การผลิตไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (XOS) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากธูปฤาษี (*Typha angustifolia* L.) ด้วยไซแลนเนสที่ผลิตโดย *Aureobasidium melanogenum*

Production of Xylooligosaccharides (XOS) from Cattail (*Typha angustifolia* L.) and Their Antioxidant Activity Using Xylanase Produced by *Aureobasidium melanogenum*

เบญจวรรณ ยันต์เศษภักดี (Benjawan Yanwisetpakdee)* **ดร.สีหนาท ประสงค์สุข** (Dr.Sehanat Prasongsuk)**
ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ (Dr.Hunsa Punnapayak)[1]***

บทคัดย่อ

การนำทรัพยากรธรรมชาติที่พบในประเทศไทยมาผลิตเป็นสารเพิ่มมูลค่าด้วยเทคโนโลยีชีวภาพนั้นเป็นที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้เริ่มจากคัดกรองรา *Aureobasidium melanogenum* จำนวน 50 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ดี แอคติวิตีที่ดีที่สุดของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจากสายพันธุ์ที่เลือกไว้มีค่าเท่ากับ 7.27±0.07 หน่วยต่อมิลลิลิตร นำเอนไซม์ไปย่อยไซแลนที่สกัดจากธูปฤาษี (*Typha angustifolia* L.) เพื่อผลิตไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharides, XOS) และนำ XOS ที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์หยาบย่อยไซแลนในอัตราส่วน 25 หน่วยต่อกรัมของไซแลน สามารถผลิต XOS ได้ 28.16±0.02 มิลลิกรัมของกรัมไซแลน โดย XOS ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อใช้ XOS ปริมาณมากขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของ XOS 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 68.47±1.63 เปอร์เซ็นต์

ABSTRACT

The use of natural resources found in Thailand for the production of value added products using biotechnology is of interest. Fifty strains of *Aureobasidium melanogenum* were screened for high yield of xylanase production. The highest activity of xylanase produced from the selected strain was 7.27±0.07 Uml^{-1}. The enzyme was used for hydrolysis of xylan extracted from cattail (*Typha angustifolia* L.) for xyloologosachharides (XOS) production. The objective XOS was tested for scavenging activity using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydra-

[1] *Correspondent author: phunsa@chula.ac.th*
** นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*
**** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

zyl assay. Crude xylanase was applied for xylan hydrolysis at 25 Ug^{-1} of xylan. XOS was obtained at 28.16±0.02 mgg^{-1} of xylan. Freeze dried XOS powder was light brown in color and exhibited antioxidant activity. The higher antioxidant activity was observed when XOS concentration was increased and the maximum antioxidant activity (68.47±1.63% inhibition) was achieved at 10 $mgml^{-1}$of XOS.

คำสำคัญ: *Aureobasidium pullulans* ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
Keywords: *Aureobasidium pullulans*, Xylooligosaccharide, Antioxidant

บทนำ

ไซแลนเป็นพอลิเมอร์ซับซ้อนประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสที่พบได้มากในผนังเซลล์พืช จึงจัดเป็นแหล่งทรัพยากรหมุนเวียนที่สำคัญ โครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของไซแลนมีความหลากหลายและมีสมบัติแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของพืชที่เป็นแหล่งของไซแลน [1] ความต้องการใช้ไซแลนในอุตสาหกรรมอาหารมีปริมาณสูงขึ้น โดยทั่วไปไซแลนมีราคาขายในปัจจุบันอยู่ที่ประมาณ 11,500 บาทต่อ 100 กรัม [2] เนื่องจากไซแลนสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharides, XOS) ซึ่งเป็นน้ำตาลโอลิโกเมอร์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการอุปโภคและบริโภคได้ [3] โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้เป็นส่วนผสมที่สำคัญในอุตสาหกรรมยาและเวชภัณฑ์โดยนำไปใช้เป็นสารผสมสำหรับสารนำส่งยา (drug delivery) สารมีฤทธิ์ในการต้านทานจุลินทรีย์ (antimicrobial agents) และสารมีฤทธิ์ต้านทานอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เป็นต้น [4–5] ซึ่งราคาของ XOS บริสุทธิ์มีราคาขายอยู่ที่ประมาณ 240,000 บาทต่อ 0.5–1 กรัม [6] ดังนั้น หากสามารถผลิต XOS โดยใช้วัตถุดิบที่หาได้ในประเทศจะช่วยทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลงและทำให้เกิดความคุ้มทุนทางเศรษฐกิจในการผลิต XOS มากขึ้น

ธูปฤาษี (*Typha angustifolia* L.) เป็นวัชพืชน้ำที่พบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบการแพร่ระบาดกระจายอยู่ทั่วไปในเขตพื้นที่ชุ่มน้ำ และพบหนาแน่นในเขตพื้นที่ภาคกลาง การกำจัดธูปฤาษีทำได้ยากและมีค่าใช้จ่ายสูง เพราะมีลำต้นใต้ดินและรากยึดเกาะอย่างแข็งแรง เนื่องจากธูปฤาษีมีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสูงถึง 38.5 เปอร์เซ็นต์ และ 37.6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก จึงได้รับความสนใจและถูกเสนอให้เป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทธานอล [7] ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำธูปฤาษีมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการนำมาผลิต XOS ได้ เพราะมีปริมาณมากและหาได้ง่าย อีกทั้งการใช้วัชพืชเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่า (value added product) นอกจากจะช่วยควบคุมการแพร่กระจายแล้วยังเป็นการช่วยแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมจากวัชพืชที่มีมากจนเกินไป และยังเป็นการช่วยให้เกิดการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศได้แบบยั่งยืนอีกด้วย

การผลิต XOS ด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ได้รับความนิยมสูง เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีความจำเพาะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่เป็นที่ต้องการต่ำ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างจึงเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม วิธีการผลิตก็ไม่ยุ่งยาก และยังเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ง่ายอีกด้วย [5] เมื่อคำนึงถึงปัจจัยทางเศรษฐกิจในการผลิต XOS การใช้เอนไซม์หยาบที่ผลิตจากราที่คัดแยกได้ในประเทศจัดเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในทางปฏิบัติมากกว่าการใช้เอนไซม์ทางการค้าที่มีความบริสุทธิ์สูงแต่มีราคาแพง อีกทั้ง

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์ทั้งสองประเภทไม่แตกต่างกัน [8] *Aureobasidium melanogenum* เป็นราคล้ายยีสต์ที่พบได้ทั่วไป ในอดีตเคยถูกจัดเป็นวาไรตีหนึ่งในชนิด *A. pullulans* [9] ทั้ง *A. melanogenum* และ *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ พูลลูแลนที่ใช้ในทางการค้าและอุตสาหกรรม ได้แก่ อาหาร ยาและเครื่องสำอาง นอกจากการผลิตพูลลูแลนแล้ว ราทั้ง 2 ชนิดนี้มีจุดเด่นคือ สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่ปราศจากเซลลูเลส โดยเฉพาะราสายพันธุ์เขตร้อนเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซแลนโนไลติกที่มีแอคติวิตีสูงและขับออกมาภายนอกเซลล์ [10-11] ซึ่งในประเทศไทยมีการคัดแยกและศึกษาสมบัติของราชนิดนี้เพื่อผลิตพูลลูแลนและประยุกต์ในเชิงอุตสาหกรรม [11-14] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิต XOS จากวัชพืชธูปฤาษีโดยใช้ไซแลนเนสที่ผลิตโดย *A. melanogenum* สายพันธุ์ที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงที่สุดซึ่งคัดแยกได้ในประเทศไทย และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ XOS ที่ผลิตได้ ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารตัวเติมในอุตสาหกรรมอาหารและอื่น ๆได้ [3-5, 15]

วิธีการวิจัย

การตรวจสอบและการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส

นำ *A. melanogenum* จำนวน 50 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย [16] มาตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเบื้องต้น บนอาหารแข็งและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสในอาหารเหลว ดังนี้

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสเบื้องต้น ด้วยวิธี Congo Red plate assay [17] โดยใช้บีชวูดไซแลน (Beechwood xylan, Sigma, St. Louis, MO) เป็นแหล่งคาร์บอน (1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร) และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดวงใสบนอาหารแข็งไปตรวจสอบการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาณในขั้นต่อไป

นำเชื้อที่ให้วงใสจากการทดสอบบนอาหารแข็งมาผลิตเอนไซม์ โดยเลี้ยงในอาหารสูตรเพื่อการผลิต (Production medium; PM) ตามวิธีการของ Manitchotpisit และคณะ [11] เตรียมหัวเชื้อในอาหารสูตร Basal medium โดยถ่ายเชื้อ 1 ลูปลงในอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30+2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ถ่ายหัวเชื้อที่ได้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในอาหารสูตร PM ที่เติมบีชวูดไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส และตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โดยดัดแปลงวิธีการของ Leather [10] โดยนำสารละลายเอนไซม์ไซแลนเนสที่เจือจางอย่างเหมาะสมผสมกับสารละลายบีชวูดไซแลนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ใน 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเทต บัฟเฟอร์ (sodium acetate buffer) ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีดีเอ็นเอส (DNS, dinitrosalicylic acid) [18] วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และคำนวนแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยที่ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ภายใต้ภาวะการทดลอง

การสกัดไซแลนจากธูปฤาษี

เก็บตัวอย่างธูปฤาษีจากพื้นที่ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม จากนั้นระบุชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเก็บตัวอย่างแห้ง (Herbarium number : A01532) ไว้ในพิพิธภัณฑ์สถานพืชศาสตราจารย์กสิน สุวะตะพันธุ์ (BCU) ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สกัดไซแลนจากธูปฤาษีด้วยวิธีการดัดแปลงจาก Yoon และคณะ [19] และ Chapla และคณะ [20] โดยบดธูปฤาษีที่ผ่านการอบแห้งแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 เมช ให้ได้ขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร แล้วชั่งมาจำนวน 5 กรัม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที นำสารผสมที่ได้ไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แล้วปั่นแยกส่วนของเหลวกับตะกอนออกจากกันด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ระดับ 16,270 xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนสารละลายที่มีเฮมิเซลลูโลสไปปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปตกตะกอนไซแลนโดยใช้เอทธานอลต่อสารละลายในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 แล้วกรองแยกตะกอนไซแลนเพื่อนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การผลิต XOS

ผลิต XOS จากไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ใน 50 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเทตบัฟเฟอร์ ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 โดยเติมเอนไซม์ในอัตราส่วน 25 ยูนิตต่อกรัมของสารตั้งต้น (Ug^{-1}) [3] จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในภาวะเขย่าที่อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที และตรวจสอบปริมาณ XOS ที่ผลิตได้ ด้วยการเก็บตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ที่เวลา 1 2 4 6 8 12 16 20 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นแยกตะกอนออกจากสารละลายที่ 1,200 xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วตกตะกอนไซแลนที่ไม่ถูกย่อยออกด้วยเอทธานอลอีกครั้ง โดยใช้อัตราส่วนของเอทธานอลต่อสารละลายเป็น 3 ต่อ 1 จากนั้นแยกส่วนของไซแลนออกโดยการกรอง นำส่วนสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำส่วนของแข็งที่ได้ไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง [3, 21]

การวิเคราะห์ XOS

ตรวจสอบปริมาณ XOS ที่ผลิตได้ด้วยการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS และตรวจสอบองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography, TLC) โดยหยดสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครกรัมบนแผ่นซิลิกาเจล (Silica Gel 60 F524 TLC plates, Merck, Darmstadt, Germany) และย้อมสีโดยใช้สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มต่อกรดแอซีติกต่อน้ำ ในอัตราส่วน 6:7:1 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและจุ่มในสารละลายผสมระหว่างเอทธานอลและกรดซัลฟิวริก ในอัตราส่วน 19:1 (ปริมาตรโดยปริมาตร) จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส [21] เปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ที่ได้กับน้ำตาลมาตรฐานไซโลส (Xylose) ไซโลไบโอส (Xylobiose) ไซโลไทรโอส (Xylotriose) และไซโลเททระโอส (Xylotetraose) (Megazyme, Ireland) ตรวจสอบโครงสร้างของไซแลนภายหลังการย่อยด้วย Fourier transform infrared (FTIR) spectra โดยใช้ Perkin Elmer-Spectrum RX1 spectrometer (32 scans; resolution, 4 cm^{-1}) ในช่วง 4000–600 cm^{-1} ที่ความละเอียด 8 cm^{-1} ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด XOS จากธูปฤาษี ด้วยวิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay [3, 15] โดยนำผง XOS มาละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ระหว่าง 0.2 0.4 0.8 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 4.0 5.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DPPH ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 120 นาที แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยสมการ

DPPH radical scavenging activity (%) = (1 – absorbance of sample/absorbance of control) x 100

การวิเคราะห์สถิติ

ทุกการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติได้แก่ ค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics for Windows Version 22 (IBM Corp., USA) เพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ต่อช่วงเวลา และปริมาณ XOS ที่ผลิตได้ต่อช่วงเวลา โดยแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสและการผลิตเอนไซม์

เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสด้วยวิธี Congo Red plate ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสใน *A. melanogenum* ทุกสายพันธุ์ สอดคล้องกับการรายงานของ Manitchotpisit และคณะ [11] ซึ่งคัดแยกรา *Aureobasidium* จำนวน 45 ไอโซเลตจากแหล่งอาศัยบนบกและที่ชุ่มชื้นด้วยน้ำจืดในประเทศไทยและตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส พบว่าทุกไอโซเลตผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ โดยเฉพาะไอโซเลตที่เป็น color-variant จำนวน 9 ไอโซเลตที่ผลิตเม็ดสีอื่น ๆ นอกจากสีดำ ได้แก่ สีชมพู สีเหลือง สีแดง และสีม่วง เมื่อเลี้ยง *A. melanogenum* แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลวเพื่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าสายพันธุ์ BCU058 (ภาพที่ 1) สามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงที่สุด โดยตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสจาก *A. melanogenum* ที่ตรวจสอบในการศึกษานี้อยู่ระหว่าง 2.03±0.15 ถึง 7.27±0.07 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ในขณะที่ Manitchotpisit และคณะ [11] รายงานว่าตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ไซแลนเนสอยู่ระหว่าง 7.1±0.1 ถึง 94.3±1.8 หน่วยต่อมิลลิตร ทั้งนี้ *A. melanogenum* BCU058 เป็นสายพันธุ์ color-variant โดยมีรายงานว่าสายพันธุ์ color-variants ของ *A. pullulans* และชนิดใกล้เคียงสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่มีแอคติวิตีสูงกว่าสายพันธุ์ปกติที่มีสีคล้ำและ color variants นี้คัดแยกได้เฉพาะในเขตร้อนหรือกึ่งเขตร้อนเท่านั้น [10, 13] ทั้งนี้การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสจาก Aureobasidium ที่คัดแยกได้ในแหล่งอาศัยที่ต่างออกไป เช่น แหล่งอาศัยชายฝั่งซึ่งได้รับอิทธิพลจากความเค็มยังมีการศึกษาน้อย สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากบริเวณเหล่านี้มีรายงานการตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์พืชได้สูง [22] แต่ในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตโดย *A. melanogenum* ที่คัดแยกได้ จากแหล่งอาศัยเหล่านี้ ทำให้น่าสนใจที่จะศึกษาและนำไปประยุกต์ใช้ จึงได้คัดแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูงสุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ไซแลนจากธูปฤาษี การผลิตและการวิเคราะห์ XOS

การสกัดไซแลนจากวัตถุดิบสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้สารละลายด่างเนื่องจากจะช่วยกำจัดลิกนินที่มีในวัตถุดิบออกไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ [4, 19] อีกทั้งทำให้วัตถุดิบพองตัวจึงเพิ่มพื้นที่ภายใน ให้สารเคมีเข้าทำปฏิกิริยาได้ง่าย ทั้งนี้สารละลายด่างทำให้เกิดการแตกหักของพอลิเมอร์ที่เป็นโครงสร้างของพืช ได้แก่ เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสจึงส่งผลต่อการหลุดออกของลิกนินไซแลนจึงถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลายเพิ่มขึ้นได้ [23] ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์ สกัดไซแลนจากธูปฤาษีภายใต้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถสกัดไซแลนได้ 92 มิลลิกรัมต่อกรัมธูปฤาษี หรือเท่ากับ 24.45 เปอร์เซ็นต์โดย

น้ำหนักของเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในธูปฤาษี [7] มีรายงานว่าการสกัดไซแลนจากซังข้าวโพดโดยใช้กรดร่วมกับความร้อนสามารถผลิตไซแลนได้ 178 มิลลิกรัมต่อกรัมซังข้าวโพด [20] แม้การสกัดด้วยกรดร่วมกับความร้อนจะให้ปริมาณไซแลนมากกว่า แต่วิธีการนี้มีหลายขั้นตอนซึ่งกินเวลานาน และต้องการอุปกรณ์หลายอย่าง ได้แก่ เครื่องไมโครเวฟที่ควบคุมความยาวคลื่น และหม้อนึ่งความดัน เป็นต้น การสกัดด้วยด่างในการทดลองนี้ไม่ยุ่งยากเท่าและใช้เวลาน้อยกว่า จึงเหมาะสมกว่าในเชิงเศรษฐกิจ

มีรายงานว่า *A. pullulans* ผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสที่ประกอบด้วยไอโซเอนไซม์ที่หลากหลาย จึงสามารถย่อยสารตั้งต้นที่แตกต่างกันได้หลายชนิด เมื่อใช้ไซแลนที่สกัดจากธูปฤาษีเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิต XOS โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส ที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *A. melanogenum* BCU058 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) พบว่า ไซแลนตั้งต้น 1 กรัม สามารถผลิต XOS ได้ 28.16±0.02 มิลลิกรัม ภายในเวลา 16 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) หรือเท่ากับ 0.257 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งธูปฤาษี ในขณะที่เมื่อใช้ภาวะย่อยเดียวกัน การใช้ไซแลนจากชานอ้อยความเข้มข้น 2 กรัม เมื่อใช้เอนไซม์ไซแลนเนสจาก Pichia stipisis สามารถผลิต XOS ได้ปริมาณ 52.9 มิลลิกรัม ภายในเวลา 12 ชั่วโมงจากนั้นอัตราการผลิตจะลดลง ซึ่งแม้ว่าปริมาณของ XOS ที่ผลิตจากธูปฤาษีได้ปริมาณน้อยกว่าแต่ปริมาณของไซแลนที่ใช้ก็น้อยกว่าเช่นกัน [3] นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าการย่อยสารตั้งต้นเพื่อให้ได้เป็น XOS ด้วยเอนไซม์ควรคำนึงถึงระยะเวลาที่เหมาะสม ไม่ควรใช้ระยะเวลานานเพราะนอกจากปริมาณ XOS ที่ได้จะไม่เพิ่มขึ้นอาจทำให้ปริมาณของ XOS ลดลงได้ด้วย โดยอาจเกิดจากบริเวณที่เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นลดน้อยลงทำให้ไม่สามารถย่อยได้อีก หรือ XOS ที่เกิดขึ้นเกิดการย่อยสลาย หรือเกิดจากประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากการยับยั้งของผลิตภัณฑ์สุดท้าย เป็นต้น โดยช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิต XOS พบว่าอยู่ระหว่าง 8–16 ชั่วโมง ทั้งนี้สมบัติของเอนไซม์ที่ใช้เป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้อง สอดคล้องกับรายงานของ Christov และ Prior [24] ซึ่งใช้เอนไซม์ไซแลนเนสที่ผลิตจาก *A. pullulans* เพื่อย่อยไซแลนจากเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส พบปริมาณของ XOS ภายหลังจากการทำปฏิกิริยาผ่านไป 24 ชั่วโมง มีอัตราลดลง สำหรับชนิดของ XOS ที่ได้จากการย่อย มีรายงานว่าการใช้เอนไซม์ไซแลนเนสจากรา Aspergillus oryzae MTCC 5154 และ Geobacillus thermoleovorans สามารถย่อยไซแลนจากซังข้าวโพดและได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโลสและ XOS ชนิดที่มี DP (Degrees of polymerization) สามหรือสูงกว่าเป็นองค์ประกอบ [3] เช่นเดียวกับ ไซแลนเนสจาก Streptomyces olivaceoviridis E-86 สามารถผลิตไซโลไบโอสจากไซแลนที่สกัดจากซังข้าวโพดได้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และพบไซโลสรวมกับไซโลไทรโอสในปริมาณเล็กน้อย [3] โดยทั่วไป ไซแลนเนสจะเข้าทำลายพันธะไกลโคซิดิกของไซแลนอย่างสุ่ม ทำให้เกิดเป็น XOS ชนิดต่าง ๆ [15] ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ พบว่าเอนไซม์ไซแลนเนสหยาบจาก *A. melanogenum* BCU058 สามารถย่อยไซแลนจากธูปฤาษีได้ ทั้งนี้โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางแสดงให้เห็นแถบของผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นสารละลายผสม เมื่อปรียบเทียบกับสารมาตรฐานจึงอาจแยกออกจากกันได้ไม่ชัดเจน แต่พบแถบระหว่างไซโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลักและพบไซโลสในปริมาณเล็กน้อย (ภาพที่ 2) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Christov และ Prior [24] เมื่อใช้เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* เพื่อย่อยไซแลนจากเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสและเปลือกข้าวโอ๊ต (1.5 ยูนิตต่อกรัมไซแลน) สามารถผลิตไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไทรโอสได้ โดยชนิดของ XOS ที่เกิดขึ้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและโครงสร้างของสารตั้งต้น

เมื่อตรวจสอบโครงสร้างของ XOS ที่ได้ด้วยเทคนิค FT-IR spectroscopy เพื่อศึกษาสมบัติของไซแลนที่เปลี่ยนแปลงไปจากการย่อยของเอนไซม์

และตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [25] โดยพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืชมีเอกลักษณ์จำเพาะอยู่ระหว่างความยาวคลื่นในช่วง 1200–800 cm^{-1} (ภาพที่ 3)

เมื่อไซแลนถูกย่อยจึงใช้สำหรับตรวจสอบโครงสร้างของมอโนแซ็กคาไรด์ที่เปลี่ยนแปลงไป [26] จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า XOS ที่ผลิตจากธูปฤาษีแสดงความยาวคลื่นที่ 894 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะของพันธะบีต้า-ไกลโคซิดิก (β-glycosidic) ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลซึ่งยังหลงเหลืออยู่ และตรวจพบความยาวคลื่นที่ 995 cm^{-1} ซึ่งแสดงชนิดของอะราบิโนไซแลน (Arabinoxylan) [26] ตรวจพบความยาวคลื่นที่ 1040 cm^{-1} แสดงถึงพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมต่อระหว่างโครงสร้างของ C-O-C ในขณะที่ความยาวคลื่นในช่วง 1251 และ 1342 cm^{-1} เป็นพันธะระหว่าง C-H และ OH หรือ C-O ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการสั่นของอะตอม นอกจากนี้ยังพบช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 1566 และ 1407 cm^{-1} ซึ่งแสดงลักษณะสมมาตรและอสมมาตรที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการสั่นของอะตอมคาร์บอกซิเลท (C=O) อีกด้วย โดยที่ความยาวคลื่นในช่วงนี้ยังแสดงถึงชิ้นส่วนที่ตกค้างของกรดยูโรนิก (Uronic acid) ด้วย โดยมีรายงานว่าเป็นโครงสร้างที่ทำให้ XOS มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ [3, 15, 27] เช่นเดียวกับที่ตรวจพบใน XOS จากธูปฤาษี สำหรับความยาวคลื่นที่หายไปในช่วง 1730 cm-1 ของพันธะในอะตอม carbonyl เป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่าหมู่ acetyl ในเฮมิเซลลูโลสถูกทำลายลง จึงปลดปล่อยไซแลนออกมาจากธูปฤาษีได้ [3]

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด XOS จากธูปฤาษี

สารต้านอนุมูลอิสระกำลังได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์โดยมีการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อผลิตเป็นยาแก้อักเสบ ยาต้านทานการแข็งตัวของหลอดเลือดและหัวใจ รวมถึงมีสมบัติในการต้านทานมะเร็งได้อีกด้วย [15] ซึ่ง XOS ที่ผลิตได้เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยมีร้อยละของความสามารถในการยับยั้ง (inhibition activity) เพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ XOS มากขึ้น แม้ว่าค่าสูงสุดที่ได้เป็น 68.47±1.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ XOS ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ค่าที่ได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) กับการใช้ XOS ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ให้ผลการยับยั้งเป็น 66.63+0.68 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้ปริมาณของ XOS น้อยกว่าครึ่งหนึ่ง นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ XOS ที่ผลิตได้จากต้นอ้อ (*Arundo donax* L.) เมื่อใช้ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมแสดงการยับยั้ง 45 เปอร์เซ็นต์ แต่ XOS ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไม่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ [28] ในขณะที่ XOS ที่ผลิตจากธูปฤาษีแสดงการยับยั้งสูงกว่า ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH มีความไวต่อสารอนุมูลอิสระแม้ใช้ในปริมาณน้อย อีกทั้งยังให้ผลทดสอบในระยะเวลาสั้น จึงเป็นที่นิยมสำหรับการตรวจสอบสารต้านทานอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ๆ [29] มีรายงานว่า XOS ที่ผลิตจากข้าวสาลีมีค่าอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลสูงกว่าที่พบในซังข้าวโพด โดยค่าที่ได้เท่ากับ 2300.5±190.5 และ 400.6±170.9 ไมโครโมลโทรลอกซ์ต่อลิตร สำหรับข้าวสาลีและซังข้าวโพดตามลำดับ [30] ซึ่งอนุพันธ์ที่เกิดจากโครงสร้างดังกล่าว เช่น กรดเฟรูลิกและกรดยูโรนิก แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง ด้วยเหตุนี้ เพื่อให้ได้ XOS ที่ยังคงสัดส่วนของกรดยูโรนิกในองค์ประกอบและสามารถแสดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงกำจัดสารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แซ็คคาไรด์ที่ต้องการออกไป จึงเลือกใช้เอทธานอลเป็นตัวทำละลาย ทำให้ได้ XOS ที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นและมีปริมาณยูโรนิกสูง แม้ปริมาณการนำกลับคืนสารจะต่ำกว่าการใช้สารละลายอื่น ๆ [3, 15, 21]

สรุปผลการวิจัย

การใช้วัชพืชธูปฤาษีที่หาได้ง่ายในประเทศไทยมาสกัดไซแลนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิต XOS ในการทดลองนี้สามารถทำได้ดีโดยใช้การย่อยผงธูปฤาษีด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.25 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถผลิต XOS ได้ในปริมาณ 0.257% โดยน้ำหนัก และ XOS ที่ผลิตได้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย ซึ่งเอนไซม์ไซแลนเนสที่ใช้ในการผลิต XOS เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจาก *A. melanogenum* BCU058 สายพันธุ์เขตร้อนที่คัดแยกได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลในประเทศไทย ผลการทดลองที่ได้นอกจากจะสามารถผลิตผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าจากวัชพืชที่หาได้ง่าย และมีมูลค่าต่ำมาทำให้มีราคาสูงขึ้นแล้วยังเป็นการช่วยกำจัดวัชพืชออกจากระบบสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นการใช้ทรัพยากรในประเทศได้อย่างยั่งยืนอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

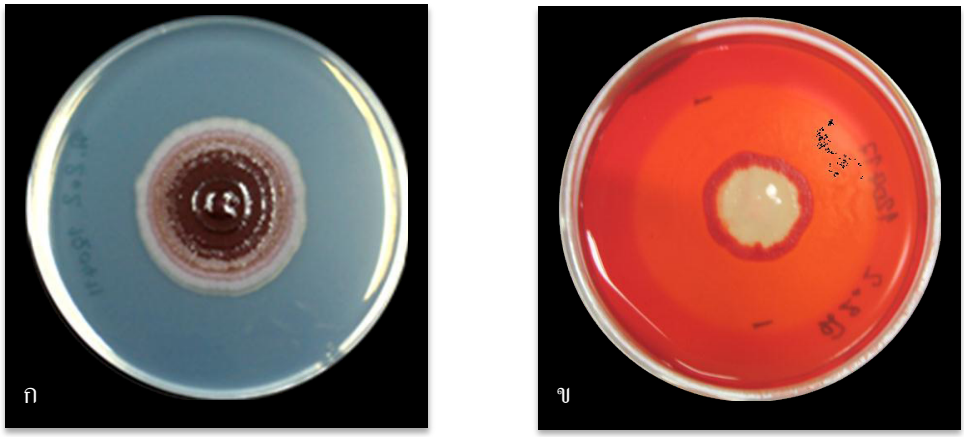
งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2557 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU-57-043-EN) หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Dhiman SS, Sharma J, Battan B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. Bioresources. 2008; 3(4): 1377-1402.
2. Xylan from Beechwood [Internet] 2015 [updated 2013 Jan 9; cited 2015 June 28]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/x4252?lang=en&region=TH.
3. Bian J, Peng F, Peng XP, Peng PXF, Sun RC. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. Bioresource Technol. 2013; 127: 236-241.
4. Carvalho AFA, Neto PO, Silva DF, Pastore, GM. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. Food Res Int. 2013; 51: 75-85.
5. Liu J, WillfÖr S, Xu C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. 2015; 5: 31-61.
6. Xylobiose [Internet] 2015 [updated 2013 Jan 9; cited 2015 June 28]. Available from: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=xylobiose&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=en&region=TH&focus=product.
7. Ruangmee A, Sangwichien C. Statistical optimization for alkali pretreatment conditions of narrow-leaf cattail by response surface methodology. Songklanakarin J Sci Technol. 2013; 35(4): 443-450.
8. Raj A, Kumar S, Singh SK, Kumar M. Characterization of a new *Providencia* sp. strain X1 producing multiple xylanases on wheat bran. Scientific World J. 2013; Article ID 386769, 10 pages. doi/10.1155/2013/386769.

9. Gostinčar C, Ohm RA, Kogej T, Sonjak S, Turk M, Zajc J. et al. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. BMC Genomics. 2014; 15: 549.
10. Leathers TD. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. Appl Envi Microb. 1986; 52(5): 1026-1030.
11. Manitchotpisit P, Leathers TD, Peterson SW, Kurtzman CP, Li XL, Eveleigh DE, et al. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans.* Mycol Res. 2009; 113: 1107-1120.
12. Lotrakul P, Deenarn P, Prasongsuk S, Punnapayak H. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some *Aspergilli.* AFR J Microbiol Res. 2009; 3(5): 253-257.
13. Prasongsuk S, Sullivan RF, Kuhirun M, Eveleigh DE, Punnapayak H. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans.* World J Microbiol Biotechnol. 2005; 21: 393-398.
14. Punnapayak H, Sudhasham M, Prasongsuk S, Pichayangkura S. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. J Ind Microbiol Biot. 2003; 30: 89-94.
15. Veenashri BR, Muralikrishna G. In vitro anti-oxidant activity of xylo-oligosaccharides derived from cereal and millet brans–A comparative study. Food Chem. 2011; 126: 1475-1481.
16. Yanwisetpakdee B, Lotrakul P, Prasongsuk S, Seelanan T, White JF, Eveleigh DE, et al. Association among halotolerance, osmotolerance and exopolysaccharide production of *Aureobasidium melanogenum* strains from habitats under salt stress. Pak J Bot. (Submitted).
17. Teather RM, Wood PJ. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl Environ Microb. 1982; 43(4): 777-780.
18. Miller GC. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31(3): 426-428.
19. Yoon KY, Woodams EE, Hang YD. Enzymatic production of pentoses from the hemicelluloses fraction of corn residues. LWT-Food Sci Technol. 2006; 39: 387-391.
20. Chapla D, Pandit P, Shah A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. Bioresource Technol. 2012; 115: 215-221.
21. Kallel F, Driss D, Bouaziz F, Neifer M, Ghorbel R. Chaabouni SE. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. Food Bioprod Process. 2014; 94: 536-546.

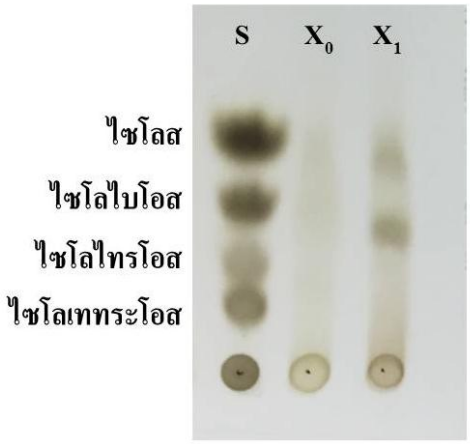
22. Liu J, Liu Z, Chi Z, Zhang L, Zhang D. Intraspecific Diversity of *Aureobasidium pullulans* strains from different marine environments. J Ocean U China. 2009; 8(3): 241-246.
23. Punnapayak H, Prasongsuk S. Industrial Botany. 1st ed. Chulalongkorn University: Bangkok; 2015. Thai.
24. Christov LP, Myburgh J, van Tonder A, Prior BA. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. J Biotechnol. 1997; 55(1): 21-29.
25. Robert P, Marquis ML, Barron CC, Guilion F, Saulnier L. FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. J Agric Food Chem. 2005; 53: 7014-7018.
26. Sun RC, Tomkinson J. Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylethylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw. Eur Polym J. 2003; 39: 751-759.
27. Rao RSP, Muralikrishna G. Water soluble feruloyl arabinoxylans from rice and ragi: Changes upon malting and their consequence on antioxidant activity. Phytochemistry. 2006; 67(1): 91-99.
28. Lama L, Tramice A, Finore I, Anzelmo G, Calandrelli V, Pagnotta E, et al. Degradative actions of microbial xylanolytic activities on hemicelluloses from rhizome of *Arundo donax.* AMB Express. 2014; 4: 55.
29. Kulisica, T, Radonicb A, Katalinicc, V, Milosa M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chem. 2004; 85(4): 633-640.
30. Mandelli F, Brenelli LB, Almeida RF, Goldbeck R, Wolf LD, Hoffmam ZB, et al. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. Ind Crop Prod. 2014; 52: 770-775.



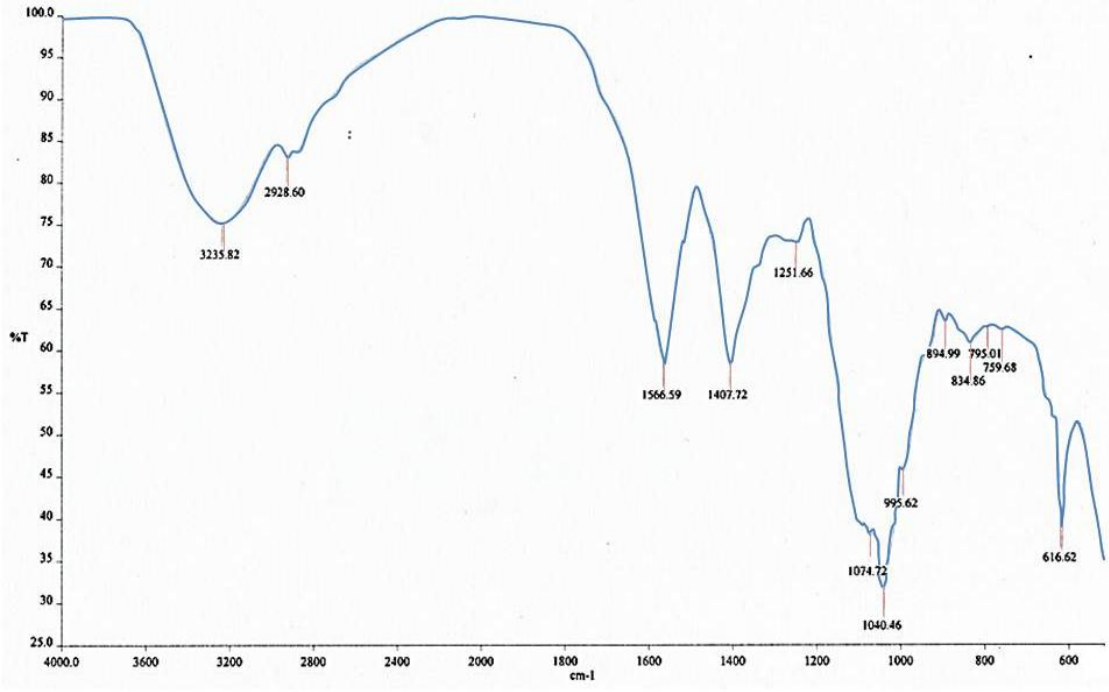
ภาพที่ 1 *A. melanogenum* BCU058 เมื่อเติบโตบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ก) และวงใสที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจสอบแอคติวิตีเอนไซม์ไซแลนเนสด้วยวิธี Congo Red (ข).

ตารางที่ 1 ปริมาณ XOS ที่ผลิตได้จากการสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส ณ เวลาต่าง ๆ ระหว่าง 1 ถึง 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ไซแลนจากธูปฤาษีเป็นสารตั้งต้น เปรียบเทียบจากการตรวจสอบด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

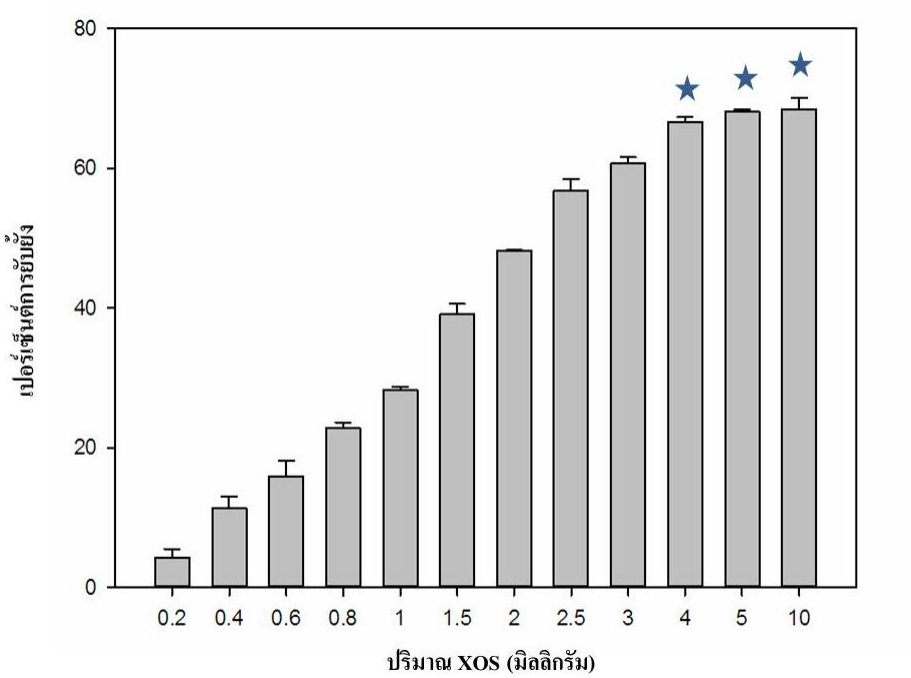
เวลา (h)	ปริมาณ XOS (มิลลิกรัมต่อกรัมไซแลน)
0h	0.046±0.00
1h	20.06±0.34
2h	21.46±0.16
4h	21.60±0.20
6h	23.40±0.13
8h	23.99±0.12
12h	27.28±0.27
16h	28.16±0.02*
20h	27.17±0.02
24h	25.51±0.23



ภาพที่ 2 โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางแสดงชนิดของ XOS ที่ได้ จากการย่อยไซแลนด้วยไซแลนเนสที่ผลิตโดย *A. melanogenum* BCU058 โดยใช้ไซแลนจากธูปฤาษีเป็นสารตั้งต้น ในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ก่อน (X_0) และหลัง (X_1) ย่อยกับน้ำตาลมาตรฐาน (S) ไซโลส ไซโลไบโอส ไซโลไทรโอส และไซโลเททระโอส



ภาพที่ 3 FT-IR สเปคตรัมของ XOS (ละลายใน Kbr) ที่ได้จากการย่อยไซแลนจากธูปฤาษี ด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสแสดงในช่วง 4000–600 cm^{-1}



ภาพที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด XOS ที่ได้จากการย่อยไซแลนจากธูปฤาษีแสดงในหน่วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH แสดงข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ±ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน