บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans*

งานวิจัยนี้ได้ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ทุก 6 ชั่วโมง เนื่องจาก *A. pullulans* เป็นยีสต์จะมีการเจริญและเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วเช่นเดียวกับแบคทีเรียในภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ (Carlile and Watkinson, 1994)ต่างกับเชื้อราเส้นใยทั่วไป โดยพบว่าเชื้อทั้งสองสายพันธุ์เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก เชื้อเริ่มมีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ซึ่งเป็นช่วง lag phase ของเชื้อ จากนั้นในระยะชั่วโมงที่ 18-36 เชื้อมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นช่วง log phase ของเชื้อนี้ เชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase ระหว่างชั่วโมงที่ 30-60 จำนวนเซลล์ของเชื้อก็เริ่มลดลง ซึ่งอาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวนจำกัด ทำให้สภาวะไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต จากงานวิจัยนี้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans* เพื่อจะหาอายุที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เตรียมหัวเชื้อ สำหรับการทดลองต่อมาซึ่งมีความจำเป็น เนื่องจากต้องการหัวเชื้อที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีในการผลิตเอนไซม์ต่อไป เพราะโดยทั่วไปอาหารที่ใช้เพื่อการผลิตเอนไซม์มักจะเป็นอาหารที่มีสูตรอาหารอย่างง่าย และไม่เหมาะสำหรับการเจริญของเชื้อเพื่อให้เชื้อผลิตเอนไซม์หรือสารอื่นๆออกมาเพื่อการดำรงชีวิต ผลที่ได้พบว่า *A. pullulans* สองสายพันธุ์จะมีอัตราการเจริญที่ดีเมื่อมีอายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Christov และคณะ (1997) ศึกษา *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 ในการผลิตเอนไซม์ใช้เชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เป็นหัวเชื้อ

สำหรับงานวิจัยนี้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. pullulans* โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตรเพื่อการเจริญ แล้วนำน้ำเลี้ยงเชื้อมา spread plate บนอาหาร PDA ทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง ไม่ได้วัดการเจริญจากน้ำหนักแห้งของเชื้อเนื่องจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC เป็นเชื้อที่มีการผลิตรงควัตถุ (pigment) ออกมาในระหว่างการเจริญ อาจทำให้น้ำหนักแห้งที่ได้นั้นไม่ได้เกิดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อเพียงอย่างเดียว

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* เพื่อผลิตไซแลนเนส

จากการศึกษาระดับpHเริ่มต้นของอาหารพบว่า *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ ให้แต่ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าpHเริ่มต้น 5 เนื่องจากเป็นเชื้อราซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มักจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าpHเริ่มต้นต่ำ Dobozi Szakacs and Bruschi (1992) ศึกษาเอนไซม์ไซแลนเนสของ *Phanerochaete chrysosporium* พบว่าไซแลนเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรในช่วงpHที่เป็นกรด คือที่ pH 4 ถึง 5.5 ถ้าอยู่ในภาวะที่เป็นด่างจะทำ

ให้แต่ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสลดต่ำลง เช่นเดียวกับงานของ Dobberstein and Emeis (1989) ที่ศึกษาไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CBS 58475 พบว่าเอนไซม์จะมีแต่ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสดีในช่วงpHที่เป็นกรด และมีแต่ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสดีที่สุดที่pH 4.25 ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อราชนิดอื่น

3. **อุณหภูมิที่เหมาะสม**

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สามารถใช้อุณหภูมิเป็นเกณฑ์ในการแบ่งเชื้อได้ 3 ประเภท คือ thermophiles อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือในช่วง 35-50 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่น้อยกว่า 20 องศาเซลเซียส mesophiles อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 15-40 องศาเซลเซียส และ psychrophiles อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือในช่วง 0-17 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส (Griffin, 1994) จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนเนส *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสให้แต่ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสสูงสุดเนื่องจาก *A. pullulans* เป็นเชื้อที่มีช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้ค่อนข้างต่ำคือ 2-35 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส และเป็นเชื้อที่มักพบได้ในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ มีความสามารถในการทนความร้อนได้น้อย ทำให้เมื่อเลี้ยงในอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง คือ 35-40 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีการเจริญได้น้อยโดยดูจากระดับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่นมากกว่าอาหารที่เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การที่เลี้ยง *A. pullulans* ที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส แล้วได้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์น้อย อาจเกิดจากมีจำนวนเซลล์น้อยในการผลิตเอนไซม์ และจากหลายรายงานที่ได้ศึกษาการผลิตไซแลนเนสจาก *A. pullulans* มักจะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส (Dobberstein and Emeis, 1989 and Christov and Prior, 1993) ซึ่งค่อนข้างจะเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ที่เชื้อ *A. pullulans* ผลิตไซแลนเนสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ คาดว่า *A. pullulans* เป็นเชื้อประเภท mesophiles เพราะเจริญได้ไม่ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส

4. **การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน**

เชื้อราเป็นผู้ย่อยสลายที่สามารถใช้สารประกอบหลายประเภทเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการย่อยสารที่เป็นโอลิโกเมอร์ (oligomers) และโพลิเมอร์ (polymer) (Griffin, 1994) การผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์นั้น แหล่งคาร์บอนที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมาก สำหรับการผลิตไซแลนเนสพบว่า เฉพาะเพนโตสและโพลีแซคคาไรด์ของเพนโตส

จะเป็นตัวชักนำ (inducer) ได้ โดยไซโลสและบีต้า-ไซแลน เป็นตัวชักนำที่ดีที่สุด (Dobberstein and Emeis, 1991) แต่เนื่องจากไซโลสและบีต้า-ไซแลน เป็นสารที่มีราคาแพงทำให้ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตไซแลนเนส จึงใช้วัสดุเหลือทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนแทน จากผลการทดลองพบว่ารำละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตไซแลนเนสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC และฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดของสายพันธุ์ NRRL จากองค์ประกอบรำข้าวมีปริมาณเซลลูโลส 8.3 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 17.58 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 2.38 เปอร์เซ็นต์ ฟางข้าวมีปริมาณเซลลูโลส 33 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 26 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 4.07 เปอร์เซ็นต์ (Chaudhry, 1998) จากที่ฟางข้าวมีปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสสูงกว่ารำข้าว จึงอาจมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ไม่เท่ากันคาดว่าสายพันธุ์ NRRL อาจเป็นสายพันธุ์ที่มีการผลิตเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสออกมาช่วยย่อยฟางข้าวได้ดีกว่าสายพันธุ์ ATCC จึงสามารถเจริญได้ดีในฟางข้าวและผลิตไซแลนเนสได้สูงขณะที่สายพันธุ์ ATCC อาจมีความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลสได้น้อยกว่า และจากในรำข้าวมีสารประกอบอื่นๆ ที่มีประโยชน์เช่น โปรตีน ไขมัน วิตามิน ที่ยังเหลืออยู่บ้าง คาดว่าคงเหมาะสำหรับ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในการเจริญและผลิตไซแลนเนส จึงเจริญและผลิตไซแลนเนสได้ดีในอาหารที่มีรำละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอนเพราะมีเฮมิเซลลูโลสน้อยกว่าฟางข้าว แต่จากตารางที่ 10 พบว่าค่าหน่วยของเอนไซม์ไซแลนเนสสูงสุดที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติคาดว่า *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตไซแลนเนสได้ใกล้เคียงกัน จากผลการทดลองค่า หน่วยของเอนไซม์ที่ได้จากการใช้เศษวัสดุทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนลดลงเพราะในอาหารสูตร production ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีรายงานว่าเป็นตัวชักนำที่ดีในการผลิตไซแลนเนส (Li *et al.*,1993; Dobberstein and Emeis,1991) และอาจเกิดจากไซโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่าย โดยจะผ่านเข้าสู่เซลล์แบบแอคทีฟทรานสปอร์ต (Berry,1988) ทำให้เชื้อมีวัตถุดิบในการเจริญการสังเคราะห์สารต่างๆที่จำเป็นภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมันและกรดนิวคลีอิกเป็นต้น ดังนั้นเชื้อจึงเจริญได้ดี สร้างเอนไซม์ออกมาได้ปริมาณมาก แต่เนื่องจากไซโลสมีราคาแพงจึงสนใจใช้เศษวัสดุทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนแทน แต่ค่าหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ได้น้อยกว่าอาหารที่ใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน คาดว่าเนื่องจากเศษวัสดุทางการเกษตรเป็นสารที่ซับซ้อนมีขนาดโมเลกุลใหญ่เชื้อจึงนำไปใช้ได้ยากหรืออาจเกิดจากในเศษวัสดุทางการเกษตรเหล่านี้มีสารต่างๆหลายชนิดปนกันบางชนิดอาจมีผลต่อการสร้างไซแลนเนสของเชื้อก็ได้ มีรายงานว่าการผลิตไซแลนเนสจาก *A. pullulans* จะต่ำลงถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกลูโคส หรือ ฟรุกโตส แต่ถ้าในอาหารมีไซโลสจะผลิตไซแลนเนสในปริมาณสูง (Karni *et al.* ,1993) Dobberstein และ Emeis (1989)รายงานว่า *A. pullulans* ผลิตไซแลนเนสปริมาณสูงในอาหารที่มีไซโลส ไซแลนและเศษวัสดุที่มีไซโลโอลิโกเมอร์

ปริมาณมาก เช่น ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน และในงานวิจัยนี้ เศษวัสดุทางการเกษตรที่ดีให้หน่วยของเอนไซม์สูงที่สุดคือฟางข้าว

การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซแลนเนส เพราะคาร์บอนเป็นสิ่งสำคัญต่อการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จากการทดลองพบว่า ร้อยละเอียด 3% เป็นปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของสายพันธุ์ ATCC และฟางข้าว 4% จะทำให้สายพันธุ์ NRRL ผลิตไซแลนเนสได้สูงที่สุด

5. **การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์**

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไป เพื่อแยกโปรตีนออกจากตัวทำละลายโดยการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นสูงละลายลงไปจะทำให้โปรตีนมีการตกตะกอน เนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้โมเลกุลของน้ำออกห่างจากโปรตีนจึงมีผลให้โมเลกุลของโปรตีนเข้าใกล้กันมากขึ้นและเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยกันเอง (England and Seifter, 1990) จากนั้นทำการแยกส่วนของตัวทำละลายออกโดยการนำไปปั่นแยก ซึ่งเป็นการทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่าหลังจากการตกตะกอนโปรตีนแล้ว เอนไซม์ที่ได้มีความเข้มข้นสูงขึ้นโดยมีค่าหน่วยของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 5.19 เท่า ใน *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ขณะที่เอนไซม์จากสายพันธุ์ NRRL เพิ่มขึ้น 4.87 เท่า ในการทดลองนี้ได้ทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ก่อนเพื่อลอส่วนของโปรตีนที่ไม่มีผลต่อการย่อยสลายไซแลนและลดสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการอื่นๆ ออกไป เช่น สารที่มีลักษณะเป็นเมือกซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเจริญของเชื้อ จากนั้นตกตะกอนโปรตีนซ้ำอีกครั้งด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์และเข้มข้นมากขึ้น

6. **การฟอกเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนส**

การนำไซแลนเนสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษนั้น ปัจจุบันมีผู้สนใจเกี่ยวกับปัญหาสิ่งแวดล้อมซึ่งเกิดจากระบบอุตสาหกรรมที่ใช้สารเคมี ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะลดการใช้สารคลอรีนเป็นสารฟอกสีเยื่อกระดาษ เนื่องจากจะเกิดสารพิษประเภทคลอรีนขึ้น Viikari และคณะ (1994) เสนอรายงานการใช้ไซแลนเนสเพื่อส่งเสริมการฟอกเยื่อกระดาษแบบเคมี จากนั้นก็มีผู้ศึกษาการใช้ไซแลนเนสในอุตสาหกรรมกระดาษ Bhardwaj Bajpai and Bajpai (1996) ได้ใช้ไซแลนเนสปรับเปลี่ยนเส้นใยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตีเยื่อ พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์กับเยื่อ จะทำให้ขั้นตอนการบดเยื่อใช้เวลาน้อยลง 25%

จากผลการทดลองหลังจากฟอกเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ แล้วนำไปวัดค่าคัปปานัมเบอร์เทียบกับเยื่อกระดาษจากชุดควบคุม พบว่า ค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อกระดาษมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณไซแลนเนสที่ได้จากทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทางเดียวกับงานของ Christov และ Prior (1997)ที่ใช้ไซแลนเนสจาก *A. pullulans* ฟอกเยื่อกระดาษ ทำให้ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง 3% แม้ว่าจากหน้าที่ของไซแลนเนสจะไม่ได้ทำการย่อยลิกนินโดยตรง แต่เนื่องจากในกระบวนการทำเยื่อกระดาษด้วยสารละลายด่างจะมีไซแลนบางส่วนถูกย่อยออกเป็นไซแลนขนาดโมเลกุลเล็กลง แต่จะถูกดูดกลับเข้าไปเกาะติดกับผิวของเส้นใยเซลลูโลสโดยจะอยู่ติดกับลิกนิน ซึ่งจะขัดขวางทำให้ลิกนินหลุดออกจากเส้นใยได้ยากขึ้น ในงานวิจัยนี้หลังจากการใช้ไซแลนเนสฟอกเยื่อกระดาษ ได้ทำการล้างเยื่อเหล่านั้น อาจทำให้ลิกนินหลุดออกจากเส้นใยได้ เพราะไซแลนเนสได้กำจัดไซแลนที่พื้นผิวของเส้นใยออกก่อนแล้ว การใช้ไซแลนเนสจากสายพันธุ์ ATCC 50 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม มีค่าคัปปานัมเบอร์ ลดลงถึง 12.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคือ ไซแลนเนสจาก ATCC 25 และ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม ลดลง 9.64 และ 5.78 ตามลำดับ ส่วนในสายพันธุ์ NRRL เมื่อใช้ปริมาณ 50 ,25 และ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม ค่าคัปปานัมเบอร์ลดลง 8.66, 6.58 และ 2.92 เปอรเซ็นต์ตามลำดับ ค่าคัปปานัมเบอร์เป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณลิกนินที่มีอยู่ในเยื่อกระดาษ แสดงว่าหลังจากการใช้ไซแลนเนสฟอกเยื่อกระดาษมีผลทำให้ปริมาณลิกนินในเยื่อกระดาษลดลง

สำหรับการวัดค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษปรากฏว่า ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษที่ได้ค่อนข้างใกล้เคียงกับชุดควบคุม โดยที่เยื่อกระดาษที่ผ่านการฟอกด้วยไซแลนเนสจาก ATCC 50 Uต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัมมีค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพิ่มขึ้น 1.23 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทดลองอื่นๆค่าความขาวสว่างที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ผลที่ได้สอดคล้องกับค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อกระดาษเมื่อในเยื่อกระดาษมีปริมาณลิกนินลดลงมากมีผลทำให้ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษเพิ่มขึ้นมากด้วย เนื่องจากการทำงานของไซแลนเนสจะไม่มีผลโดยตรงต่อลิกนินจึงไม่ค่อยมีผลต่อการเพิ่มค่าความขาวสว่างต่อเยื่อกระดาษ มีรายงานว่าหลังจากฟอกเยื่อกระดาษด้วยไซแลนเนส ค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้นเพียง 1-4 เปอร์เซ็นต์ (Pham Alric and Delmas, 1995; Wong *et al.*, 1997) แต่เมื่อฟอกเยื่อกระดาษต่อด้วยสารเคมีปริมาณการใช้สารเคมีจะลดลงโดยที่ยังให้ค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษสูง (Viikari *et al.*,1986)

7. **การตรวจหาสารประเภทโครโมฟอร์** (chromophore)

จากการนำส่วนของเหลวที่ผ่านการฟอกเยื่อไปสแกนด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยตรวจที่ช่วงความยาวคลื่นแสงยูวี (190-350 นาโนเมตร) พบว่าในการทดลองที่ใช้ไซแลนเนส

ปริมาณน้อย (5 Uและ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม) ปรากฏพีคขึ้นที่ประมาณ 202-203 นาโนเมตร อาจจะบ่งชี้ได้ว่า มีการเกิดสารประเภทโครโมฟอร์ เมื่อมีการใช้ไซแลนเนส จากการศึกษาเรื่องกลไกการฟอกเยื่อกระดาษยังไม่ชัดเจน มีผู้เสนอว่าในกระบวนการต้มเยื่อกระดาษจะทำให้ไซแลนที่หลุดออกไปจากเยื่อกระดาษตกตะกอนกลับมาอยู่ในเยื่อกระดาษและจะขัดขวางการฟอกด้วยสารเคมี (Buchert *et al.*, 1992; Kantelinen *et al.*, 1991 cited in Kirk and Jeffries, 1996) แต่ก็มีผู้แย้งว่าปริมาณของไซแลนที่ตกตะกอนใหม่ซึ่งอยู่ที่พื้นผิวของเยื่อกระดาษมีปริมาณไม่มากนักจึงไม่น่าจะมีบทบาทต่อการฟอกเยื่อกระดาษ (Paice *et al.*,1992 cited in Kirk and Jeffries, 1996) จึงน่าจะเกิดจากในระหว่างการต้มเยื่อด้วยสารเคมีมีสารประเภทโครโมฟอร์เกิดขึ้น ซึ่งการใช้เอนไซม์จะทำให้โครโมฟอร์ที่มาจากไซแลนถูกย่อยออกมา จึงมีผลทำให้ขั้นตอนการกำจัดลิกนินในภายหลังดีขึ้น ซึ่งสารประเภทโครโมฟอร์นี้จะสามารถตรวจพบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในช่วงแสง ยูวี ความยาวคลื่น 190 – 350 นาโนเมตร

จากผลการทดลองที่พบสารประเภทโครโมฟอร์จากการใช้ไซแลนเนสจาก ATTC ปริมาณน้อย (5 และ 25 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัม) และเอนไซม์ทางการค้า Ecozyme ที่ปริมาณ 5 U ต่อเยื่อกระดาษ 1 กรัมเท่านั้น คาดว่าในการทดลองนี้ใช้เอนไซม์ปริมาณสูงการทำงานของไซแลนเนสจะเกิดอย่างสมบูรณ์ทำให้ไม่สามารถตรวจพบสารประเภทโครโมฟอร์ได้ แต่กลไกการเกิดของสารประเภทโครโมฟอร์นี้ยังไม่ชัดเจนจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การนำส่วนของเหลวที่ได้จากการฟอกเยื่อกระดาษด้วยไซม์แลนเนสไป scan อาจเข้มข้นเกินไปทำให้การทดลองอาจจะเกิดการผิดพลาดได้