บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส

Schulze เป็นผู้เสนอให้ใช้ชื่อเฮมิเซลลูโลส เรียกพอลิแซคคาร์ไรด์ที่ถูกสกัดออกมาจากพืช โดยสารละลายด่าง (aqueous alkali) เนื่องจากเคยเข้าใจว่าพอลิแซคคาร์ไรด์เหล่านี้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์เซลลูโลสและมักจะมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช แต่ปัจจุบันนี้พบว่าเฮมิเซลลูโลสไม่ได้เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์เซลลูโลส (Eriksson *et al*., 1990)

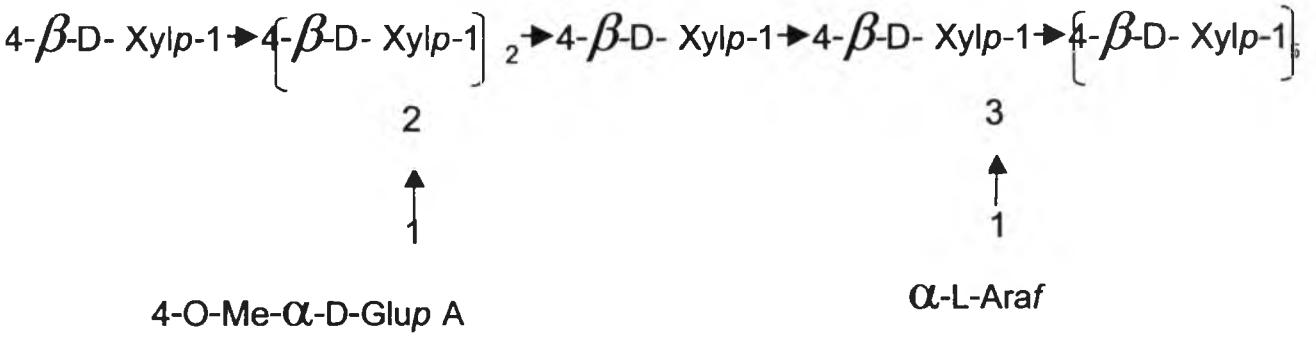
เซลลูโลสประกอบด้วยเฮเทอร์โรพอลิเมอร์ (heteropolymer) ทั้งแบบสายโซ่ตรง (linear) และแบบกิ่งก้านสาขา (branched) ของน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-แมนโนส (D-manose) ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) และดี-กลูคูโรนิคแอซิค (D-glucuronic acid) (Eriksson *et al*., 1990) เฮมิเซลลูโลสจะมีสายพอลิเมอร์ที่เป็นกิ่งก้านสาขามากกว่าและมีความยาวของสายพอลิเมอร์สั้นกว่าเซลลูโลส (Kirk,1983) พืชมักจะมีปริมาณเฮมิเซลลูโลสระหว่าง 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ส่วนใหญ่มักพบเฮมิเซลลูโลสในรูป กลูคูโรโนไซแลน (glucuronoxylan) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล ดี-ไซโลสเป็นหลัก มักจะเรียกว่าไซแลน (xylan) (Eriksson *et al*., 1990)

ไซแลน

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในเซลล์พืชมีลักษณะเป็นพอลิแซคคาไรด์ของน้ำตาลดี-ไซโลส ที่เชื่อมกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิก (β-1,4-xylosidic) เป็นสายหลักมีสายโซ่กิ่ง ซึ่งอาจประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) สายสั้นๆ บางครั้งจะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิทิล (acetyl group)ที่ตำแหน่ง C-2 หรือ C-3 ปริมาณของไซแลนนั้นแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช ในไม้เนื้อแข็งมีประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไม้เนื้ออ่อนมีปริมาณไซแลนประมาณ 7-10 เปอร์เซ็นต์ (Eriksson *et al*.., 1990) น้ำตาลดี-ไซโลส เป็นสารให้รสหวานเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า น้ำตาลจากไม้ มีสูตรเคมี $C_5H_{10}O_5$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 150.13 มักไม่ค่อยพบในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลชนิดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการเช่น ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single cell protein) ผลิตเชื้อเพลิง เช่น เอทานอล บิวธานอล ผลิตไซลิทอล เป็นต้น (Biely, 1985; Magee and Kosaric, 1985; Deshpande *et al*., 1986 and Gilbert and Hazlewood,1993) ไซแลนที่มักพบพบในไม้เนื้ออ่อนจะเป็นชนิดอะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(arabinoglucuronoxylan) มีบีตา-1,4-ไซโลไพราโนซิล (β-1,4-xylopyranosyl) มีสายโซ่กิ่งเป็น 4-โอ-เมทธิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค (4-O-methyl-α-D-glucuronic) ที่ตำแหน่ง ซี-2 และแอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนส (α-L-arabinofuranose) เชื่อมต่อที่ตำแหน่ง ซี-3 (ภาพที่1)



Glu = D-glucose

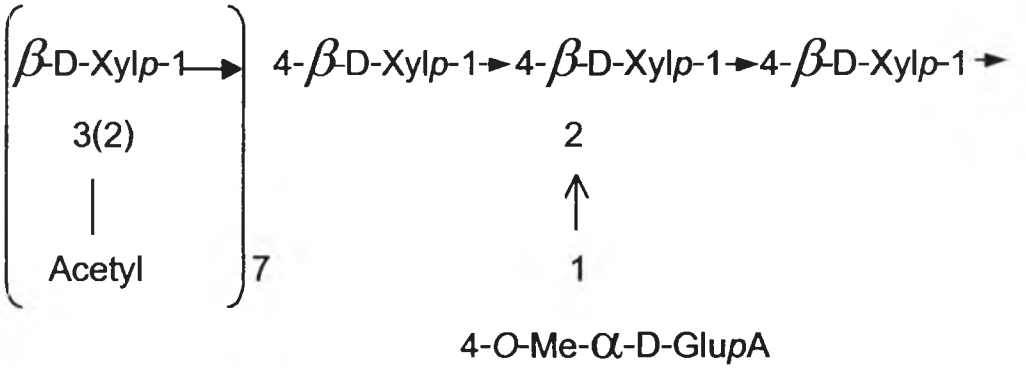
Xyl = D-xylose

Araf = L-arabinopyranose

P = pyranose

ภาพที่ 1 **โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้ออ่อน** (Ericksson *et al*., 1990)

ส่วนไซแลนที่พบในไม้เนื้อแข็งมักเป็นกลูคูโรโนไซแลน มีสายหลักประกอบด้วย บีตา-ดี-ไซโลไพราโนส (β-D-xylopyranose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิกและจะมีหมู่อะเซติลชื่อมต่อที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 2 หรือ 3 ทุกๆ 7-10 หน่วยของน้ำตาลไซโลส และ 4-โอ-เมททิล-แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิค เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา-1,2 ทุกๆ 10 หน่วยของไซโลสเป็นสายโซ่กิ่ง (ภาพที่ 2)



Glu = D-glucose

Xyl = D-xylose

P = pyranose

ภาพที่ 2 โครงสร้างของไซแลนในไม้เนื้อแข็ง (Ericksson *et al.*, 1990)

การย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนให้เป็นไซโลส สามารถย่อยสลายโดยการใช้สารเคมี (chemical hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) หรือการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน (Tsao and Chiang, 1983) ได้แก่

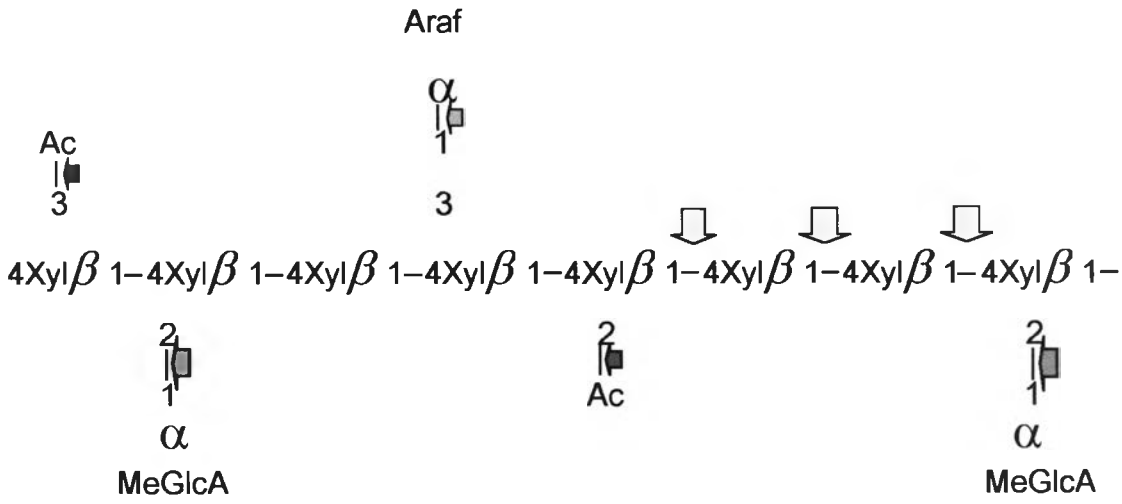
1. การย่อยสลายไซแลนด้วยกรด เป็นการย่อยสลายไซแลนเพื่อผลิตน้ำตาลไซโลส เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะรุนแรงและไม่จำเพาะ ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่บริสุทธิ์ เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารพิษ เช่น เฟอฟูรัล (furfural) ซึ่งมีผลต่อการนำไปเลี้ยงจุลินทรีย์ (Paturan, 1989) และยังต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดและอุณหภูมิสูงได้ (Woodward, 1987; Parisi, 1989)

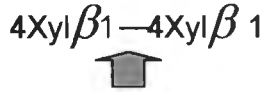
2. การย่อยสลายไซแลนด้วยด่าง มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการทำกระดาษ ในขั้นตอนต้มเยื่อ ซึ่งจะนำชั้นเปลือกไม้มาต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น เพื่อให้เปลือกไม้ยุ่ยและกำจัดลิกนินที่อยู่ในชั้นของลิกโนเซลลูโลสออกบางส่วน หลังจากนั้นจะนำไปผ่านกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้สารเคมีที่มีคลอไรด์เป็นองค์ประกอบ เช่น คลอรีนไดออกไซด์ (chlorinedioxide) เป็นต้น แต่ทำให้เกิดสารพิษพวกไดออกซิน (dioxin) และสารประกอบคลอไรด์ที่เป็นพิษชนิดอื่นๆด้วย (Visser *et al*., 1992)

3. การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะกว่าการใช้สารเคมีในการย่อยสลาย ภาวะที่ใช้ขณะทำงานอยู่ในสภาพเป็นกลาง นอกจากนั้นยังไม่ทำให้เกิดสารประกอบเป็นพิษและสารเคมีตกค้าง เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ คือ ใช้ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ (Visser *et al*., 1992 and Jurasek and Paice, 1992) เอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยไซแลนนี้เรียกว่า ไซแลนเนส (xylanase)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน

การย่อยสลายไซแลนด้วยเอนไซม์ให้สมบูรณ์นั้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด เนื่องจากโครงสร้างที่มีความแตกต่างกันอย่างมากของไซแลน รวมทั้งสายโซ่ตรงมักจะมีสายโซ่กิ่งหลายประเภท จึงต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดรวมกัน เช่น เอนโด-1,4-บีตา-ไซแลนเนส บีตา-ไซโลซิเดส แอลฟา-กลูคูโรนิเดส (EC 3.2.1) แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิเดส (EC 3.2.1.55) และอะเซติลเอสเทอร์เรส (EC 3.1.1.6) หรืออะเซติลไซแลนเอสเทอร์เรส (Biely, 1985; Dekker, 1985 and Poutanen, 1988) (ภาพที่ 3)





Endo-1,4-β-xylanase (EC 3.2.1.8)

β-xylosidase (EC 3.2.1.37)

α-glucuronidase (EC 3.2.1.)

α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)

acetylesterase (EC 3.1.1.6) or acetyl xylan esterase ?

(Biely, 1985)

Ac = Acethyl

Araf = L-arabinopyranose

MeGlcA = 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid

Xyl = D-xylose

ภาพที่ 3 โครงสร้างไซแลน และการย่อยสลายไซแลนที่ตำแหน่งต่างๆของกลุ่มเอนไซม์ไซแลนเนส (Biely, 1985)

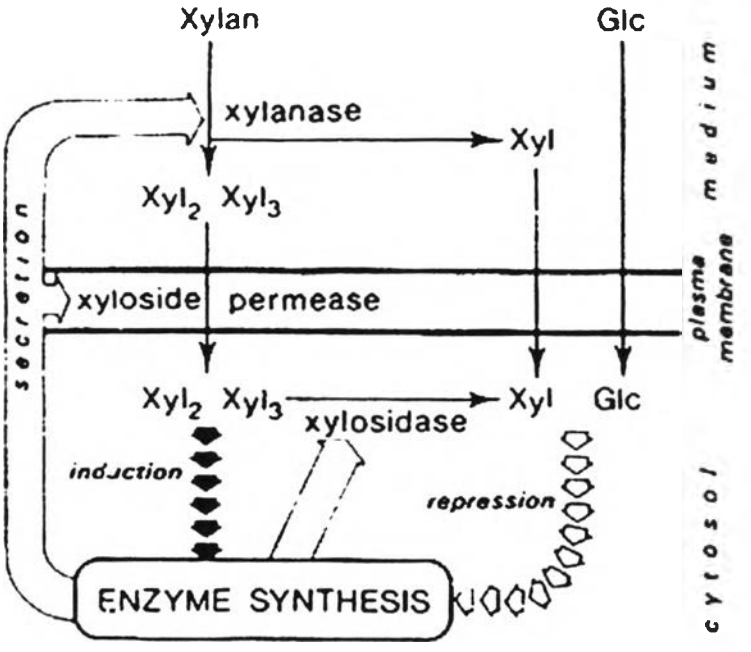
การทำงานของเอนไซม์

เอนโดไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีผู้ศึกษามากที่สุดในกลุ่มของเอนไซม์ที่ย่อยไซแลน (Woodward, 1984; Frederick *et al.*, 1985; Shei *et al.*, 1986 and Li *et al.*, 1993) เอนโดไซแลนเนสจะตัดส่วนสายหลักของไซแลนได้ผลผลิตเป็นโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ ไซโลไบโอส (xylobiose) และไซโลส บีตาไซโลซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนโอลิโกเมอร์ที่ละลายน้ำได้และน้ำตาลโมเลกุลคู่เป็นไซโลส (Rodionova *et al.*, 1983; Matsue and Yasui, 1984a and Pouanen and Puls, 1988 cited in Ericksson *et al.*, 1990) เอนไซม์ที่ย่อยส่วนสายโซ่กิ่งชนิดอื่นๆคือ แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส แอลฟา-ดี-กลูคูโรนิเดส และอะเซติลไซแลนเอสเทอร์เรส ซึ่งทำงานร่วมกับเอนโดไซแลนเนสและไซโลซิเดสเพื่อย่อยสลายไซแลนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ (Biely, 1985 and Poutanen, 1988) การย่อยสลายไซแลนให้สมบูรณ์ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดคือ

1. เอนโดไซแลนเนส (endoxylanase)หรือ1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซลาโนไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) จะย่อยสลายพันธะบีตา-1,4-ไซโลสิดิกแบบสุ่มเป็นกลไกแบบเอนโด (endo-mechanism) ได้ผลิตภัณฑ์คือไซโลสและน้ำตาลโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ (Gilbert *et al.*, 1993)
2. บีตา-ไซโลซิเดส (β-xylosidase)หรือ1,4-บีตา-ดี-ไซแลน-ไซโลไฮโดรเลส (1,4-β-D-xylan-xylohydrolase; EC 3.2.1.37) จะย่อยสลายพันธะบีตา-1,4-ดี-ไซโลไพราโนไซด์ทีละหนึ่งหน่วยจากปลายด้านนันรีดิวซ์ (non-reducing end)เป็นกลไกแบบเอคโส (exo-mechanism)ได้ผลิตภัณฑ์คือไซโลส (Dekker and Richard, 1976)
3. แอลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส (α-L-arabinosidase; EC 3.21.55) จะย่อยสลายหมู่นันรีดิวซ์-แอลฟา-แอล-อะราบิโนฟิวราโนซิล ของแอลฟา-แอล-อะราบิฟิวราโนไซด์ อะราบิแนนและอะราบิโนกาแลคแทน ได้น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลที่เป็นพันธะกิ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Ericksson *et al.*, 1990)
4. แอลฟา-ดี-กลูคูโรโนสิเดส (α-D-glucuronosidase; EC 3.2.1.1) จะย่อยสลายพันธะแอลฟา-1,2 ใน 4-โอ-เมทธิล-ดี-กลูคูโรนิคแอซิด (Whistler, 1970)
5. อะเซติล (ไซแลน) เอสเทอเรส (acethyl (xylan) esterase; EC 3.1.1.6) จะย่อยสลายพันธะบีตา-1,2 และบีตา-1,3 ที่เชื่อมหมู่อะเซทิลกับสายหลักให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดอะซิติก (Reese, Lola and Parrish, 1969)

เนื่องจากไซแลนที่เป็นพอลิเมอร์ไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องย่อยไซแลนภายนอกเซลล์ โดยการปลดปล่อยเอนไซม์เช่น ไซแลนเนสและเอสเทอเรสออกมาภายนอกเซลล์ มักได้ผลิตภัณฑ์คือไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นส่วนใหญ่ แต่ก็จะได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆบ้างเช่น

กรดอะเซติก แอล-อะราบิโนส ดี-กลูคูโรนิค หรือ4-โอ-เมทธิล-ดี-กลูคูโรนิค และดี-ไซโลส (Biely, 1985) การย่อยสลายของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นไซโลสและการปลดปล่อยไซโลสบางส่วนจากโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นสายโซ่กิ่งซึ่งเกิดจากผลของไซแลนเนสนั้นต้องการการทำงานของไซโลซิเดส ในแบคทีเรีย และยีสต์บางชนิด ไซโลซิเดสมักพบในไซโตซอล (cytosol) ในรูปที่ละลายน้ำได้ (Reese *et al*., 1985 cited in Biely, 1985) จากการศึกษารูปแบบการย่อยสลายไซแลนด้วยไซแลนเนสและบีตา-ไซโลสิเดสของยีสต์ *Cryptococcus albidus* (Biely and Petrakova, 1985) พบว่าเชื้อนำไซโลไบโอส(xylobiose) และไซโลไตรโอส (xylotriose) เข้าสู่เซลล์ แบบแอคทีฟ ทรานสปอร์ต จากนั้นบีตา-ไซโลซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์จึงทำงานต่อเพื่อย่อยให้เกิดน้ำตาลไซโลส (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ระบบการย่อยสลายไซแลนของ *Cryptococcus albidus* (Biely, 1985)

แหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยสลายไซแลน

สิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน และมักจะมีการศึกษาการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์เนื่องจากเจริญได้รวดเร็วเพาะเลี้ยงได้ง่าย อารี ฤทธิบูรณ์ (2541) ได้ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราจากสภาพธรรมชาติ และนำมาเลี้ยงในสูตรอาหาร ที่มีไซแลนหรือฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อด้วยการทดสอบความสามารถของเชื้อราต่อการใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 2 ในเชิงคุณภาพและเชิง

ปริมาณ การทดสอบในเชิงคุณภาพใช้วิธีการวัดขนาดของวงใสรอบโคโลนีและขนาดของโคโลนี ส่วนการทดสอบในเชิงปริมาณใช้วิธีการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส พบเชื้อรา 15สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตไซแลนเนสได้

A. pullulans เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycota (Inderbitzin Abdel-Wahab and Berbee, 2001) ชื่อเดิมคือ *Pullularia pullulans* และมีชื่อสามัญว่า ยีสต์สีดำ (black yeast) ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ในระหว่างการเจริญเติบโต เซลล์มีได้หลายรูปร่าง (polymorphic) ประกอบด้วยบลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์ที่มีรูปร่างพอง (swollen cell) คลามายโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใย (hyphae) และเส้นใยเทียม (pseudohyphae) และมักจะได้รับความสนใจในความสามารถผลิตไซแลนเนสที่ไม่มีเซลลูเลสซึ่งเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมกระดาษ

Karni และคณะ (1993) เลี้ยง *A. pullulans* พบว่าเชื้อเจริญดีในอาหารที่มี กลูโคส ฟรุกโทส ไซแลน หรือ ไซโลส เป็นองค์ประกอบ แต่เมื่อเจริญในอาหารที่มีไซแลนหรือไซโลส เชื้อจะผลิต บีตา-ไซแลนเนส ขณะที่อาหารที่มี แลคโตส หรือ มอลโทส เชื้อเจริญได้ไม่ดี การสร้าง บีตา-ไซแลนเนส จะถูกยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารไซโลสที่มี กลูโคส หรือฟรุกโทสด้วย เศษวัสดุทางการเกษตร เช่น รำข้าวสาลี ฟางข้าว นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของ *A. pullulans* เพื่อการเจริญและผลิตบีตา-ไซแลนเนส ได้ และเมื่อเติม ทวีน 80 เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 20 เปอร์เซ็นต์

การใช้ไซแลนเนสในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ

1. การเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกสี

การใช้ไซแลนย่อยเฮมิเซลลูโลสในการฟอกกระดาษจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพขการใช้สารเคมีในขั้นตอนการกำจัดลิกนินออกจากเยื่อกระดาษ (Viikari *et al.*, 1986; Kantelinen *et al.*, 1988) วิธีการที่ใช้เอนไซม์นี้จะทำให้ได้กระดาษที่มีค่าความขาวสว่างสูงมากขึ้น หรือลดการใช้สารเคมีในการฟอกสี และลดสารพิษที่จะตกค้างในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะสามารถลดปริมาณการใช้ก๊าซคลอรีนซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดสารพิษจำพวกสารประกอบคลอรีน

Wong *et al.* (1997a) ทดสอบผลของไซแลนเนสในกระบวนการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เอนไซม์เข้าช่วยในเยื่อกระดาษจากต้นไม้ 3 ชนิดคือ Douglas-fir Western hemlock และ Trembling Aspen โดยเพิ่มกระบวนการฟอกด้วยไซแลนเนสก่อนหรือหลังการฟอกเยื่อด้วยเปอร์ออกไซด์ พบว่าเยื่อทุกชนิดมีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น การใช้ไซแลนเนสทั้งก่อนและหลังการฟอกด้วยเปอร์ออกไซด์จะได้เยื่อกระดาษที่มีค่าความขาวสว่างสูงสุด คาดว่าการใช้เอนไซม์

จะมีผลส่งเสริมการฟอกเยื่อด้วยเปอร์ออกไซด์ให้ได้ผลดียิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไซแลนเนสหลังเปอร์ออกไซด์ มีลิกนินและโครโมฟอร์ละลายออกจากเยื่อน้อยกว่า แต่ก็ยังได้ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษเท่ากันหรือมากกว่าการใช้ไซแลนเนสก่อนเปอร์ออกไซด์เมื่อเทียบกับเยื่อที่ยังไม่ฟอก

Christov และ Prior (1994) ทดสอบโดยใช้เอนไซม์หยาบ (crude enzyme) จาก *Aureobasidium pullulans* ในการกำจัดเพนโตซานจากเยื่อซัลไฟต์ที่ไม่ผ่านการฟอก พบว่าเมื่อมีการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกจะทำให้ปริมาณเพนโตซานและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในเยื่อลดลงแสดงว่าปริมาณเฮมิเซลลูโลสในเยื่อกระดาษลดน้อยลงด้วย ในการทดสอบการใช้เอนไซม์ร่วมกับด่างในการฟอกเยื่อจะช่วยกำจัดเพนโตซานออกจากเยื่อได้มากกว่าการใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียวโดยการใช้เอนไซม์ 450U ต่อเยื่อ 1 กรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อฟอกเยื่อต่อด้วยด่าง ทำให้ปริมาณเพนโตซานลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ ค่าคัปปานัมเบอร์ ลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ การย่อยด้วยเอนไซม์จะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไซโลส ขณะที่กระบวนการสกัดด้วยด่างจะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไซโลไบโอส

2. การปรับปรุงคุณภาพของเส้นใยเยื่อกระดาษ

การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษมีจุดมุ่งหมายเพื่อลดการใช้พลังงานในการผลิตเยื่อกระดาษ ปรับปรุงสมบัติการให้น้ำไหลผ่านในการทำกระดาษรีไซเคิล เพิ่มความสามารถในการบดเยื่อกระดาษ และปรับปรุงคุณภาพของเส้นใย การผลิตเยื่อกระดาษแบบวิธีกลจะได้ปริมาณเยื่อมากแต่ยังคงเหลือลิกนินและเฮมิเซลลูโลสอยู่ในเยื่อเกือบทั้งหมด (Saddler, 1993) Mora และคณะ (1986) ได้ศึกษาบทบาทของไซแลนเพื่อปรับปรุงคุณภาพเยื่อกระดาษโดยใช้ไซแลนเนสจาก *Sporotrichum dimorphosporum* ฟอกเยื่อกระดาษ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่าเยื่อที่ผ่านไซแลนเนสจะมีความยืดหยุ่นดี บ่งชี้ว่าเกิดจากมีการเปลี่ยนแปลงภายในเส้นใยของเยื่อ นอกจากนี้พบว่าเยื่อกระดาษมีค่าการดูดน้ำเพิ่มขึ้น เนื่องจากเส้นใยพองตัวดี แม้ว่าการใช้เอนไซม์ในกระบวนการทำกระดาษจะไม่ให้ผลของการลดปริมาณเฮมิเซลลูโลสออกจากเยื่อมากนักอาจลดไซแลนจากเยื่อกระดาษแอสเพนได้ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กระดาษซัลไฟต์จากไม้เนื้อแข็งอื่นๆมีการลดลงของไซแลนเพียง 3.5-4.0 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Paice and Jurasek, 1984) แต่การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพก็ยังมีความน่าสนใจในด้านการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียและได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยจากสารเคมี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนส

แหล่งของเอนไซม์	สภาวะที่ใช้เอนไซม์							ขั้นตอนการฟอกหลังจากเอนไซม์	ค่าความขาว-สว่าง (%)[a] ref/enz	ปริมาณสารเคมีที่ลดลง[b]	หมายเหตุ	อ้างอิง
	ปริมาณ	ชนิดเยื่อ	Kappa	pH	°C	ชม.	ความข้น (%)					
Streptomyces Olivochromogenes	28 nkat g^{-1}	Pine	30.3	5.0	45	24	2.5	(D15/C85)E		25.0		Viikari *et al.* (1986)
S. Olivochromogenes	28 nkat g^{-1}	Pine	33.7	5.0	45	24	2.5	(D/C)EDED		9.5		Viikari *et al.* (1987)
Escherichia coli Cloned XYL	5 units ml^{-1}	Hardwood	14.4	5.0	37	24	3	CED	80/83.2			Paice *et al.* (1988)
Trichoderma Harzianum	500 units g^{-1}	Pine	24	n.s	40	24	2	(D35/C65)EDED	83/87			Clark *et al.* (1991)
Cartazyme	0.5-2 units g^{-1}	Hardwood	13.5	3.5	30-55		3	(EOP)D(EOP)D		38.8		Skerker *et al.* (1991)
Cartazyme		Softwood	16.6	3-5				(EO)D(EP)D	82.8/87		O_2 delignified	Skerker *et al.* (1991)
Pulpzyme	1 kg t^{-1}	Softwood	16.8	7.0	30-55	3		(D50/C50)E		17.6		Jorgensen and Lange (1991)
					50							

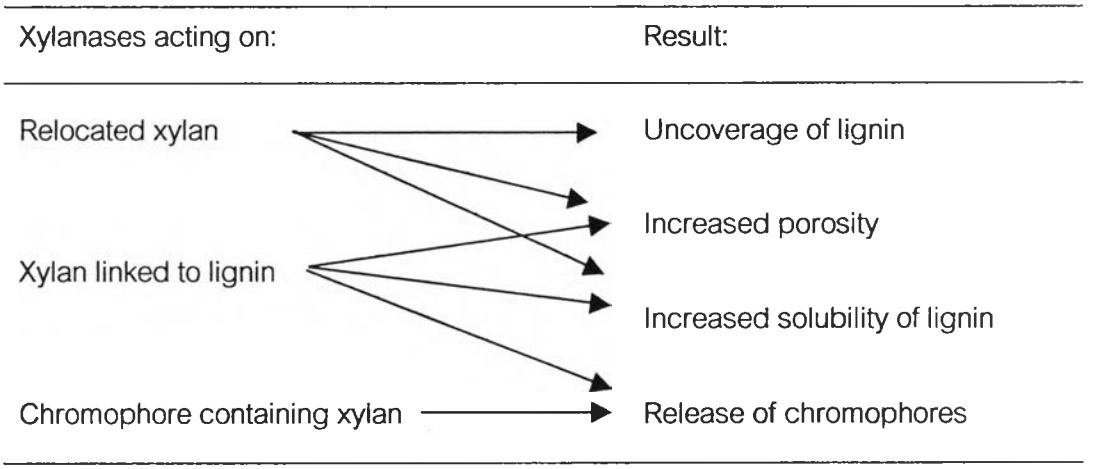
ตารางที่ 1 การฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนส (ต่อ)

แหล่งของเอนไซม์	สภาวะที่ใช้เอนไซม์							ขั้นตอนการฟอกหลังจากเอนไซม์	ค่าความขาว-สว่าง (%)[a] ref/enz	ปริมาณสารเคมีที่ลดลง[b]	หมายเหตุ	อ้างอิง
	ปริมาณ	ชนิดเยื่อ	Kappa	pH	°C	ชม.	ความข้น (%)					
VAI	2 units g^{-1}	Softwood	19.4	4.5	50	2	10	CED		20.0	brightness 70	Sinner *et al.* (1991)
VAI	8 units g^{-1}	Beachwood	12.1	4.5	50	2	10	(C/D)EDHD		21.5	brightness 89	Sinner *et al.* (1991)
Streptomyces livisdans	85 units g^{-1}	Hardwood		5.5-6.0	50	2	6	(D40/C60)EDED	89.8/91.9			du Manoir *et al.* (1991)
Novo Sp 437	0.575 units g^{-1}	Softwood	16.7	8	50	3	10	(D50/C50)E		9.5	O_2 delignified	Pedersen *et al.* (1991)
Novo Sp 406	1.25 units g^{-1}	Softwood	26.2	9	50	3	10	(D50/C50)E		13.0	O_2 delignified	Pedersen *et al.* (1991)
Thermomonospora fusca	20 units g^{-1}	Hardwood		7	80	3	15	(EP)D(EP)D	83.8/88.9	6.6		Perrolaz *et al.* (1991)

[a] ปริมาณสารเคมีเท่ากัน; [b] ค่าความขาวสว่างเท่ากัน; n.s., ไม่ได้ทดสอบ. (Saddler, 1993)

กลไกการฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้เอนไซม์ช่วย

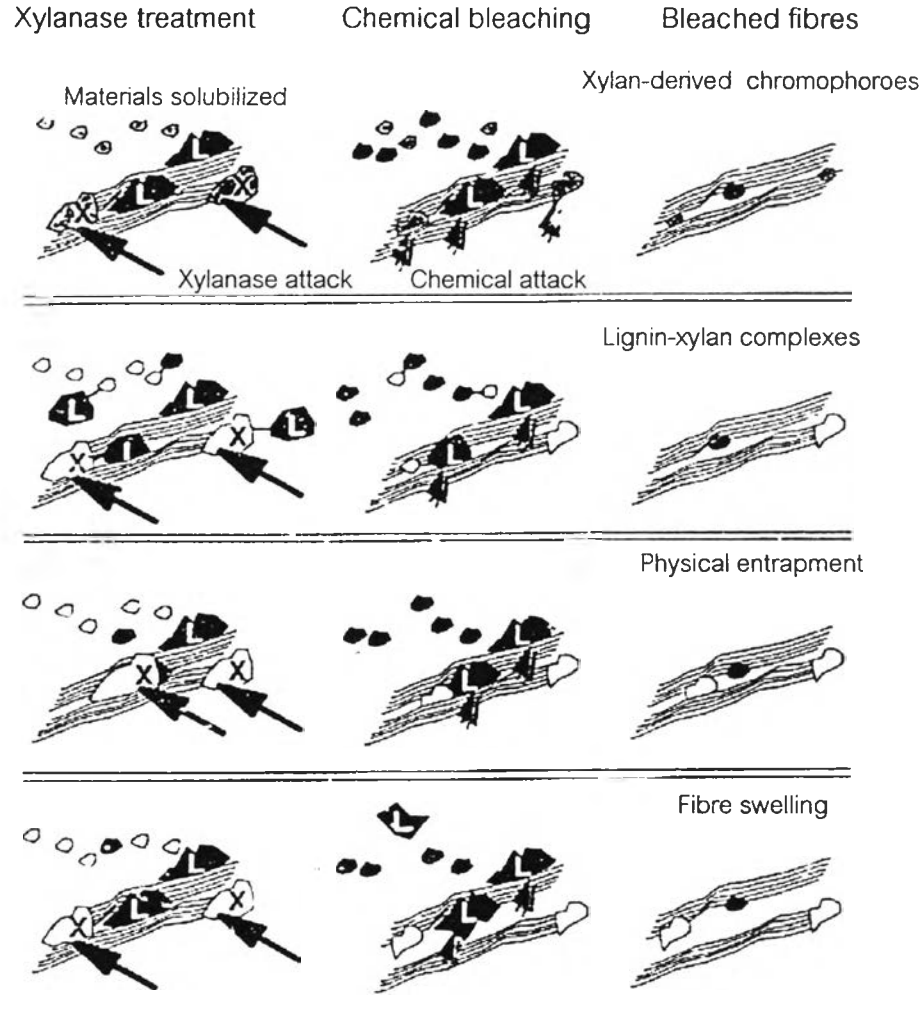
การฟอกเยื่อกระดาษโดยใช้เอนไซม์ช่วยเริ่มรู้จักกันในปี 1985 ซึ่งถูกเสนอให้เป็นแนวทางใหม่ในการรักษาสภาวะแวดล้อม (Viikari *et al.*, 1986) การใช้เอนไซม์เป็นการฟอกเยื่อแบบวิธีอ้อม แต่จะมีผลไปเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้สารเคมีฟอกและกระบวนการกำจัดลิกนิน (delignification) เอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการนี้คือ เอนโด-บีตา-ไซแลนเนส (Paice *et al.*, 1988 and Tenkanen *et al.*, 1992 cited in Viikari Suurnakki and Buchert 1996) ผลของเอนไซม์ที่มีต่อการฟอกสีนั้นมีพื้นฐานมาจากการปรับปรุงเยื่อกระดาษ ทำให้การฟอกสีด้วยสารเคมีดีขึ้น เป็นที่คาดว่าการทำงานของไซแลนเนสจะช่วยย่อยบางส่วนของไซแลนที่ตกตะกอนอีกครั้ง (reprecipitated xylan) หรือทำให้ไซแลนหลุดออกมาจาก lignin-carbohydrate (LC) complexes (Yang and Ericksson, 1992 cited in Viikari *et al.*, 1996) แต่แนวคิดนี้ยังไม่สามารถแบ่งแยกกันได้อย่างชัดเจน เช่น ไซแลนที่หลุดออกไปจากเยื่ออาจจะมี LC complexes อยู่ด้วย และกลไกทั้งสองนี้ทำให้ลิกนินยึดกับผนังของเส้นใยได้ไม่ดี มีผู้พบว่าการกำจัดไซแลนออกจากเยื่อจะเพิ่มความสามารถในการชะล้างลิกนินที่เหลืออยู่ (residual lignin) จากเยื่อกระดาษ(Horting *et al.*, 1994 cited in Viikari *et al.*, 1996) จึงทำให้ขั้นตอนต่อมาของการฟอกสีเยื่อกระดาษเป็นไปได้ง่าย และยังมีผู้เสนอว่าการใช้เอนไซม์จะเป็นการกำจัดรงควัตถุ ออกจากเยื่อกระดาษ (Wong *et al.*, 1996 and Patel, 1993 cited in Viikari *et al.*, 1996) กลไกดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กลไกการทำงานของไซแลนเนสในการฟอกเยื่อกระดาษ (Viikari *et al.*, 1996)

ปัจจุบันมีการยอมรับข้อสมมุติฐานการอธิบายกลไกการฟอกเยื่อกระดาษด้วยเอนไซม์ว่าไซแลนเนสจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับไซแลนกลับมาจับเส้นใย (relocated xylan) เพราะมีเหตุผลที่เชื่อถือได้ว่าไซแลนกลับมาจับเส้นใยจะยึดอยู่กับลิกนินที่เหลืออยู่ทำให้การฟอกเยื่อด้วยสารเคมีง่ายขึ้น ไซแลน

ซึ่งอยู่ในเส้นใยของเยื่อกระดาษอาจจะมีรูปร่างได้ 1 ใน 4 แบบนี้ (ภาพที่ 6) มีรายงานว่าการใช้ไซแลนเนสกำจัดไซแลนออกจากเส้นใยเยื่อกระดาษคราฟจากไม้เนื้อแข็งจะทำให้ลิกนินหลุดจากเส้นใยง่ายขึ้นเนื่องจากการกำจัดไซแลนทำให้ไม่มีสารมาปกคลุมลิกนิน (Buchert *et al.*, 1996 cited in Wong *et al.*1997b)ทำให้ขั้นตอนการฟอกสีเยื่อกระดาษด้วยสารเคมีง่ายขึ้น



ภาพที่ 6 แสดงสับสเตรตของไซแลนเนสในการฟอกเยื่อโดยใช้เอนไซม์ช่วย
L คือ ลิกนิน, x คือ ไซแลน (Wong *et al.*, 1997b)

สารประเภทโครโมฟอร์ที่เกิดจากไซแลน (xylan derived chromophores)

ไซโลสและไซแลนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการการทำกระดาษที่ใช้ด่าง สารที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวที่ทำให้เกิดสีในเยื่อกระดาษ (Hertler and Norrstrom, 1969) สารประเภทโครโมฟอร์ที่เกิดจากไซแลนนี้อาจเกิดขึ้นในช่วงการทำเยื่อกระดาษคราฟ การกำจัดสารประเภทโครโมฟอร์ที่เกิดจากไซแลนโดยการใช้ไซแลนเนสจะให้ผลมากกว่าการใช้สารเคมีในการ

ฟอกสี ตรวจหาการละลายของสีจากการฟอกโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 460 นาโนเมตร (Mansfield *et al.*, 1996)เนื่องจากใกล้เคียงกับความยาวคลื่นแสงที่ใช้วัดค่าความขาวสว่าง ที่ 470 นาโนเมตร สำหรับการวัดหาสารประเภทรงควัตถุใช้ค่าการดูดกลืนแสงช่วงที่เป็นแสงยูวี Punnapayak Liawsakul และ Jeffries (2000) ฟอกสีเยื่อกระดาษที่ทำจากต้นแอสเพนด้วยเอนไซม์ไซลาเนส 2 ชนิดคือEcozyme และ Pulpzyme ที่ระดับ 5 และ 25 IU/g OD พบว่าในของเหลวที่กรองได้มีการดูดกลืนแสงในช่วง ยูวี เป็นหลักฐานว่ามีสารประเภทรงควัตถุบางชนิดที่มีลักษณะใสและดูดกลืนแสงช่วง ยูวี ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ แต่กลไกการปลดปล่อยสารประเภทโครโมฟอร์ของเอนไซม์ยังไม่ชัดเจน ในปัจจุบันมีผู้พบว่าเมทธิลกลูคูโลนิกแอซิด ซึ่งเป็นสายโซ่ของไซแลน ถูกเปลี่ยนเป็น Hexenuronic acid เป็นสารที่มักจะพบได้ในเยื่อกระดาษคราฟ (Teleman *et al.*, 1995) ซึ่งคาดว่าสารที่เกิดขึ้นนี้มีส่วนทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์และค่าความขาวสว่างในเยื่อกระดาษดีขึ้น งานวิจัยนี้ได้ทดลองใช้ไซแลนเนส จาก *Aureobasidium pullulans* 2 สายพันธุ์ฟอกเยื่อกระดาษยูคาลิปตัสและตรวจหาสารรงควัตถุซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของไซแลนเนส เนื่องจากยังไม่มีการพบรงควัตถุจากเยื่อกระดาษยูคาลิปตัส (Buchert *et al.*, 1997) de Jong และคณะ (1996) ใช้ Irgazyme (ไซแลนเนสทางการค้าได้จาก *Trichoderma longibrachiatum*) และไซแลนเนส-ดี (ไซแลนเนสจาก *T. harzianum* E 58 ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว) ฟอกเยื่อกระดาษคราฟ Douglas-fir เพื่อทดสอบความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพฟอกสีเยื่อกระดาษ พบว่า Irgazyme มีผลเพิ่มค่าความขาวสว่างให้กับเยื่อกระดาษได้มากกว่าไซแลนเนส-ดี ทั้งยังกำจัดลิกนินและคาร์โบไฮเดรทออกมามากกว่าไซแลนเนส-ดี เมื่อใช้ Irgazyme เพิ่มขึ้น 2 เท่าทั้งก่อนและหลังการฟอกเยื่อด้วยเปอร์ออกไซด์จะได้เยื่อกระดาษที่มีค่าขาวสว่างที่ดีที่สุด เมื่อทดลองใช้ Irgazyme กับเยื่อที่ไม่ได้ผ่านการฟอก จะได้ลิกนินที่มีมวลโมเลกุลใหญ่กว่าลิกนินที่ได้จากเยื่อที่เป็นชุดควบคุม เมื่อฟอกเยื่อด้วยเปอร์ออกไซด์ จะมีสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีรูปร่างคล้ายลิกนิน (lignin-like macromolecule) ละลายออกมามากกว่าเยื่อที่ไม่ผ่านการฟอก บ่งชี้ได้ว่าเมื่อใช้ไซแลนเนสในขั้นตอนต่างๆ ของการฟอกสีเยื่อกระดาษก็จะมีสารที่มีความแตกต่างกันออกไปละลายออกมา วิเคราะห์หาสารประเภทรงควัตถุโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงแสงยูวี และคลื่นแสงที่สามารถมองเห็นได้ (visible light) พบว่าการใช้ Irgazme จะมีการปลดปล่อยสารออกมากกว่าไซแลนเนส-ดี