การทำงานร่วมกันระหว่างไซลาเนสจาก Bacillus firmus K-1 และ Bacillus halodurans C-1 ต่อการย่อยไซแลนและปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษคราฟท์

ภาวิณี ศรีฉันทะมิตร[1] คิน เลย์ คู[2] และ กนก รัตนะกนกชัย[3]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 4 กุมภาพันธ์ 2548 ตอบรับเมื่อ 4 พฤษภาคม 2548

บทคัดย่อ

การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่าง crude xylanases ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรียร้อยละ 0.4 เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในสภาวะเป็นด่าง ต่อการย่อยไซแลนและการปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษคราฟท์จากยูคาลิปตัส ชานอ้อย และสน พบว่าที่อัตราส่วนของ crude xylanases จาก *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 เท่ากับ 1 : 9 เหมาะสมที่สุดต่อการย่อยไซแลนและปลดปล่อย chromophore จากเยื่อยูคาลิปตัสและชานอ้อย ขณะที่อัตราส่วน 3 : 7 เหมาะสมที่สุดสำหรับเยื่อสน และผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากเยื่อกระดาษทั้ง 3 ชนิดสัมพันธ์กับปริมาณ chromophore

คำสำคัญ : *Bacillus firmus* K-1 / *Bacillus halodurans* C-1 / Chromophore / การทำงานร่วมกันระหว่างไซลาเนส / การย่อยไซแลน / เยื่อกระดาษคราฟท์

---

[1] *อดีตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[2] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Co-operative Actions between Xylanases from *Bacillus firmus* K-1 and *Bacillus halodurans* C-1 on Xylan Hydrolysis and Chromophores Release from Kraft Pulps

Pawinee Srichantamit [1], Khin Lay Kyu [2], and Khanok Ratanakhanokchai [3]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Received 4 February 2005 ; accepted 4 May 2005

Abstract

The crude xylanases were produced from *Bacillus halodurans* C-1 and *Bacillus firmus* K-1 grown in the non sterile medium containing 1% corn hull as a sole source of carbon and 0.4% urea as a sole source of nitrogen under alkaline condition. The optimization of the combination of these crude enzymes for hydrolysis of xylan and chromophores release from kraft pulps of eucalyptus, bagasse and pine was conducted. It was found that the best ratios of crude xylanases from *Bacillus halodurans* C-1 and *Bacillus firmus* K-1 were 1 : 9 for eucalyptus and bagasse pulps and 3 : 7 for pine pulp. The results also showed that the release of reducing sugars from the 3 pulps were related to the release of chromophores.

Keywords : *Bacillus firmus* K-1 / *Bacillus halodurans* C-1 / Chromophores / Co-operative Actions between Xylanases / Hydrolysis of Xylan / Kraft Pulp

[1] *Former Graduate Student, Division of Biotechnology, School of Bioresources and Technology.*

[2] *Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

ไซแลนเป็นเฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์พืช มีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาลไซโลส และมีโซ่กิ่งเป็นน้ำตาลหรืออนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่น เช่น acetyl group, arabinosyl group และ methylglucuronic acid โดยพืชชนิดต่างๆ มีองค์ประกอบบริเวณโซ่กิ่งต่างกัน โดยไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีโครงสร้างเป็น O-acetyl-4-O-methyglucuronoxylan ไม้เนื้ออ่อนมีโครงสร้างเป็น arabino-4-O-methylglucuronoxylan ขณะที่ไซแลนของพืชตระกูลหญ้าหรือธัญพืชมีโครงสร้างที่ซับซ้อน แต่มีขนาดที่สั้นกว่าไซแลนในไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน โดยมีโครงสร้างเป็น O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan [1, 2] ไซลาเนสต่างๆ มี mode of action ต่อการย่อยไซแลนต่างกัน [3] และการทำงานร่วมกันของไซลาเนสหลายชนิดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไซแลน [4] ปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยสลายไซแลนได้ดีโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพใดๆ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ผลิตเอนไซม์ที่มีส่วนประกอบที่สามารถยึดเกาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นส่วนประกอบที่สามารถยึดเกาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำจึงมีบทบาทที่สำคัญต่อการย่อยสลายไซแลน [5]

ปัจจุบันมีการนำไซลาเนสมาใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะกลุ่มประเทศในแถบสแกนดิเนเวีย อเมริกาเหนือ และญี่ปุ่น เนื่องจากเมื่อคำนวณในเชิงเศรษฐศาสตร์ของการนำไซลาเนสมาใช้ จะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการกำจัดน้ำเสียที่เกิดขึ้นเมื่อไม่ใช้เอนไซม์ [6] การใช้ไซลาเนสในกระบวนการก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษสามารถลดปริมาณการใช้สารคลอรีนที่จะก่อให้เกิดสาร adsorbable organic halogen ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษทางน้ำ และลดค่า chemical oxygen demand นอกจากนี้การใช้ไซลาเนสยังทำให้กระดาษขาวขึ้น และช่วยให้สมบัติบางอย่างของกระดาษดีขึ้น เช่น ความขาวสว่าง (brightness) ความต้านแรงดึง (tensile strength) และค่าต้านแรงฉีกขาด (tearing strength) เป็นต้น [7, 8] ซึ่งกลไกการทำงานของไซลาเนสไม่ได้ปลดปล่อยลิกนินที่เป็นตัวกำหนดคุณภาพของกระดาษโดยตรง แต่ย่อยไซแลนที่เกี่ยวพันอยู่ร่วมกับลิกนินในผนังเซลล์พืชออก ทำให้เกิดเป็นโพรงและลิกนินบางส่วนที่เชื่อมต่อกับไซแลนหลุดออก สารเคมีจึงสามารถกำจัดลิกนินออกได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น [9, 10]

จากการศึกษาของห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี พบว่า alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 [11] และ alkaliphilic thermotolerant *Bacillus halodurans* C-1 [12] เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ง่ายในสูตรอาหารราคาถูกและผลิตไซลาเนสเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะเป็นด่างที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จุลินทรีย์ทั้ง 2 ไม่ผลิตเซลลูเลส (เนื้อกระดาษเป็นเซลลูโลสจึงไม่ต้องการเอนไซม์เซลลูเลส) extracellular enzymes ที่ผลิตได้ย่อยสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำได้ดี เนื่องจากผลิตเอนไซม์ที่ประกอบด้วย xylan-binding xylanase ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดทนและทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง ซึ่งสิ่งต่างๆ เหล่านี้เป็นข้อดีในการนำไซลาเนสไปประยุกต์ใช้ในโรงงานผลิตเยื่อกระดาษคราฟท์ที่เป็นกระบวนการที่ผ่านการต้มด้วยด่าง และ pH ของเยื่อกระดาษภายหลังการต้มเยื่อมีค่าประมาณ 9-10 [6] โดยโรงงานผลิตเยื่อกระดาษทั้งหมดในประเทศไทยใช้กระบวนการนี้

งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาถึงประสิทธิภาพในการทำงานร่วมกันของกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 และ *Bacillus halodurans* C-1 ต่อการช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษ

คราฟท์ต่างๆ ซึ่งคาดว่าการทำงานร่วมกันของกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะช่วยให้การย่อยไซแลนออกจากเยื่อกระดาษดีขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกสีเยื่อกระดาษ และจะส่งผลต่อการลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ และทำให้คุณภาพของกระดาษดีขึ้น

2. ระเบียบวิธีวิจัย อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 แหล่งของจุลินทรีย์

Bacills firmus K-1 แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่มีฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ [11] ส่วน *Bacillus* sp. C-1 คัดแยกจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อกระดาษสยาม จำกัด ที่มียูคาลิปตัสเป็นวัตถุดิบในการผลิตเยื่อกระดาษ [12]

2.2 การผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้ mineral medium [13] ที่มีสูตรดังนี้ คือ urea ร้อยละ 0.4 K_2HP0_4 ร้อยละ 0.05 $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.02 $MnSO_4.H_2O$ ร้อยละ 0.002 $CaCl_2.2H_2O$ ร้อยละ 0.002 และ $FeSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.002 ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยมีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1.0 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับ pH เป็น 10.5 ด้วย Na_2CO_3 ร้อยละ 10 ทิ้งไว้ในห้องเย็น 1 คืนเพื่อให้เปลือกข้าวโพดอุ้มน้ำ ถ่ายเชื้อ *Bacillus firmus* K-1 หรือ *Bacillus halodurans* C-1 แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 วัน หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ (supernatant) เป็น crude enzyme สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 การเตรียมเปลือกข้าวโพด

เปลือกข้าวโพดที่ใช้เป็นเปลือกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่แก่และแห้งสนิท นำมาตัดให้มีขนาดเล็ก หลังจากนั้นปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ แล้วนำมาร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 40 mesh

2.4 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ตรวจสอบกิจกรรมของไซลาเนสโดยเติม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร ลงใน oat spelt xylan (Sigma) ร้อยละ 1.0 ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Somogyi-Nelson [14] โดยใช้ D-xylose (Merck) เป็นสารมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบกิจกรรมเซลลูเลสมีขั้นตอนการวิเคราะห์และสภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมของไซลาเนส แต่ใช้ carboxymethyl cellulose (Sigma) เป็นสับสเตรทแทนไซแลน และใช้ D-glucose เป็นสารมาตรฐานแทน D-xylose

1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ไซลาเนสและเซลลูเลส หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส ตามลำดับ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2.5 การย่อยเยื่อกระดาษ

นำเยื่อกระดาษคราฟท์ที่ผลิตจากชานอ้อย ยูคาลิปตัส และสน ที่ได้รับจากบริษัทเยื่อกระดาษสยาม จำกัด มาปั่นแห้งด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ให้มีขนาดเล็กลง และล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง หลังจากนั้นนำเยื่อกระดาษต่างๆ ที่ปั่นแล้วร้อยละ 2 (น้ำหนักแห้ง/ปริมาตร) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 9.0 บ่มร่วมกับ crude enzyme ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของไซลาเนสเท่ากับ 0.2 U/มล. ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ภายหลังการบ่มนำตัวอย่างไปปั่นแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกผลิตขึ้น

2.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษ โดยใช้วิธีการของ Somogyi-Nelson [14] และใช้ D-xylose เป็นสารมาตรฐาน

2.7 การตรวจสอบ chromophore

ภายหลังการย่อยเยื่อกระดาษในสภาวะการทดลองเช่นเดียวกับในหัวข้อที่ 2.5 นำส่วนใสมาตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร [15] เพื่อตรวจวัดปริมาณ chromophore ที่ถูกปลดปล่อยออกมา โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมเอนไซม์

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การผลิตเอนไซม์

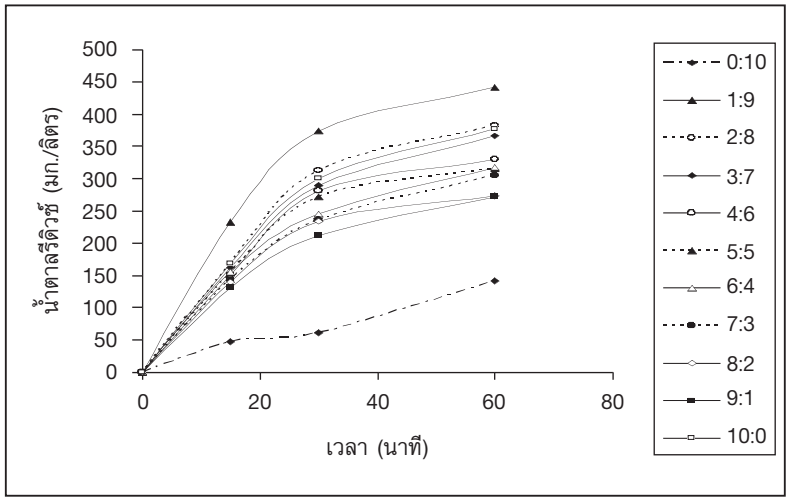
Bacillus firmus K-1 และ *Bacillus halodurans* C-1 เจริญได้ดีในสภาวะเป็นด่าง ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์จึงเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในสูตรอาหารเหลวที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ซึ่งไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นเมื่อตรวจสอบด้วยการ pour plate บน nutrient agar plate ภายหลังจากที่เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาเก็บเกี่ยวเอนไซม์ ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีสาเหตุมาจากในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูง (10^7 CFU/มล.) และจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีในสภาวะความเป็นด่างสูง (pH 10.5) ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้น้อยมากโดยเฉพาะเชื้อรา [13] เมื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด พบว่า *Bacillus firmus* K-1 และ *Bacillus halodurans* C-1 ผลิตไซลาเนส 4.8 และ 4.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ แต่ไม่สามารถตรวจพบเซลลูเลสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ แม้ว่าจะทำให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นแล้ว 20 เท่า

3.2 การย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษคราฟท์

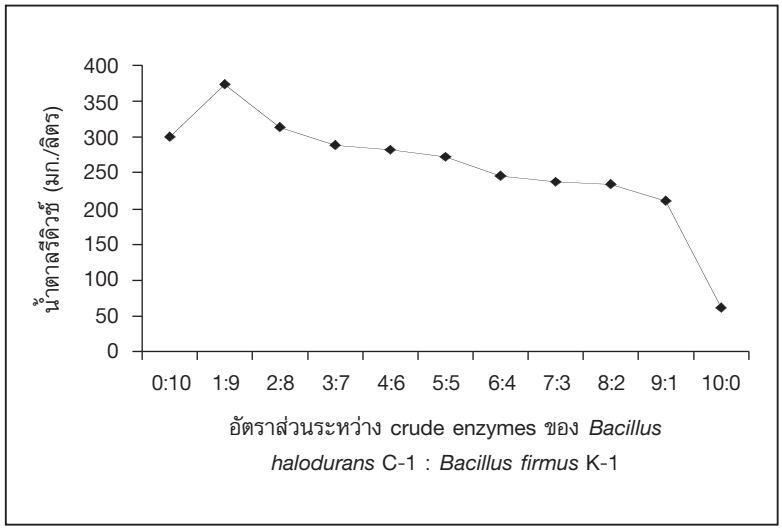
Ratanakhanokchai และคณะ [11] รายงานว่า *Bacillus firmus* K-1 ผลิตเอนไซม์ที่ประกอบด้วยไซลาเนส 2 ชนิด ได้แก่ ไซลาเนสที่มีขนาด 23 กิโลดาลตัน ซึ่งสามารถยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ เนื่องจากมีบริเวณ xylan-binding region เป็นองค์ประกอบอยู่ และทำงานร่วมกับไซลาเนสขนาด 45 กิโลดาลตันในการ

ย่อยเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และไซลาเนสที่ผลิตได้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงและทำงานในสภาวะเป็นด่าง ส่วนเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus halodurans* C-1 [12] มีสมบัติในการยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ และสามารถทนและทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงและสภาวะเป็นด่าง เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus firmus* K-1 โดย *Bacillus halodurans* C-1 ผลิตไซลาเนส 6 ชนิดที่มีขนาด 47 43 39 34 23 และ 22 kDa โดยที่ขนาด 23 และ 22 kDa สามารถยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษาการทำงานร่วมกันของ crude enzyme ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษคราฟท์ต่างๆ ซึ่ง Wong และคณะ [4] รายงานว่าการย่อยไซแลนให้สมบูรณ์ต้องการการทำงานร่วมกันของไซลาเนสหลายๆ ชนิด โดยไซลาเนสแต่ละชนิดมี mode of action ต่อการย่อยไซแลนต่างกัน [3] งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาความสามารถของไซลาเนสในการย่อยไซแลนในเยื่อยูคาลิปตัส เยื่อชานอ้อย และเยื่อสน ซึ่งเป็นตัวแทนของไม้เนื้อแข็ง พืชตระกูลหญ้า และไม้เนื้ออ่อน ตามลำดับ โดยผสม crude enzymes จาก *Bacillus firmus* K-1 และ *Bacillus halodurans* C-1 เพื่อหาอัตราส่วนของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยเยื่อกระดาษต่างๆ ซึ่งคาดว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษได้มากขึ้น ผลการตรวจสอบความสามารถในการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษทั้ง 3 ชนิด โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง crude enzymes ที่ผลิตจาก *Bacillus halodurans* C-1 ต่อ *Bacillus firmus* K-1 เท่ากับ 0:10 1:9 2:8 3:7 4:6 5:5 6:4 7:3 8:2 9:1 และ 10:0 โดยให้กิจกรรมสุดท้ายของไซลาเนสในทุกอัตราส่วนเท่ากับ 0.2 U/มล. แสดงดังรูปที่ 1-3

(ก)

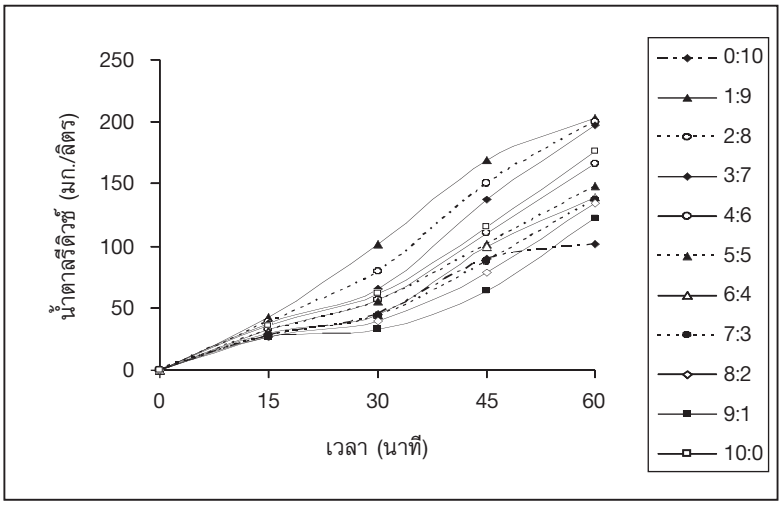


(ข)

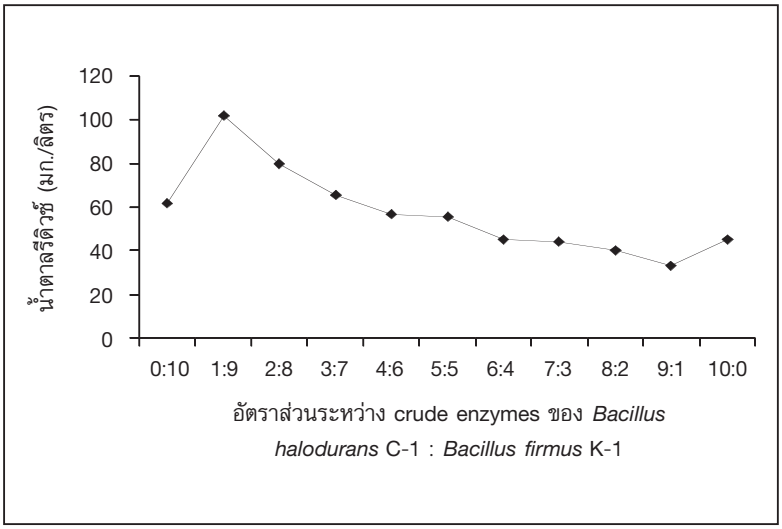


รูปที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากเยื่อยูคาลิปตัส หลังจากบ่มกับ crude enzymes ผสมระหว่าง *Bacillus halodurans* C-1 กับ *Bacillus firmus* K-1 ที่อัตราส่วนต่างๆ ที่ระยะเวลาการบ่ม (ก) ตั้งแต่ 0-60 นาที และ (ข) 30 นาที

(ก)

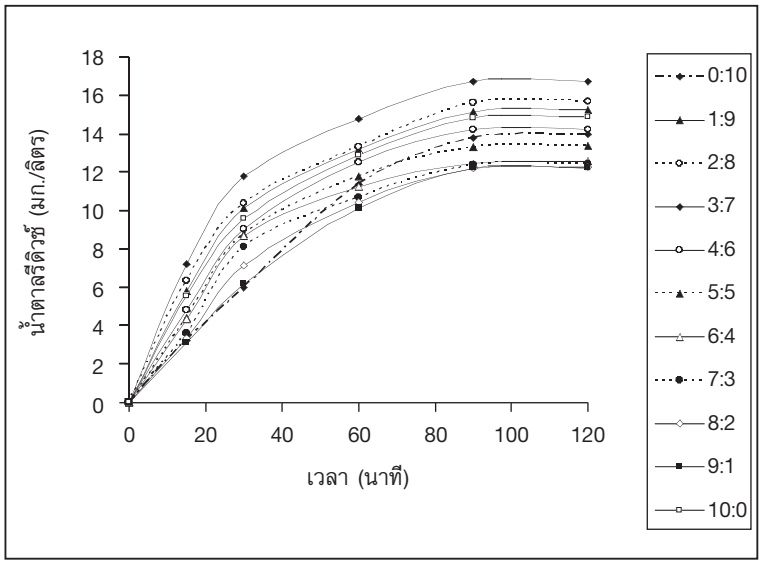


(ข)

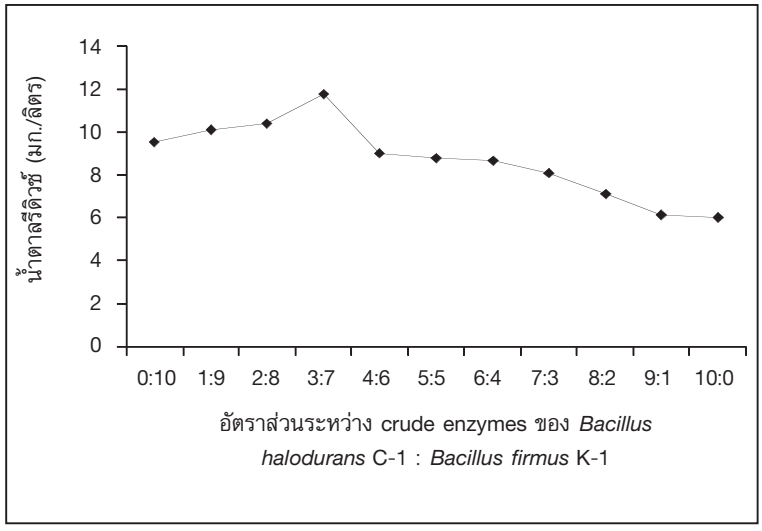


รูปที่ 2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากเยื่อชานอ้อย หลังจากบ่มกับ crude enzymes ผสมระหว่าง *Bacillus halodurans* C-1 กับ *Bacillus firmus* K-1 ที่อัตราส่วนต่างๆ ที่ระยะเวลาการบ่ม (ก) ตั้งแต่ 0-60 นาที และ (ข) 30 นาที

(ก)



(ข)



รูปที่ 3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปลดปล่อยจากเยื่อสน หลังจากบ่มกับ crude enzymes ผสมระหว่าง *Bacillus halodurans* C-1 กับ *Bacillus firmus* K-1 ที่อัตราส่วนต่างๆ ที่ระยะเวลาการบ่ม (ก) ตั้งแต่ 0-60 นาที และ (ข) 30 นาที

เมื่อศึกษาการย่อยเยื่อกระดาษชนิดต่างๆ จากยูคาลิปตัส ชานอ้อย และสน ที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 50 °ซ ด้วย crude enzymes จาก *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 ที่อัตราส่วนต่างๆ พบว่าแต่ละอัตราส่วนของเอนไซม์ผสมย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษได้ต่างกัน โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการย่อยมากที่สุด ได้แก่ อัตราส่วนระหว่าง crude enzymes ของ *Bacillus halodurans* C-1 ต่อ *Bacillus firmus* K-1 เท่ากับ 1:9 สำหรับเยื่อยูคาลิปตัส (รูปที่ 1) และเยื่อชานอ้อย (รูปที่ 2) และอัตราส่วนเท่ากับ 3:7 สำหรับเยื่อสน (รูปที่ 3)

จากรูปที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากเยื่อยูคาลิปตัสหลังจากบ่มกับ crude enzyme จาก *Bacillus halodurans* C-1 เพียงอย่างเดียว น้อยกว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาก crude enzyme จาก *Bacillus firmus* K-1 แสดงว่ากลุ่มไซลาเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 มีความเหมาะสมต่อการทำงานร่วมกันในการย่อยไซแลนจากเยื่อยูคาลิปตัสมากกว่ากลุ่มไซลาเนส จาก *Bacillus halodurans* C-1 ขณะที่การผสมระหว่างกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 ที่อัตราส่วนเท่ากับ 1:9 ปลดปล่อยน้ำตาลออกมาได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราส่วนอื่น และที่ใช้ไซลาเนสจากจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากที่อัตราส่วน 1:9 มีการทำงานร่วมกันที่เหมาะสมระหว่างกลุ่มไซลาเนสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด โดย Li และคณะ [3] พบว่าไซลาเนสต่างๆ จะมี mode of action ต่อการย่อยไซแลนต่างกัน ขึ้นกับความยาวและโซ่กิ่งในโครงสร้างของไซแลน โดยบางชนิดชอบที่จะย่อยไซแลนสายยาว เช่น ไซลาเนสจาก *Aureobasidium pullulans* และ *Thermotoga maritime* บางชนิดชอบย่อย xylooligosaccharides ที่มีไซโลสมากกว่า 8 residues เช่น ไซลาเนสจาก *Trichoderma longibrachiatum* บางชนิดไม่สามารถย่อยตำแหน่งใกล้กับโซ่กิ่ง เช่น ไซลาเนสจาก *Aureobasidium pullulans* แต่บางชนิดย่อยใกล้โซ่กิ่งได้ เช่น ไซลาเนสจาก *Thermotoga maritime* ซึ่ง Clark และคณะ [16] พบว่าการทำงานร่วมกันของไซลาเนสจาก *Pseudomonas fluorescens subsp. cellulosa* และ *Neocallimastix patriciarum* ในอัตราส่วน 1:4 ช่วยส่งเสริมให้การปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จากไม้เนื้อแข็งเพิ่มขึ้นร้อยละ 75 ค่า kappa number (เป็นค่าบ่งบอกปริมาณลิกนิน โดยหากค่า kappa number น้อยแสดงว่ามีปริมาณลิกนินต่ำ) ลดลง 1.74 หน่วย และเมื่อนำไปทำกระดาษค่าความขาวสว่างเพิ่มขึ้น 2.4 ISO โดยไม่มีผลต่อสมบัติด้านความแข็งแรงของกระดาษ

จากรูปที่ 2 ไซลาเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 เพียงอย่างเดียวสามารถย่อยไซแลนได้ใกล้เคียงกับที่อัตราส่วน 2:8 ขณะที่สัดส่วน 3:7 4:6 5:5 6:4 7:3 8:2 9:1 และ 10:0 ความสามารถในการย่อยไซแลนลดลงตามลำดับ แสดงว่าที่อัตราส่วนต่างๆ ดังกล่าวเอนไซม์ต่างๆ ทำงานร่วมกันอย่างไม่เหมาะสม ทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้น้อยกว่าปริมาณน้ำตาลที่ได้จากอัตราส่วน 1:9 ส่วนในกรณีของเยื่อชานอ้อย (รูปที่ 2) พบว่าที่อัตราส่วน 1:9 มีการทำงานร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ซึ่งสามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับกรณีของเยื่อยูคาลิปตัส แต่ในกรณีเยื่อสน (รูปที่ 3) การใช้เอนไซม์ที่อัตราส่วน 3:7 สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้สูงสุด ขณะที่อัตราส่วน 4:6 5:5 6:4 7:3 8:2 9:1 10:0 และ 2:8 1:9 และ 0:10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงว่าการทำงานร่วมกันของกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษได้สูงสุด ทั้งนี้น่าจะขึ้นกับความจำเพาะของไซลาเนสแต่ละชนิดและชนิดของไซแลน ซึ่งมีขนาดและโครงสร้างต่างกัน [1-3]

แม้ว่าเยื่อชานอ้อยจะมีไซแลนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงกว่าเยื่อยูคาลิปตัส (เยื่อชานอ้อยและยูคาลิปตัสมีไซแลนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 15.7 และร้อยละ 8.3 ตามลำดับ) [17] แต่อัตราการย่อยไซแลนให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ในเยื่อยูคาลิปตัสเร็วกว่า และให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อชานอ้อย ซึ่งน่าจะเกิดจากองค์ประกอบของไซแลนในไม้เนื้อแข็งที่มีโครงสร้างประกอบด้วย backbone ของน้ำตาลไซโลสที่มีโครงสร้างเป็น linear chain มาก และมีโซ่กิ่งน้อยกว่าในพืชตระกูลหญ้า ซึ่งหากมีปริมาณหมู่แทนที่มากเกินไปทำให้เกิดความเกะกะ ไซลาเนสจึงเข้าจับกับไซแลนได้น้อยลง [18, 19] ซึ่งแม้ว่าไซลาเนสแต่ละชนิดมีความสามารถในการจับและย่อยสลายไซแลนได้แตกต่างกัน [3] แต่เอนไซม์ส่วนใหญ่ย่อยไซแลนที่มีจำนวนโซ่กิ่งน้อยได้ดีกว่าไซแลนที่มีโซ่กิ่งมาก ดังนั้นจึงทำให้ไซลาเนสย่อยไซแลนในเยื่อยูคาลิปตัสได้ง่ายกว่าไซแลนในเยื่อชานอ้อยซึ่งเป็นพืชตระกูลหญ้าที่มี side chain เป็น acetyl group, arabinosyl group และ methylglucuronic acid จำนวนมาก [1]

สำหรับในกรณีของเยื่อสนพบว่าที่อัตราส่วนระหว่าง crude enzymes ของ *Bacillus halodurans* C-1 ต่อ *Bacillus firmus* K-1 เท่ากับ 3:7 เหมาะสมต่อการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษมากที่สุด ซึ่งต่างจากอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการย่อยไซแลนในเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยไซแลนในเยื่อสน พบว่ามีปริมาณน้อยกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อยมาก (ที่เวลาในการย่อย 30 นาที น้ำตาลรีดิวซ์ที่ปลดปล่อยจากเยื่อยูคาลิปตัส ชานอ้อย และสน ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดระหว่าง crude enzymes ของ *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 เท่ากับ 375 106 และ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุจากโครงสร้างของไซแลนในเยื่อสนแตกต่างจากเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย นอกจากนี้ในเยื่อสนมีปริมาณไซแลนน้อยกว่า (เยื่อสนมีไซแลนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 5.8) แต่มีลิกนินในปริมาณที่สูงกว่าเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย (ลิกนินในเยื่อสน ยูคาลิปตัส และชานอ้อย เท่ากับ 6.4 5.0 และ 3.3 ตามลำดับ) [17] ลิกนินที่เกี่ยวพันอยู่กับไซแลนจึงอาจบดบังการทำงานของไซลาเนสในการย่อยไซแลน [20]

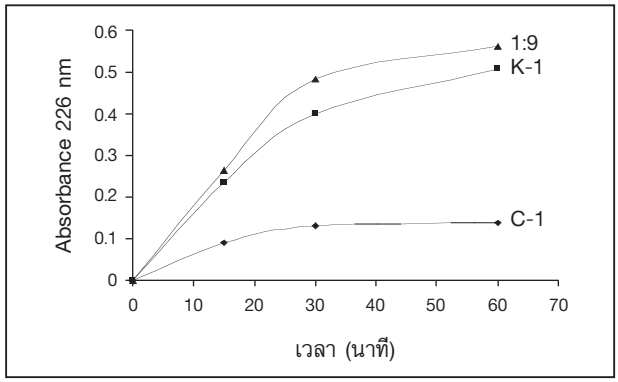
การที่ไซลาเนสผสมในอัตราส่วนที่เหมาะสมจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเพิ่มความสามารถในการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษคราฟท์ทั้ง 3 ชนิดนั้น อาจเนื่องจากไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีขนาดโมเลกุลเล็กจึงสามารถผ่านเข้าไปย่อยไซแลนที่อยู่ชั้นด้านในของผนังเซลล์ [21] และทำงานร่วมกับไซลาเนสชนิดอื่นที่มี mode of action ต่างกัน ซึ่ง Li และคณะ [3] พบว่าไซลาเนสแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยไซแลนต่างกัน จากผลการทดลองในรูปที่ 1 (ข) 2 (ข) และ 3 (ข) กลุ่มไซลาเนสจาก *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 มีความสามารถในการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษต่างๆ ได้ต่างกัน ดังนั้นการทำงานร่วมกันของกลุ่มไซลาเนสโดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสม จะย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษทั้ง 3 ชนิดได้สูงสุด ซึ่งอัตราส่วนที่เหมาะสมดังกล่าว (1:9 และ 3:7) เป็นการนำไซลาเนสที่ได้จาก *Bacillus firmus* K-1 มาใช้ในปริมาณที่มากกว่าไซลาเนสจาก *Bacillus halodurans* C-1 ดังนั้นไซลาเนสที่ผลิตจาก *Bacillus halodurans* C-1 จึงเป็นเพียงส่วนช่วยเสริมการทำงานของไซลาเนสที่ได้จาก *Bacillus firmus* K-1 เพื่อให้สามารถย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษได้เพิ่มขึ้น

3.3 การปลดปล่อย chromophore จากเยื่อยูคาลิปตัส ชานอ้อย และสน

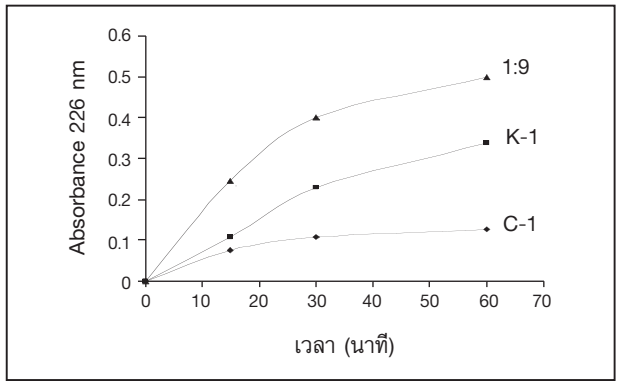
ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อและกระดาษมีการนำไซลาเนสมาช่วยกำจัดลิกนินในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษคราฟท์ โดยในเยื่อไม้เนื้อแข็งหลังจากการใช้ไซลาเนส สามารถลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการฟอกสีได้ประมาณร้อยละ 35-41 และในเยื่อไม้เนื้ออ่อนสามารถลดได้ร้อยละ 10-20 [22] หน่วยย่อยต่างๆ ในโครงสร้างของลิกนินมีสมบัติเป็น chromophores ที่สามารถดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งการใช้ไซลาเนสมีผลต่อการปลดปล่อย chromophores บางส่วนออกจากเยื่อกระดาษ [15] จากการตรวจวัดปริมาณ chromophores ที่เกิดขึ้นจากการย่อยเยื่อกระดาษคราฟท์ด้วย crude xylanase จาก *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 และอัตราส่วนระหว่าง crude xylanases ของ *Bacillus halodurans* C-1 ต่อ *Bacillus firmus* K-1 เท่ากับ 1:9 สำหรับเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย และอัตราส่วนเท่ากับ 3:7 สำหรับเยื่อสน พบว่า crude xylanases ผสมสามารถปลดปล่อย chromophores ออกจากเยื่อกระดาษคราฟท์ต่างๆ ได้มากกว่า crude xylanase จากจุลินทรีย์ชนิดเดียว ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 และ 5

รูปที่ 4 และ 5 แสดงปริมาณ chromophores ที่ถูกปลดปล่อยออกจากเยื่อยูคาลิปตัส เยื่อชานอ้อย และเยื่อสน ตามลำดับ ซึ่งพบว่าอัตราส่วน 1:9 สำหรับเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย และ 3:7 สำหรับเยื่อสน สามารถปลดปล่อย chromophores ออกจากเยื่อทั้งสามชนิดได้มากกว่าการใช้ crude enzyme จากจุลินทรีย์ชนิดเดียว ที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีสาเหตุจากการทำงานร่วมกันอย่างเหมาะสมระหว่างไซลาเนสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในการย่อยไซแลนในบริเวณที่ใกล้กับลิกนิน [23] ทำให้สามารถปลดปล่อย chromophores ออกมาได้มากกว่าการใช้ crude enzyme ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งผลของการปลดปล่อย chromophores ออกจากเยื่อกระดาษสอดคล้องกับความสามารถในการย่อยไซแลนในเยื่อกระดาษ ดังนั้นอัตราส่วน 1:9 และ 3:7 จึงถูกเลือกเพื่อนำไปใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป

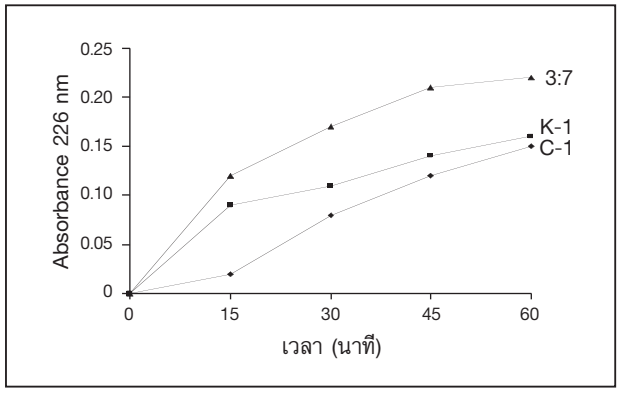
(ก)



(ข)



รูปที่ 4 ปริมาณ chromophores ที่ถูกปลดปล่อยจาก (ก) เยื่อยูคาลิปตัส และ (ข) เยื่อชานอ้อย หลังจากบ่มเยื่อกระดาษกับ crude xylanases ผสมระหว่าง *Bacillus halodurans* C-1 กับ *Bacillus firmus* K-1 ที่อัตราส่วน 1:9 และ crude xylanase จาก *Bacillus firmus* K-1 และ *Bacillus halodurans* C-1



รูปที่ 5 ปริมาณ chromophores ที่ถูกปลดปล่อยจากเยื่อสน หลังจากบ่มเยื่อกระดาษกับ crude xylanases ผสมระหว่าง *Bacillus halodurans* C-1 กับ *Bacillus firmus* K-1 ที่อัตราส่วน 3:7 และ crude xylanase จาก *Bacillus firmus* K-1 และ *Bacillus halodurans* C-1

4. สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบความสามารถในการย่อยไซแลนและปลดปล่อย chromophores จากเยื่อกระดาษคราฟท์ 3 ชนิด โดยใช้ crude xylanases ผสมจาก *Bacillus halodurans* C-1 และ *Bacillus firmus* K-1 พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการเพิ่มความสามารถในการย่อยไซแลนและปลดปล่อย chromophores จากเยื่อยูคาลิปตัสและเยื่อชานอ้อย คือ อัตราส่วนเท่ากับ 1:9 และที่อัตราส่วน 3:7 สำหรับเยื่อสน ซึ่งไซแลนในเยื่อกระดาษแต่ละชนิดมีโครงสร้าง ขนาด และจำนวนหมู่แทนที่แตกต่างกัน และไซลาเนสต่างๆ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน ดังนั้นไซลาเนสจากจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์จะต้องมีการผสมด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม จึงจะทำงานร่วมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการย่อยไซแลนและปลดปล่อย chromophores ออกจากเยื่อกระดาษ การนำไซลาเนสมาใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษจะช่วยปรับปรุงสมบัติของกระดาษให้ดีขึ้น ลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการฟอกสี และช่วยลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษ ซึ่งขณะนี้กลุ่มวิจัยกำลังทำการศึกษาเพื่อนำกลุ่มเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อบาซิลลัสไปใช้ในการช่วยฟอกสีเยื่อกระดาษคราฟท์

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติภายใต้โครงการแลกเปลี่ยนระหว่างไทยและญี่ปุ่น (NRCT-JSPS) ที่ให้ทุนวิจัยสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณบริษัทเยื่อกระดาษสยาม จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เยื่อกระดาษต่างๆ

6. เอกสารอ้างอิง

1. Sunna, A. and Antranikian, G., 1997, “Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacterial,” *Critical Review in Biotechnology*, Vol. 17, pp. 39-67.

2. Coughlan, M. P. and Hazlewood, G. P., 1993, “β-1,4-D-Xylan-Degrading Enzyme System: Biochemistry, Molecular Biology and Applications,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 17, pp. 259-289.

3. Li, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J. S., and Eriksson, K. E. L., 2000, “Relationships between Activities of Xylanases and Xylan Structures,” *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 27, pp. 89-94.

4. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N., 1988, “Multiplicity of β-1,4-Xylanase in Microorganisms : Functions and Applications,” *Microbiology Reviews*, Vol. 52, pp. 305-317.

5. Tomme, P., Warren, R. A. J., and Gilkes, N. R., 1995, “Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi,” *Advances in Microbial Physiology,* Vol. 37, pp. 1-81.

6. Tolan, J. S., 1996, "Pulp and Paper," In: Godfrey, T., and West, S. (eds.), *Industrial Enzymology,* Second edition, Macmillan Press, London, pp. 327-338.

7. Gubitz, G. M., Haltrich, D., Latal, B., and Steiner, W., 1997, "Mode of Depolymerisation of Hemicellulose by various Mannanases and Xylanases in Relation to Their Ability to Bleach Softwood Pulp," *Applied Microbiology and Biotechnology,* Vol. 47, pp. 658-662.

8. Bissoon, S., Christov, L., and Singh, S., 2002, "Bleach Boosting Effects of Purified Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on Bagasse Pulp," *Process Biochemistry*, Vol. 37, pp. 567-572.

9. Chen, C., Adolphson, R., Dean, J., Eriksson, K., Adams, M., and Westppheling, J., 1997, "Release of Lignin from Kraft Pulp by a Hyperthermophilic Xylanase from *Thermotoga maritime,*" *Enzyme and Microbial Technology,* Vol. 20, pp. 39-45.

10. Suurnakki, A., Tenkanen, M., Buchert, J., and Viikari, L., 1997, "Hemicellulases in the Bleaching of Chemical Pulps," *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 57, pp. 261-287.

11. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., and Tanticharoen, M., 1999, "Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1," *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 65, pp. 694-697.

12. Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K. L., 2003, "Cellulase-Free Xylanase from Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* Strain C-1 for Hydrolysis of Agricultural Residues and Kraft Pulps," *KMUTT Research and Development Journal,* Vol. 26, pp. 201-217.

13. Leartslarus, C., Kyu K. L., and Ratanakhanokchai, K., 2004, "Extracellular Cellulase-Free Xylanase Production by Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 in Fermentor Using Corn Hull as a Carbon Source," *KMUTT Research and Development Journal,* Vol. 27, pp. 321-331.

14. Somogyi, M., 1945, "A New Reagent for Determination of Sugar," *Journal of Biological Chemistry,* Vol. 160, pp. 61-68.

15. Patel, R. N., Grabski, A. C., and Jeffries, T. W., 1993, "Chromophore Release from Kraft Pulp by Purified *Streptomyces roseiscleroticus* Xylanases," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 39, pp. 405-412.

16. Clarke, J. H., Rixon, J. E., Ciruela, A., Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P., 1997, "Family-10 and Family-11 Xylanases Differ in Their Capacity of Enhance the Bleachability of Hardwood and Softwood Paper Pulps," *Applied Microbiology and Biotechnology,* Vol. 48, pp. 177-183.

17. Boonkong, J., Ratanarojmongkol T., Kyu, K. L., and Ratanakhanokchai, K., "Properties of Mannanase and Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 and Their Hydrolysis on Kraft Pulps," *KMUTT Research and Development Journal,* Vol. 28, No. 3, pp. 305-320.

18. Johanna, B., Tenkanen, M., Kantelinen, A., and Viikari, L., 1994, "Application of Xylanase in the Pulp and Paper Industry," *Bioresource Technology,* Vol. 50, pp. 65-72.

19. Tuohy, M. G., Puls, T., Clacyssons, M., Vrsanskas, M., and Coughlan, M. P., 1993, "The Xylan-Degrading Enzyme System of *Talaromyces emersonii* : Novel Enzyme with Activity Against Aryl β-D-Xylosidase and Unsubstituted Xylans," *Biochemical Journal*, Vol. 290, pp. 515-523.

20. Kaneko, S., Atsushi, K., Mizuho, M., Shinnosuke, I., Isao, K., and Kiyoshi, H., 2000, "Purification and Characterization of a Family G/11 β-Xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* Vol. 64, pp. 447-451.

21. Baraznenok, V. A., Becker, E. G., Ankudimova, N. V., and Okunev. N. N., 1999, "Characterization of Neutral Xylanases from *Chaetomium cellulolyticum* and Their Biobleaching Effect on Eucalyptus Pulp," *Enzyme and Microbial Technology,* Vol. 25, pp. 651-659.

22. Bajpai, P., 1997, "Microbial Xylanolytic Enzyme System: Properties and Applications," *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 43, pp. 141-194.

23. Kantelinen, A., Suurnakki, A., Buchert, J., Hortling, B., and Viikari, L., 1993, "Enzymatic Solubilization of Xylans in Kraft Pulps," *Proceeding of the 7th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Vol. 2, Beijing, China, p. 626.