำนายได้ว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 27.94 ยูนิต์ต่อกรัมไซแลน และใช้เวลาในการย่อยเท่ากับ 92 ชั่วโมง 19 นาที จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 23.70 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน จากการตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยทำการทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่งพบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 23.65 ± 1.34 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ซึ่งไม่

แตกต่างจากค่าทำนายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสามารถนำสมการที่ได้มาใช้ในการอธิบายการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ได้อย่างแม่นยำ และพบปริมาณไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส มีค่าเท่ากับ 0.47 ± 0.36 10.58 ± 0.77 และ 2.69 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ตามลำดับ ปริมาณผลผลิตเหล่านี้ย่อมขึ้นอยู่กับปัจจัยในการผลิตหลายปัจจัย เช่น ชนิดและปริมาณเริ่มต้นของวัตถุดิบ แหล่งที่มาและปริมาณของเอนไซม์ เวลาและภาวะที่ใช้ในการย่อย ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณผลผลิตแตกต่างกันในแต่ละงานวิจัย เช่น Samanta และคณะ (2012) ได้ทำการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ไซแลนที่สกัดจาก natural grass (*Sehima nervosum*) ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส เท่ากับ 19.60 2.35 11.00 และ 7.06 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ตามลำดับ ส่วน Akpinar, Erdogan และ Bostanci (2009) ได้ทำการย่อยไซแลนที่สกัดได้จากฟางข้าวสาเล่ ต้นฝ้าย ต้นทานตะวัน และต้นยาสูบ พบว่า ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส อยู่ในช่วง 13.80-21.45 0.84-1.50 3.39-7.95 และ 3.60-5.90 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน ตามลำดับ สำหรับการหาภาวะที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้ สามารถทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณรวมของไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสเพิ่มขึ้น ซึ่งคิดเป็น 1.22 และ 1.53 เท่า ของการผลิตโดยใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 10 ยูนิตต่อกรัม และย่อยเป็นเวลา 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ ยังทำให้มีประสิทธิภาพในการผลิตใกล้เคียงกับรายงานข้างต้น โดยพบน้ำตาลรีดิวซ์ ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับรายงานดังกล่าว และพบไซโลสในปริมาณน้อยกว่าเล็กน้อย

5.5 การเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อนำไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry พบว่ามีไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสเป็นองค์ประกอบหลัก และยังมีไซโลเตตระโอส ไซโลเพนตะโอส ไซโลเฮกซะโอส ไซโลส และสิ่งเจือปนอื่นๆ รวมด้วย แต่เนื่องจากความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล (Hughes และคณะ, 2007) โดยเฉพาะโมเลกุลที่ประกอบด้วยไซโลสต่ำกว่า 4 มอนอเมอร์จะแสดงสมบัติพรีไบโอติกได้ดีกว่าโมเลกุลใหญ่ๆ (Carvalho และคณะ, 2013) ซึ่งจะเห็นได้จากไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ทางการค้ามี

ไซโลไบโอส (xylobiose) และไซโลไตรโอส (xylotriose) เป็นองค์ประกอบหลัก (Gullon และคณะ, 2008) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากภาวะที่เหมาะสมมาทำบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยผู้วิจัยเลือกใช้วิธีดูดซับบนถ่านกัมมันต์ (activated charcoal adsorption) ซึ่งอาศัยหลักการการดูดซับออลิโกแซ็กคาไรด์บนพื้นผิวของอนุภาคคาร์บอนด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Hung และคณะ, 2005) เนื่องจากพื้นผิวส่วนใหญ่ของถ่านกัมมันต์มีลักษณะไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำ และไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์โมเลกุลใหญ่ก็มีความไม่ชอบน้ำสูงกว่าโมเลกุลเล็ก ดังนั้นไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์โมเลกุลใหญ่จึงถูกดูดซับบนถ่านกัมมันต์ได้ดีกว่า (Abe, Hayashi และ Kitagawa, 1983) และถูกชะออกจากพื้นผิวถ่านกัมมันต์ด้วยตัวทำละลายที่มีความไม่ชอบน้ำสูงกว่า ดังนั้นหากเลือกใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเอทานอล เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของเอทานอลขึ้น ก็จะสามารถชะไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ออกมาจากถ่านกัมมันต์ได้ (Zhu และคณะ, 2006) จากการทดลองพบว่าเมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นและชะด้วย 15% (v/v) เอทานอลอย่างช้าๆ แล้วทำการเก็บแฟรคชันติดตามองค์ประกอบของแต่ละแฟรคชันด้วยเทคนิค TLC พบว่าสามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ให้กับผลิตภัณฑ์ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสได้ โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไซโลสถูกชะออกมาก่อนด้วยน้ำกลั่น (Zhu และคณะ, 2006; Chen และคณะ, 2014) จากนั้นจึงชะด้วย 15% (v/v) เอทานอลอย่างช้าๆ จนสามารถแยกเก็บสารละลายที่บริสุทธิ์ของไซโลไบโอส และไซโลไตรโอสได้ โดยไม่พบไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์โมเลกุลใหญ่เนื่องจากยังถูกดูดซับอยู่บนถ่านกัมมันต์ เมื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หลังผ่านถ่านกัมมันต์ด้วย mass spectrometry พบว่าการลดลงของสัญญาณของสิ่งเจือปนอื่นๆ ซึ่งอาจเกิดจากการถูกชะด้วยน้ำกลั่นในขั้นตอนการล้าง หรือถูกดูดซับบนถ่านกัมมันต์ได้ดีจนไม่สามารถชะด้วย 15% (v/v) เอทานอลได้ จึงเป็นการยืนยันถึงการประสบความสำเร็จของการเพิ่มความบริสุทธิ์ของไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์

5.6 การทดสอบสมบัติของไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย

ไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์เป็นพรีไบโอติกชนิดหนึ่งที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เช่น นม น้ำผลไม้ ชา กาแฟ โยเกิร์ต ลูกอม เยลลี่ (Jain, Kumar และ Satyanarayana, 2015) ซึ่งสมบัติที่สำคัญของสารจำพวกพรีไบโอติกคือ สามารถกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้หรือโพรไบโอติก (Gibson และ Roberfroid, 1995) ซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์จะ

มีความสามารถในการใช้แหล่งอาหารและมีกลไกที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายที่แตกต่างกัน (Moura และคณะ, 2007; Ramos และคณะ, 2013) ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาสมบัติของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตได้ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. brevis* และ *L. casei* ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต (Okagbue และ Bankole, 1992; Perna และคณะ, 2015) พบว่า ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. brevis* และ *L. casei* ได้ดีกว่ากลูโคส และปีตากลูแคนซึ่งเป็นพรีไบโอติก (Lam และ Cheung, 2013) ทางการค้า โดยพบว่า เมื่อเติมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ที่ผลิตได้ลงในอาหาร MRS จะทำให้ *L. brevis* มีการเติบโตสูงสุด เนื่องจากในชุดการทดลองดังกล่าวมีปริมาณของไซโลไบโอสสูงสุด ซึ่งเป็นไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียวที่ *L. brevis* สามารถใช้ได้ (Immerzeel และคณะ, 2014) ส่วนชุดที่เติมไซแลน และไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบจะมีไซโลไบโอสในสัดส่วนที่น้อยกว่ามาก จึงทำให้การเติบโตของ *L. brevis* น้อยลง สำหรับ *L. casei* พบว่าการเติมไซแลน ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ และไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์จะส่งผลให้ *L. casei* มีการเติบโตสูงสุด แสดงว่า *L. casei* สามารถใช้ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีไม่แตกต่างจากการใช้ไซโลไบโอสและไซโลไตรโอส

งานวิจัยนี้สามารถผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติก โดยใช้วัตถุดิบหลัก ได้แก่ ไซแลเนสและไซแลนที่มีราคาต่ำกว่าในท้องตลาด กล่าวคือ สามารถเตรียมไซแลเนสได้โดยมีต้นทุนของวัตถุดิบ 1.80 บาทต่อเอนไซม์ 1000 ยูนิต ในขณะที่ไซแลเนสจาก *Trichoderma longibrachiatum* *T. viride* และ *Aspergillus niger* มีราคาประมาณ 700 บาทต่อเอนไซม์ 1000 ยูนิต (Megazyme) ส่วนไซแลนจากหญ้าแฝกมีต้นทุนของวัตถุดิบ 22,998.30 บาทต่อไซแลน 1 กิโลกรัม ในขณะที่ beechwood xylan ทางการค้ามีราคา 141,100 บาทต่อกิโลกรัม (Sigma) นอกจากนี้ กระบวนการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ยังทำได้ที่อุณหภูมิห้องและ pH ที่เป็นกลาง ซึ่งทำให้สามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนของพลังงานไฟฟ้า และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ทางการค้าของ Shangdong Longlive Biotechnology, Ltd. ซึ่งมีกระบวนการที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง 155-180 องศาเซลเซียส และความดันสูง 5-7 บรรยากาศ (U.S. Food and Drug Administration, 2013) ดังนั้น การผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในงานวิจัยนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 การคัดเลือก *Aureobasidium pullulans*

A. pullulans AP 46 สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเมื่อตรวจสอบแอกติวิตีที่ pH 7 และอุณหภูมิห้อง ซึ่งให้แอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 2.70 ± 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไซแลเนสที่ผลิตได้มีความเสถียรสูงที่ภาวะดังกล่าว โดยมีแอกติวิตีเหลือมากกว่า 80% เมื่อเก็บเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

6.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลเนส

A. pullulans AP 46 สามารถผลิตไซแลเนสได้สูงสุดเท่ากับ 5.19 ± 0.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร production medium ที่มีฟางข้าวเข้มข้น 3.89% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และมีโซเดียมไนเตรดเข้มข้น 0.75% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 5.5 และเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

6.3 การเตรียมไซแลเนสและวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของไซแลเนส

สามารถสกัดไซแลเนสจากหญ้าเนเปียร์ได้ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ $28.33 \pm 3.33\%$ และพบว่าไซแลเนสที่สกัดได้จากพืชทุกชนิดมีองค์ประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูงเป็นส่วนใหญ่

6.4 การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์

เมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายไซแลเนสที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ พบว่าการย่อยสลายไซแลเนสที่สกัดได้จากหญ้าคาและหญ้าแฝก ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการย่อยสลายไซแลเนสที่สกัดได้จากหญ้าแฝกให้ปริมาณรวมของไซโลไบโอสและไซโลไตรโอสสูงสุด จึงเลือกไซแลเนสที่สกัดได้จากหญ้าแฝกมาศึกษาปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 27.94 ยูนิตต่อกรัมไซแลเนส และใช้เวลาในการย่อย

เท่ากับ 92 ชั่วโมง 19 นาที จะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 23.65 ± 1.34 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมไซแลน

6.5 การเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วน

สามารถเตรียมไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นได้ด้วยการดูดซับบนถ่านกัมมันต์ล้างด้วยน้ำกลั่นและชะด้วย 15% (v/v) เอทานอล ซึ่งจะทำให้มีสัดส่วนของไซโลโบโอสและไซโลไตรโอสเพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังสามารถลดปริมาณของสิ่งเจือปนอื่นๆ ลงได้

6.6 การทดสอบสมบัติของไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย

ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. brevis* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลูโคส

6.7 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบว่าไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกโดยสามารถกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. brevis* และ *L. casei* ได้ จึงควรศึกษาความสามารถในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม และศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เลี้ยงในอาหารที่มีไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อไป

รายการอ้างอิง

- Aachary, A. A. and Prapulla, S. G. (2008). "Corn-cob-induced endo-1, 4- β -D-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(11): 3981-3988.
- Aachary, A. A. and Prapulla, S. G. (2011). "Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **10**(1): 2-16.
- Abe, I., Hayashi, K. and Kitagawa, M. (1983). "Adsorption of saccharides from aqueous solution onto activated carbon." Carbon **21**(3): 189-191.
- Agnihotri, S., Dutt, D., Tyagi, C., Kumar, A. and Upadhyaya, J. (2010). "Production and biochemical characterization of a novel cellulase-poor alkali-thermo-tolerant xylanase from *Coprinellus disseminatus* SW-1 NTCC 1165." World Journal of Microbiology and Biotechnology **26**(8): 1349-1359.
- Akpınar, O., Erdoğan, K. and Bostancı, S. (2009). "Enzymatic production of xylooligosaccharide from selected agricultural wastes." Food and Bioproducts Processing **87**(2): 145-151.
- Akpınar, O., Erdoğan, K. and Bostancı, S. (2009). "Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials." Carbohydrate Research **344**(5): 660-666.
- Atlas, R. M. (1993). Handbook of Microbiological Media. Boca Raton, CRC Press.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria : classification and physiology. Lactic acid bacteria : microbiology and functional aspects. S. Salminen and A. Wright. New York, Marcel Dekker, Inc.

- Bankeeree, W., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Chaiareekij, S., Eveleigh, D. E., Kim, S. W. and Punnapayak, H. (2014). "Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp." Springerplus **3**: 37.
- Bengmark, S. (2005). "Bioecologic control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented probiotics and synbiotics." Gastroenterology Clinics of North America **34**(3): 413-436.
- Bibi, Z., Ansari, A., Zohra, R. R., Aman, A. and Ul Qader, S. A. (2014). "Production of xylan degrading endo-1, 4- β -xylanase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29." Journal of Radiation Research and Applied Sciences **7**(4): 478-485.
- Bidlack, J. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. Proceedings of the Oklahoma Academy of Science.
- Biswas, R., Sahai, V., Mishra, S. and Bisaria, V. S. (2010). "Development of mutants of *Melanocarpus albomyces* for hyperproduction of xylanase." Biotechnology and Bioprocess Engineering **15**(5): 800-809.
- Boonchuay, P., Techapun, C., Seesuriyachan, P. and Chaiyaso, T. (2014). "Production of xylooligosaccharides from corncob using a crude thermostable endo-xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and prebiotic properties." Food Science and Biotechnology **23**(5): 1515-1523.
- Carvalho, F., Duarte, L. C. and Gírio, F. M. (2008). "Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments." Journal of Scientific and Industrial Research **67**: 849-864.
- Carvalho, A. F. A., Neto, P. d. O., da Silva, D. F. and Pastore, G. M. (2013). "Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis." Food Research International **51**(1): 75-85.

- Chapla, D., Divecha, J., Madamwar, D. and Shah, A. (2010). "Utilization of agro-industrial waste for xylanase production by *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 under solid state fermentation and its application in saccharification." Biochemical Engineering Journal **49**(3): 361-369.
- Chapla, D., Pandit, P. and Shah, A. (2012). "Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics." Bioresource Technology **115**: 215-221.
- Chen, M. H., Bowman, M. J., Dien, B. S., Rausch, K. D., Tumbleson, M. E. and Singh, V. (2014). "Autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* for the production of xylooligosaccharides (XOS): kinetics, characterization and recovery." Bioresource Technology **155**: 359-365.
- Christov, L., Myburgh, J., Van Tonder, A. and Prior, B. (1997). "Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes." Journal of Biotechnology **55**(1): 21-29.
- Cooke, W. B. (1959). "An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud." Mycopathology Mycology Applied **12**(1): 1-45.
- De Hoog, G. and Yurlova, N. (1994). "Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*." Antonie van Leeuwenhoek **65**(1): 41-54.
- De Man, J., Rogosa, d. and Sharpe, M. E. (1960). "A medium for the cultivation of lactobacilli." Journal of applied Bacteriology **23**(1): 130-135.
- Dennis, C. and Buhagiar, R. (1973). "Comparative study of *Aureobasidium pullulans*, *A. prunorum* sp. nov. and *Trichosporon pullulans*." Transactions of the British Mycological Society **60**(3): 567-575.
- Deshpande, M. S., Rale, V. B. and Lynch, J. M. (1992). "*Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report." Enzyme and Microbial Technology **14**(7): 514-527.

- Deshpande, S., Bhotmange, M., Chakrabarti, T. and Shastri, P. (2008). "Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)." Indian Journal of Chemical Technology **15**(5): 449.
- Ebringerová, A. (2005). "Structural diversity and application potential of hemicelluloses." Macromolecular Symposia **232**(1): 1-12.
- Ebringerova, A. and Heinze, T. (2000). "Xylan and xylan derivatives–biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylns structures, isolation procedures and properties." Macromolecular Rapid Communications **21**(9): 542-556.
- Flores, M., Pérez, R. and Huitrón, C. (1997). " β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035." Letters in Applied Microbiology **24**(5): 410-416.
- Freudenberg, K. (1965). "Lignin: its constitution and formation from p-hydroxycinnamyl alcohols: lignin is duplicated by dehydrogenation of these alcohols; intermediates explain formation and structure." Science (New York, NY) **148**(3670): 595-600.
- Fuller, R. (1989). "Probiotics in man and animals." Journal of Applied Bacteriology **66**(5): 365-378.
- Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. and Stanton, C. (2002). "A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture." International Dairy Journal **12**(9): 749-756.
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M. and Gaur, M. K. (2010). "*Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan." African Journal of Biotechnology **9**(47): 7989-7997.

- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A. and Roberfroid, M. B. (2004). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics." Nutrition Research Reviews **17**(2): 259-275.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." Journal of Nutrition **125**(6): 1401-1412.
- Gobinath, D., Madhu, A. N., Prashant, G., Srinivasan, K. and Prapulla, S. G. (2010). "Beneficial effect of xylo-oligosaccharides and fructo-oligosaccharides in streptozotocin-induced diabetic rats." British Journal of Nutrition **104**(01): 40-47.
- Goering, H. K. and Van Soest, P. J. (1970). Forage fiber analysis (Apparatus, Reagent, Producers and Some Applications). Agriculture Handbook No.379. Washington DC, Agriculture Research Service USDA.
- Gostincar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniquy, J., Ngan, C. Y., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I. V. and Gunde-Cimerman, N. (2014). "Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species." BMC genomics **15**: 549.
- Grady Jr, C. L., Daigger, G. T., Love, N. G. and Filipe, C. D. (2011). Biological wastewater treatment, CRC Press.
- Gullon, P., Moura, P., Esteves, M. P., Giro, F. M., Dominguez, H. and Parajo, J. C. (2008). "Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(16): 7482-7487.

- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, S. and Plemenitaš, A. (2000). "Hypersaline waters in salterns–natural ecological niches for halophilic black yeasts." FEMS Microbiology Ecology **32**(3): 235-240.
- Guo, G.-L., Hsu, D.-C., Chen, W.-H., Chen, W.-H. and Hwang, W.-S. (2009). "Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition." Enzyme and Microbial Technology **45**(2): 80-87.
- Guo, M. (2009). Functional foods: principles and technology. Boca Raton, CRC Press LLC.
- Gupta, U. and Kar, R. (2009). "Xylanase production by a thermo-tolerant *Bacillus* species under solid-state and submerged fermentation." Brazilian Archives of Biology and Technology **52**(6): 1363-1371.
- Hermanides-Nijhof, E. (1977). "*Aureobasidium* and allied genera." Studies in Mycology **15**: 141-177.
- Howard, R., Abotsi, E., Van Rensburg, E. J. and Howard, S. (2004). "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production." African Journal of Biotechnology **2**(12): 602-619.
- Hughes, S. A., Shewry, P. R., Li, L., Gibson, G. R., Sanz, M. L. and Rastall, R. A. (2007). "In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(11): 4589-4595.
- Hung, Y.-T., Lo, H. H., Wang, L. K., Taricska, J. R. and Li, K. H. (2005). Granular activated carbon adsorption. Physicochemical treatment processes. Humana Press.
- Immerzeel, P., Falck, P., Galbe, M., Adlercreutz, P., Nordberg Karlsson, E. and Stålbrand, H. (2014). "Extraction of water-soluble xylan from wheat bran and utilization of enzymatically produced xylooligosaccharides by *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Weissella* spp." LWT-Food Science and Technology **56**(2): 321-327.

- Jain, I., Kumar, V. and Satyanarayana, T. (2015). "Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits." Indian Journal of Experimental Biology **53**(3): 131-142.
- Jeong, G.-T., Yang, H.-S. and Park, D.-H. (2009). "Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology." Bioresource technology **100**(1): 25-30.
- Joo, G.-J., Rhee, I.-K., Kim, S.-O. and Rhee, S.-J. (1998). "Effect of dietary xylooligosaccharide on indigestion and retarding effect of bile acid movement across a dialysis membrane." Journal-Korean Society of Food Science and Nutrition **27**: 705-711.
- Karni, M., Deopurkar, R. and Rale, V. (1993). " β -Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars agricultural residues." World Journal of Microbiology and Biotechnology **9**(4): 476-478.
- Kaur, H., Dutt, D. and Tyagi, C. (2011). "Production of novel alkali-thermo-tolerant cellulase-poor xylanases from *Coprinopsis cinerea* HK-1 NFCCI-2032." BioResources **6**(2): 1376-1391.
- Kaushik, P., Mishra, A. and Malik, A. (2014). "Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation." International Biodeterioration and Biodegradation **96**: 1-8.
- Kayseriliođlu, B. Ő., Bakir, U., Yilmaz, L. and AkkaŐ, N. (2003). "Use of xylan, an agricultural by-product, in wheat gluten based biodegradable films: mechanical, solubility and water vapor transfer rate properties." Bioresource technology **87**(3): 239-246.
- Kheng, P. P. and Omar, I. C. (2005). "Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate." Songklanakarın Journal of Science and Technology **27**(2): 325-336.

- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. (1999). "Molecular and biotechnological aspects of xylanases." FEMS microbiology reviews **23**(4): 411-456.
- Kumar, G. P., Pushpa, A. and Prabha, H. (2012). "A review on xylooligosaccharides." International Research Journal of Pharmacy **3**(8): 71-74.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. and Stroeve, P. (2009). "Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production." Industrial and Engineering Chemistry Research **48**(8): 3713-3729.
- Kumar, R. and Wyman, C. E. (2009). "Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments." Biotechnology and Bioengineering **103**(2): 252-267.
- Kurniati, A., Darmokoesoemo, H. and Puspaningsih, N. (2011). "Modification of surface structure and crystallinity of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) following recombinant α -L-arabinofuranosidase (abfa) treatment." Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development **3**(9): 182-188.
- Lalitha, P., Sripathi, S. K. and Jayanthi, P. (2012). "Secondary metabolites of *Eichhornia crassipes* (Waterhyacinth): a review (1949 to 2011)." Natural Product Communications **7**(9): 1249-1256.
- Lam, K. L. and Cheung, P. C. K. (2013). "Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics." Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre **2**(1): 45-64.
- Leathers, T., Kurtzman, C. and Detroy, R. (1984). "Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*." Biotechnology and Bioengineering Symposium **14**: 225-240.
- Leathers, T. D. (1986). "Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity." Applied and Environmental Microbiology **52**(5): 1026-1030.

- Leite, R. S. R., Bocchini, D. A., Martins, E. D. S., Silva, D., Gomes, E. and Da Silva, R. (2007). "Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation." Applied Biochemistry and Biotechnology, **136-140**: 281-288.
- Lemos, J. L., Fontes, M. C. and Pereira, N., Jr. (2001). "Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources." Applied Biochemistry and Biotechnology **91-93**: 681-689.
- Li, X., Li, E., Zhu, Y., Teng, C., Sun, B., Song, H. and Yang, R. (2012). "A typical endo-xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its unique characteristics in xylooligosaccharide production." Carbohydrate Research **359**: 30-36.
- Li, X. L., Zhang, Z. Q., Dean, J. F., Eriksson, K. E. and Ljungdahl, L. G. (1993). "Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1." Applied and Environmental Microbiology **59**(10): 3212-3218.
- Lingappa, Y., Sussman, A. S. and Bernstein, I. A. (1963). "Effect of light and media upon growth and melanin formation in *Aureobasidium pullulans* (de By.) Arn.(= *Pullularia pullulans*)." Mycopathology Mycology Applied **20**(1-2): 109-128.
- Lotrakul, P., Deenarn, P., Prasongsuk, S. and Punnapayak, H. (2009). "Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli." African Journal of Microbiology Research **3**(5): 253-257.
- Lubomir, K. and Peter, B. (1998). "Disaccharides permeases: constituents of xylanolytic and mannanolytic systems of *Aureobasidium pullulans*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1425**(3): 560-566.

- MacAdam, J. W., Brummer, J., Islam, A. and Shewmaker, G. (2013). "The Benefits of Tannin-Containing Forages."
- Makelainen, H., Forssten, S., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N. and Ouwehand, A. C. (2010). "Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model." Beneficial Microbes **1**(1): 81-91.
- Manin, C., Shareek, F. o., Morosoli, R. and Kluepfel, D. (1994). "Purification and characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (abfA)." Biochemical Journal **302**: 443-449.
- Manisseri, C. and Gudipati, M. (2012). "Prebiotic activity of purified xylobiose obtained from ragi (*Eleusine coracana*, Indaf-15) bran." Indian Journal of Microbiology **52**(2): 251-257.
- Manitchotpisit, P., Leathers, T. D., Peterson, S. W., Kurtzman, C. P., Li, X. L., Eveleigh, D. E., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Dunlap, C. A., Vermillion, K. E. and Punnapayak, H. (2009). "Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*." Mycological Research **113**: 1107-1120.
- Mao, J., Zhang, L. and Xu, F. (2012). "Fractional and structural characterization of alkaline lignins from *Carex Meyeriana* Kunth." Cellulose Chemistry and Technology **46**(3-4): 193-205.
- Marques, G., Rencoret, J., Gutiérrez Suárez, A. and Río Andrade, J. C. d. (2010). "Evaluation of the chemical composition of different non-woody plant fibers used for pulp and paper manufacturing." The Open Agriculture Journal **3**: 1-9.
- Miller, G. L. (1959). "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Analytical chemistry **31**(3): 426-428.

- Monteil-Rivera, F., Phuong, M., Ye, M., Halasz, A. and Hawari, J. (2013). "Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials." Industrial Crops and Products **41**: 356-364.
- Moura, P., Barata, R., Carneiro, F., Gírio, F., Loureiro-Dias, M. C. and Esteves, M. P. (2007). "In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains." LWT-Food Science and Technology **40**(6): 963-972.
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H. and Parajó, J. C. (2006). "Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals." Process Biochemistry **41**(9): 1913-1923.
- Mumtaz, S., Rehman, S., Huma, N., Jamil, A. and Nawaz, H. (2008). "Xylooligosaccharide enriched yoghurt: physicochemical and sensory evaluation." Pakistan Journal of Nutrition **7**(4): 566-569.
- Nabarlatz, D., Farriol, X. and Montané, D. (2005). "Autohydrolysis of almond shells for the production of xylo-oligosaccharides: product characteristics and reaction kinetics." Industrial and Engineering Chemistry Research **44**(20): 7746-7755.
- Nakagawa, H., Mew, T., Brar, D., Peng, S., Dawe, D. and Hardy, B. (2003). Producing biomethanol and reducing CO₂ emissions from straw and husk by-products of rice. Rice science: innovations and impact for livelihood. Proceedings of the International Rice Research Conference, Beijing, China, 16-19 September 2002., International Rice Research Institute (IRRI).
- Nasr, S., Soudi, M. R., Hatef Salmanian, A. and Ghadam, P. (2013). "Partial optimization of endo-1, 4-beta-xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using agro-industrial residues." Iranian Journal of Basic Medical Sciences **16**(12): 1245-1253.

- Novaes, E., Kirst, M., Chiang, V., Winter-Sederoff, H. and Sederoff, R. (2010). "Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees." Plant Physiology **154**(2): 555-561.
- Nsahlai, I. V., Fon, F. N. and Basha, N. A. D. (2011). "The effect of tannin with and without polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial enzyme activity." South African Journal of Animal Science **41**(4).
- Okagbue, R. and Bankole, M. (1992). "Use of starter cultures containing *Streptococcus diacetylactis*, *Lactobacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* for fermenting milk for production of Nigeriannono." World Journal of Microbiology and Biotechnology **8**(3): 251-253.
- Okazaki, M., Fujikawa, S. and Matsumoto, N. (1990). "Effects of xylooligosaccharide on growth of bifidobacteria." Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi (Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science) **43**(6): 395-401.
- Okazaki, M., Koda, H., Izumi, R., Fujikawa, S. and Matsumoto, N. (1991). "In vitro digestibility and in vivo utilization of xylobiose." Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi (Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science) **44**(1): 41-44.
- Okunowo, W. O., Gbenle, G. O., Osuntoki, A. A., Adekunle, A. A. and Ojokuku, S. A. (2010). "Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by a phytopathogenic *Myrothecium roridum* and some avirulent fungal isolates from water hyacinth." African Journal of Biotechnology **9**(7): 1074-1078.
- Pal, A. and Khanum, F. (2010). "Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation." Bioresource technology **101**(19): 7563-7569.
- Panthapulakkal, S., Pakharenko, V. and Sain, M. (2013). "Microwave assisted short-time alkaline extraction of birch xylan." Journal of Polymers and the Environment **21**(4): 917-929.

- Pellerin, P., Gosselin, M., Lepoutre, J.-P., Samain, E. and Debeire, P. (1991). "Enzymatic production of oligosaccharides from corncob xylan." Enzyme and Microbial Technology **13**(8): 617-621.
- Peng, F., Ren, J. L., Xu, F., Bian, J., Peng, P. and Sun, R. C. (2009). "Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(14): 6305-6317.
- Penner, R., Fedorak, R. N. and Madsen, K. L. (2005). "Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases." Current Opinion in Pharmacology **5**(6): 596-603.
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A. and Gambacorta, E. (2015). "Donkey milk for manufacture of novel functional fermented beverages." Journal of Food Science **80**(6): 1352-1359.
- Prasongsuk, S., Sullivan, R., Kuhirun, M., Eveleigh, D. and Punnapayak, H. (2005). "Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **21**(4): 393-398.
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. (2003). "Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **30**(2): 89-94.
- Rabetafika, H. N., Bchir, B., Blecker, C., Paquot, M. and Wathelet, B. (2014). "Comparative study of alkaline extraction process of hemicelluloses from pear pomace." Biomass and Bioenergy **61**: 254-264.
- Rajput, A., Khanzada, M. and Shahzad, S. (2014). "Effect of different organic substrates and carbon and nitrogen sources on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum*." Journal of Agricultural Science and Technology **16**(4): 731-745.

- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F. and Jespersen, L. (2013). "Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products." Food Microbiology **36**(1): 22-29.
- Ramos, S. and Acha, I. G. (1975). "A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*." Transactions of the British Mycological Society **64**(1): 129-129.
- Rycroft, C., Jones, M., Gibson, G. and Rastall, R. (2001). "A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides." Journal of Applied Microbiology **91**(5): 878-887.
- Saha, S. P., Mukherjee, D. and Ghosh, S. (2012). "Submerged cultivation of *Aspergillus flavus* xym4 with water hyacinth as substrate for production of a highly active, thermostable xylanase." Annals of Biological Research **3**(10): 4884-4892.
- Samanta, A., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A., Senani, S. and Sridhar, M. (2015). "Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: production and applications." Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre **5**(1): 62-71.
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., Suresh, K. P. and Sampath, K. T. (2012). "Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali solubilized xylan of natural grass (*Sehima nervosum*)." Bioresource Technology **112**: 199-205.
- Sarkanen, K. V. and Ludwig, C. H. (1971). "Lignins: occurrence, formation, structure and reactions." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters **10**(3): 228-230.
- Sedlmeyer, F. (2011). "Xylan as by-product of biorefineries: characteristics and potential use for food applications." Food Hydrocolloids **25**(8): 1891-1898.

- Sheu, W. H.-H., Lee, I.-T., Chen, W. and Chan, Y.-C. (2008). "Effects of xylooligosaccharides in type 2 diabetes mellitus." Journal of Nutritional Science and Vitaminology **54**(5): 396-401.
- Shigemori, H., Tenma, M., Shimazaki, K. and Kobayashi, J. i. (1998). "Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*." Journal of Natural Products **61**(5): 696-698.
- Singh, R. D., Banerjee, J. and Arora, A. (2015). "Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides." Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre **5**(1): 19-30.
- Sjostrom, E. (1993). Wood Chemistry: Fundamentals and Applications. California, Academic press, Inc.
- Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., Allison, G. E., Laverdiere, J. K., Temelli, F., Vasanthan, T. and Bell, R. (2006). "Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum." Applied and Environmental Microbiology **72**(3): 1925-1931.
- Subramaniyan, S. and Prema, P. (2002). "Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application." Critical Reviews in Biotechnology **22**(1): 33-64.
- Sugumaran, K. and Ponnusami, V. (2015). "Statistical modeling of pullulan production and its application in pullulan acetate nanoparticles synthesis." International Journal of Biological Macromolecules **81**: 867-876.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P. and Kailasapathy, K. (2000). "Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt." International Journal of Food Microbiology **62**(1): 47-55.

- Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. (2008). "Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review." International Journal of Molecular Sciences **9**(9): 1621-1651.
- Takeo, K. and De Hoog, G. (1991). "Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in ascomycetous black yeasts and related fungi." Antonie van Leeuwenhoek **60**(1): 35-42.
- Tateyama, I., HAsHII, K., Johno, I., IINO, T., HIRAI, K., SUWA, Y. and KIso, Y. (2005). "Effect of xylooligosaccharide intake on severe constipation in pregnant women." Journal of Nutritional Science and Vitaminology **51**(6): 445-448.
- Tenkanen, M., Vršanská, M., Siika-aho, M., Wong, D. W., Puchart, V., Penttilä, M., Saloheimo, M. and Biely, P. (2013). "Xylanase XYN IV from *Trichoderma reesei* showing exo- and endo-xylanase activity." FEBS Journal **280**(1): 285-301.
- The Plant List. (2010). Version 1. <http://www.theplantlist.org>
- Urzi, C., De Leo, F., Passo, C. L. and Criseo, G. (1999). "Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD)." Journal of Microbiological Methods **36**(1): 95-105.
- U.S. Food and Drug Administration. (2013). GRAS Notification for Shangdong Longlive Biotechnology, Ltd.'s Xylooligosaccharides.
- Vadi, R. M., Strohfus, B. R. and West, T. P. (1996). "Characterization of xylanase from *Aureobasidium pullulans*." Microbios **85**: 179-187.
- Vazquez, M., Alonso, J., Dominguez, H. and Parajo, J. (2000). "Xylooligosaccharides: manufacture and applications." Trends in Food Science and Technology **11**(11): 387-393.

- Verjans, P., Dornez, E., Delcour, J. A. and Courtin, C. M. (2010). "Selectivity for water-unextractable arabinoxylan and inhibition sensitivity govern the strong bread improving potential of an acidophilic GH11 *Aureobasidium pullulans* xylanase." Food Chemistry **123**(2): 331-337.
- Wang, T. H. and Lu, S. (2013). "Production of xylooligosaccharide from wheat bran by microwave assisted enzymatic hydrolysis." Food Chemistry **138**(2-3): 1531-1535.
- Wang, Y., Azhar, S., Lindström, M. E. and Henriksson, G. (2015). "Stabilization of polysaccharides during alkaline pre-treatment of wood combined with enzyme-supported extractions in a biorefinery." Journal of Wood Chemistry and Technology **35**(2): 91-101.
- Whistler, R. L. and Richard, E. L. (1980). Hemicelluloses. The Carbohydrates. W. Pigman and D. Horton. New York, Academic Press: 447-469.
- Wyman, C. E., Decker, S. R., Himmel, M. E., Brady, J. W., Skopec, C. E. and Viikari, L. (2005). "Hydrolysis of cellulose and hemicellulose." Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility **1**: 1023-1062.
- Xia, A., Cheng, J., Song, W., Yu, C., Zhou, J. and Cen, K. (2013). "Enhancing enzymatic saccharification of water hyacinth through microwave heating with dilute acid pretreatment for biomass energy utilization." Energy **61**: 158-166.
- Yu, X. and Gu, Z. (2013). "Optimization of nutrition constituents for feruloyl oligosaccharides production by a new isolate of *Aureobasidium pullulans* 2012 under fermentation on wheat bran." BioResources **8**(4): 6434-6447.
- Yurlova, N. and De Hoog, G. (1997). "A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features." Antonie van Leeuwenhoek **72**(2): 141-147.
- Yurlova, N., De Hoog, G. and Van den Ende, A. (1999). "Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera." Studies in Mycology **43**: 63-69.

- Zalar, P., Gostinčar, C., De Hoog, G., Uršič, V., Sudhadham, M. and Gunde-Cimerman, N. (2008). "Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties." Studies in Mycology **61**: 21-38.
- Zhu, Y., Kim, T. H., Lee, Y., Chen, R. and Elander, R. T. (2006). "Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia." Applied Biochemistry and Biotechnology **129-132**: 586-598.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Yeast Malt (YM) Broth/Agar (Atlas, 1993)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น หากต้องการเตรียม Yeast Malt (YM) Agar ให้เติมวุ้น 15 กรัม ลงในส่วนผสมที่ละลายในน้ำกลั่นแล้ว จากนั้นนำไปอุ่นจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

2. Basal Medium (Leathers, Kurtzman และ Detroy, 1984)

Glucose	10	กรัม
Yeast-nitrogen base	6.7	กรัม
L-Asparagine	2	กรัม
KH ₂ PO ₄	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกกัน แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

3. Xylanase Production Medium (Leathers, Kurtzman และ Detroy, 1984)

Xylan	10	กรัม
Yeast-nitrogen base	6.7	กรัม
L-Asparagine	2	กรัม
KH ₂ PO ₄	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น โดยละลายแยกกัน แล้วนำมาผสมกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

4. de Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth/Agar (De Man, Rogosa และ Sharpe, 1960)

Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tri-ammonium citrate	2	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น หากต้องการเตรียม MRS Agar ให้เติมวุ้น 15 กรัม ลงในส่วนผสมที่ละลายในน้ำกลั่นแล้ว จากนั้นนำไปอุ่นจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicyclic acid (DNS) (Miller, 1959)

3,5-Dinitrosalicyclic Acid	7.49	กรัม
NaOH	13.98	กรัม
Rochelle salt (sodium potassium tartrate)	216.10	กรัม
Phenol solution (pH 7.0)	5.37	มิลลิลิตร
Sodium metabisulphate	5.86	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม 50 mM Sodium phosphate buffer pH 7

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.15	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.30	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

3. การเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์ห่อหุ้มของลิกโนเซลลูโลส

3.1 การเตรียมสารละลาย neutral detergent

Sodium lauryl sulphate	30	กรัม
Disodium ethylenediamine tetraacetate (EDTA) dehydrate	16.18	กรัม
Sodium borate decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	6.81	กรัม
Na_2HPO_4	4.56	กรัม
2-Ethoxyethanol (ethylene glycol monoethyl ether)	10	มิลลิลิตร

นำ EDTA และ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมด แล้วนำไปผสมกับ Sodium lauryl sulphate และ 2-Ethoxyethanol จากนั้นนำ Na_2HPO_4 มาละลายในน้ำกลั่นพอประมาณ และนำไปต้มจนละลายหมด แล้วนำไปผสมกับสารละลายข้างต้น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และปรับ pH อยู่ในช่วง 6.9-7.1

3.2 การเตรียมสารละลาย acid detergent

Sulfuric acid (% assay = 100)	49.04	กรัม
Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)	20	กรัม

นำกรดซัลฟิวริกใส่ในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 ลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายด้วยวิธีการไตเตรท ให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 N แล้วเติม cetyl trimethylammonium bromide ผสมให้เข้ากัน

3.3 การเตรียมสารละลาย Saturated potassium permanganate

KMnO ₄	50	กรัม
Ag ₂ SO ₄	0.05	กรัม

ละลาย KMnO₄ และ Ag₂SO₄ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดแก้วสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น อย่าให้โดนแสง

3.4 การเตรียมสารละลาย lignin buffer

Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	6	กรัม
AgNO ₃	0.15	กรัม
Potassium acetate	5	กรัม
Acetic acid, glacial	500	กรัม
Tertiary butyl alcohol	400	กรัม

ละลาย Fe(NO₃)₃·9H₂O และ AgNO₃ ในน้ำกลั่น แล้วนำไปผสมกับ acetic acid และ potassium acetate แล้วเติม tertiary butyl alcohol ผสมให้เข้ากัน

3.5 การเตรียมสารละลาย combined permanganate

ผสม saturated potassium permanganate กับ lignin buffer ในอัตราส่วน 2:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เตรียมใหม่ก่อนใช้ โดยเก็บไว้ไม่เกิน 1 สัปดาห์ ในตู้เย็นและไม่ให้ถูกแสง ถ้าสารกลายเป็นสีแดงจะใช้ไม่ได้

3.6 การเตรียมสารละลาย demineralizing

Oxalic acid dehydrate	50	กรัม
95% Ethanol	700	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid (HCl)	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

ละลาย oxalic acid dehydrate ใน 95% ethanol แล้วเติม HCL และน้ำกลั่นตามลำดับ
ผสมให้เข้ากัน



ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

(Goering และ Van Soest, 1970)

1. การสกัดด้วยสารละลาย neutral detergent

1.1 นำ sintered glass crucible เบอร์ 1 ขนาด 50 มิลลิลิตร ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่โถดูดความชื้น (desiccator) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

1.2 นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการบดละเอียดใส่ในบีกเกอร์ทรงสูง แล้วเติมสารละลาย neutral detergent 100 มิลลิลิตร sodium sulfite 0.5 กรัม และ decarhydronephthalene 2 มิลลิลิตร นำมารีฟลักซ์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.3 ถ่ายส่วนผสมที่ผ่านการรีฟลักซ์ลงใน sintered glass crucible ล้างตัวอย่างใน crucible ด้วยน้ำร้อน (90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย acetone 2 ครั้ง ตูดสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum pump จากนั้นนำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.4 นำ crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ ปริมาณของ neutral detergent fiber (NDF)

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ NDF} = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก NDF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

2. การสกัดด้วยสารละลาย acid detergent

2.1 นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการสกัดด้วย neutral detergent มาถ่ายใส่บีกเกอร์ เพื่อทำการรีฟลักซ์ ด้วย acid detergent โดยเติม acid detergent 100 มิลลิลิตร และ decahydronaphthalene 2 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนับเวลาตั้งแต่เริ่มเดือด

2.2 กรองตัวอย่างพืชใน crucible ใ้เติม เพื่อลดการสูญเสียตัวอย่างให้น้อยที่สุด แล้วล้างด้วยน้ำ ร้อน(90-100 องศาเซลเซียส) 3-4 ครั้ง แล้วล้างด้วย 80% ethanol 2 ครั้ง

2.3 นำ crucible ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปล่อยให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่ได้คือ น้ำหนักของ acid detergent fiber (ADF) น้ำหนักที่แตกต่างระหว่าง NDF และ ADF คือ น้ำหนักของ เฮมิเซลลูโลส

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ ADF} = \frac{[(\text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF}) - \text{น้ำหนัก crucible}] \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\% \text{ Hemicellulose} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

3. การวิเคราะห์หา permanganatelignin (PML)

3.1 เติมน้ำสารละลาย combined permanganate 25 มิลลิตร ลงใน crucible ที่มีตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดด้วย acid detergent แล้วแช่ crucible ลงในภาชนะที่มีน้ำเย็นสูงประมาณ 2 เซนติเมตร คนด้วยแท่งแก้วเป็นบางครั้งเพื่อไม่ให้ตัวอย่างจับกันเป็นก้อน ทิ้งไว้ 45 นาที จากนั้นดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump

3.2 เติมน้ำสารละลาย combined permanganate 25 มิลลิตร ลงใน crucible อีกครั้ง ทิ้งไว้ 45 นาที แล้วดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump

3.3 เติมน้ำสารละลาย demineralizing ลงใน crucible แต่ละถ้วยแช่ไว้ 5 นาที แล้วดูดสารละลายออกโดยใช้ vacuum pump ทำซ้ำจนตัวอย่างเป็นสีขาวภายในเวลา 20 นาที จากนั้นล้างด้วย 80% ethanol และ acetone แล้วดูดให้แห้งด้วย vacuum pump

3.4 นำ crucible ไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำปล่อยให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง acid detergent fiber (ADF) และน้ำหนักพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก คือ น้ำหนักของลิกนิน

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Lignin} = \frac{(A - B) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\begin{aligned}
 \text{โดยที่ } A &= \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนัก ADF} \\
 B &= \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนักพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก} \\
 C &= \text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}
 \end{aligned}$$

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเซลลูโลสด้วยการเผาเถ้า

นำ crucible ที่ผ่านการสกัดลิกนินออกแล้วไปเผาในเครื่องเผาเถ้าที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปล่อยให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนัก น้ำหนักที่แตกต่างกันระหว่าง น้ำหนักพืชที่ผ่านการสกัดลิกนินออก และน้ำหนักหลังการเผาเถ้า คือ น้ำหนักเซลลูโลส ส่วนน้ำหนักเถ้า คือ ผลต่างระหว่างน้ำหนักหลังการเผาและน้ำหนัก crucible

วิธีคำนวณ

$$\% \text{ Cellulose} = \frac{(B - D) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืช}}$$

$$\text{โดยที่ } D = \text{น้ำหนัก crucible} + \text{น้ำหนักตัวอย่างพืชหลังการเผา}$$

ภาคผนวก ง

ต้นทุนวัตถุดิบในการผลิต

1. ต้นทุนวัตถุดิบของ production medium ที่เหมาะสมปริมาณ 1 ลิตร

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัม)	ราคา (บาท)	ที่มา
ฟางข้าว	38.90	0.08	http://www.thairath.co.th/content/479208
NaNO ₃	7.50	4.58	Ajax Chemical
KH ₂ PO ₄	5.00	4.20	Ajax Chemical
รวม		8.86	

จาก แอคติวิตีของไซแลเนสเท่ากับ 5.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หรือ 5,190 ยูนิตต่อลิตร

ดังนั้น การผลิตไซแลเนสมีราคาต้นทุนวัตถุดิบเท่ากับ 9.21 บาทต่อ 5,190 ยูนิต

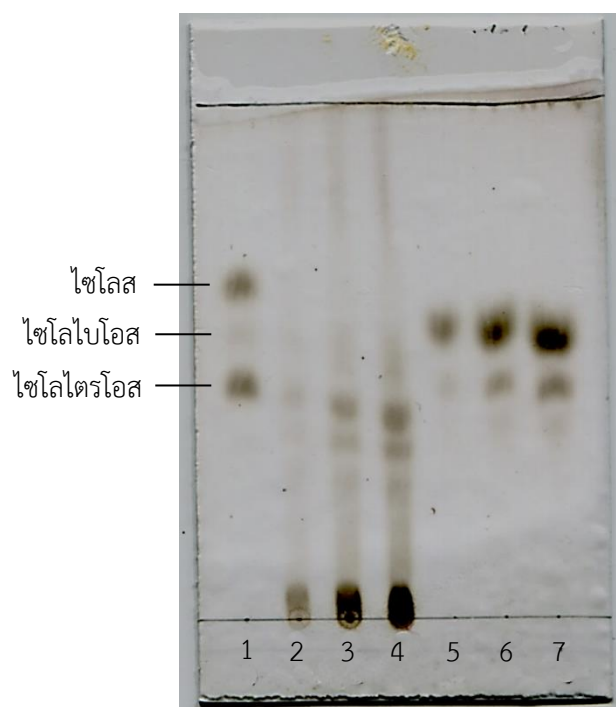
ดังนั้นราคาต้นทุนวัตถุดิบเท่ากับ 1.8 บาทต่อ 1000 ยูนิต

2. ต้นทุนวัตถุดิบของการผลิตไซแลนจากหญ้าแฝกปริมาณ 1 กิโลกรัม

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัม)	ราคา (บาท)	ที่มา
หญ้าแฝก	4,761.90	21.70	http://board.kobalnews.com/view.php?category=&wb_id=7358
NaOH	14,285.70	428.57	Qrec
NaBH ₄	1,190.50	1,869.09	HiMedia
รวม		22,998.30	

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ และไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน
ด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC)



- | | | |
|-------------------|-----|---|
| หมายเลข 1 | คือ | ไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส มาตรฐาน |
| หมายเลข 2 3 และ 4 | คือ | ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์หยาบ |
| หมายเลข 5 6 และ 7 | คือ | ไซโลอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน |

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธนัชชา ผาดิพงค์ เกิดเมื่อวันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2533 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2555 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับ ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาในปี 2558

