รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

อารี ฤทธิบูรณ์ . 2541. การแยกและการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อราในสภาพธรรมชาติเพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส.วารสารเทคโนโลยีสุรนารี.5:138-146.

ภาษาอังกฤษ

Berry, D.R. 1988. Physiology of industrial of fungi. Blackwell Scientific publications.: 285.

Bhardwaj, N. K.,Bajpai, P. and Bajpai P. K. 1996. Use of enzymes in modification of fibers for improved beatability. J. Biotech. 51:21-26.

Biely, P., and Petrakova, K. 1985. Novel inducer of the xylan-degrading enzymes system of *Cryptococcus albidus*. J. Bacteriol. 160: 408-412.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol..3: 286-290.

Bok, J. D., Goers, S. K., Eveleigh, D. E. 1993. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production. Edited By Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P. Washington : American Chemical Society.: 54-65.

Buchert, J., Bergnor, E., Lindblad, G., Viikari, L. and Ek, M. 1997. Significance of xylan and glucomannan in the brightness reversion of kraft pulps. Tappi Journal. 80 (6): 165.

Buchert, J., Tenkanen, M., Kantelinen, A. and Viikari, L. 1994. Application of xylanases in the pulp and paper industry. Bioresource Technology. 50: 65.

Carlile, M. J. and Watkinson, S. C. 1994. The fungi. San Diego, Academic press INC.:428.

Chaudhry, A. S. 1998. Chemical and biological procedures to up grade cereal straws for ruminants.Nutrition Abs. And Review (series B). 68(5):319-330.

Christov, L. P. and Prior, B. A. 1993. Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Lett. 15 (12): 1269-1274.

Christov, L. P. and Prior, B. A. 1994. Enzymatic prebleaching of sulphite pulps.Appl. Microbiol Biotechnol. 42: 492-498.

Christov, L. P. and Prior, B. A. 1996a. Repeated treatment with *Aureobisidium pullulans* Hemicellulases and alkali enhence biobleaching of sulphite pulps. Enzyme Microbiol. Technol. 18: 244-250.

Christov, L. P., Myburgh, J., Tonder, A. V. and Prior, B. A. 1997. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. J. Biotechnol. 55: 21-29.

de Jong, E., Wong, K. K. Y., Martin, L. A., Mansfield, S. D., Gama, F. M. and Saddler, J. N. 1996. Molecular Mass Distribution of Materials Solubilized by Xylanase Treatment of Douglas-Fir Kraft Pulp. In: Jeffries, T. W. and Viikari, L. (eds). Enzymes for Pulp and Paper Processing. Acs Symposium Series 655. Washington, DC., American Chemical Society,: 44-62.

Dekker, R. F. H. and Richards, G. N. 1976. Hemicelluloses: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.. 32: 277-352.

Dekker, R. F. H.. 1985. Biodegradation of the hemicelluloses. In: Higuchi, T. (ed) Biosynthesis and biodegradation of wood components. Tokyo Academic Press.: 505-533.

Desphande, V., Lachke, A., Mishra, C., Keshar, S. and Roat, M. 1985. Mode of action and properties of xylanase and B-xylosidase from *Neurospora crassa*. Biotechnol. Bioeng.. 28: 1832-1837.

Dobberstein, J. and Emeis, C. C. 1989. B-Xylanase produced by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 262-268.

Dobberstein, J. and Emeis, C. C. 1991. Purification and characterization of B-xylosidase from *Aureobasidium pullulans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 210-215.

Dobozi, M. S., Szakacs, G. and Bruschi, C. V. 1992. Xylans Activity of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58(11): 3466-3471.

England, S. and Seifter, S. 1990. Method in enzymology. San Diago, CA: Acadamic press.182:285-306.

Ericksson, K. E. L., Blanchette, R. A. and Ander, P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Germany, Ozach Gmbh and Co., Berlin.: 181-222.

Eriksson, K. -E. L. 1985. Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry. TAPPI (Tech. Assoc. Pulp Pap. Ind.). 68: 46-55.

Frederick, M. M., Kiang, C-H, Frederick, J. R., Reilley, P. J. 1985. Purification and charcaterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger* I. Two isozymes active on xylan backbones near brach points. Biotechnol. Bioeng. 27: 525-532.

Gellerstedt, G. and Li, J. 1996. An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps. Carbohydrate research. 294: 41-51.

Gilbert, H. J. and Hazlewod, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J. Gen. Microbiol.. 139: 187-194.

Gilbert, M., Yaguchi, M., Watson, D. C., Wong, K. K. Y., Breuil, C. and Saddler, J. N. 1993. A comparison of 2 xylanases from the Thermophilic fungi *Thielavia terrestris* and *Thermoascus crustaceus*. Appl. Microbiol. Biotechnol.. 40(4): 508-514.

Gomes, J., Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmiiller, J., Sinner, M. and Steiner, W. 1993. Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 700-707.

Griffin D. H. 1994. Fungal Physiology. New York, NY, Wiley-Liss, Inc.,605 Third Avenue, 10158-0012.: 458.

Hartler, N. and Nonstrom, H. 1969. Light-absorbing properties of pulp and pulp components. III. Kraft pulp. Tappi. 52: 1712.

Inderbitzin, P. L., Abdel-Wahab, M. A. and Berbee, M. L. 2001. Aliquandostipitaceae, A new family for two new tropical ascomycetes with unusually wide hyphae and dimorphic ascomata. Amrican J. Botany. 88(1): 52-61.

Jeffries, T. and Lins, C. W. 1990. Effects of *Aureobasidium pullulans* xylanase on properties of aspen thermomechanical and kraft pulps. In: Kirk, K. T. and Chang, H. M. (eds), Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. USA., Butterworth-Heinemann, Boston: 191-202.

Jeffries, T. W. 1985. Emerging technology for fermenting D-xylose. Trends Biotechnol. 3: 208-212.

Jurasek, L. and Paice, M. G..1988. Biological bleaching of pulp, p. 11-13. In: International pulp bleaching conference. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, Atlanta.

Jurasek, L. and Paice, M. G.. 1992. Saving bleaching chemicals and minimizing pollution with xylanase. In Proceeding of the International Symposium on Pollution Preventation inthe Manufacture of Pulp and Paper. Opportunities and barriers. Pulp and paper Cluster, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C..: 105-107.

Kantelinen, A. Ratto, M., Sundquist, J., Ranua, M., Viikari, L. and Linko, M.. 1988. Hemicellulases and their potential role in bleaching. 1988 International Pulp Bleaching Conference. Tappi Proceedings.: 1-9.

Karni, M., Deopurkar, R. L. and Rale, V. B.. 1993. B-xylanase production by *Aureobasidium pullulans*grown on sugars and agricultural residues. W. J. Microbiol. Biotechnol.. 9: 476-478.

Kirk T. K. and Jeffries, T. W.. 1996. Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. In T. W. Jeffries and L. Viikari (eds.) Enzymes for pulp and paper processing. ACS symposium series 655, Washington, D.C., USA.

Kirk, T. K. 1983. Degradation and conversion of lignocelluloses. In: Smith, J. E., Berry, D. R., Kristiansen, B. (eds). The filamentous fungi. Vol 4. Fungal technology. Edward Arnold, London. 266-295.

Leather T. D. 1986.Colour variants of *Aureobisidium pullulans* over produce xylanase with extreamely high specific activity. Appl. Environ. Microbiol. 53:644-650.

Li, X. -L., Zhang, Z. -Q., Dean, J. F. D., Eriksson, K. -E. L. and Ljungdahl, L. G. 1993. Purification and Characterization of a New Xylanase (APX-III) from the Fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. Appl. Environ. Microbiol. 59 (10): 3212-3218.

Magee, R. J. and Kosaric, N.. 1985. Bioconversion of hemicellulosic. Adv. Biochem. Bioeng.. 32: 64-93.

Mansfield, S. D., Wong, K. K. Y., de Jong, E. and Saddler, J. N. 1996. Xylanase prebleaching of fractions of Douglas-fir kraft pulp of different fibre length. Appl. Microbiol. Biotechnol.. 46: 319.

Mora, F., Combat, J., Barrnoud, F., Pla, F. and Noe, P.. 1986. Action of xylanases on chemical chemical pulp fibers. Part I. Investigations on cell-wall modifications. Journal of Wood Chemistry and Technology. 6: 147-165.

Myburgh, J., Prior, B. A. and Kilian, S. G. 1991. The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose degrading enzymes of *Aureobisidium pullulans*NRRL Y 2311-1. Process Biochem. 26(6): 343-348.

Noe, P., Chevalier, J., Mora, F. and Comtat, J. 1986. Action of xylanases on chemical pulp fibers. Part II. Enzymatic beating. Journal of Wood Chemistry and Technology. 6: 167-184.

Paice, M. G. and Jurasek, L. 1984. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymatic hydrolysis. Journal of Wood Chemistry and Technology. 4: 187-198.

Parisi, F. 1989. Advanceds in cellulosic hydrolysis and in the utilization of hydrolysates. In Fiecher, A. (ed.) Advances in Biochemical Engineering / Biothecnology. Vol. 38, New York ,Spinger-Verlag Berlin, Heidelberg: 53-87.

Pham, P. L., Alric, I. and Delmas, M. 1995. Incorporation of xylanase in total chlorine free bleach sequences using ozone and hydrogen peroxide. Appita J. 48: 213-232.

Poutanen, K. 1988. Characterization of xylanolytic enzymes for potential applications. Diss. Techn. Res. Centre, Finland, Publications.: 473.

Punnapayak, H. Liawsakul, P. and Jeffries, T. W. 2000. Evidence of chromophore released from the xylanase treatment of aspen paper pulp.26th Congress on Science and Technology of Thailand.:433.

Reese, E. T., Lora, J. E. and Parrish, F. W.. 1969. Modofied substrates and modofied Product as inducers of carbohydrase. J. Bacterial. 100: 1151-1154.

Saddler, J. N. 1993. Bioconversion of forest and agricultural plant residues. Wallingford, CAB internation.:349.

Shei, J. C., Fratzke, A. R., Frederick, M. M., Frederick, J. R. and Reilley, P. J. 1985. Purification and charcaterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger* II. An enzyme of pI 4.5. Biotechnology and Bioengineering. 27: 533-538.

Teleman, A., Harjunpaa, V., Tenkanen, M., Buchert, J., Hausalo, T., Drakenberg, T. and Vuorinen, T. 1995. Characterisation of 4-deoxy-B-L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid attached to xylan in pine kraft pulp and pulping liquor by 1H and 13C NMR spectroscopy. Carbohydr. Res. 272: 55-61.

Tsao, G.T. and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulose technology In Berry, S. D. R. and Kristianiansen, B. (eds.) The Filamentus fungi : Fungul Technology. New York, John Wiley and Sons Inc.: 296-326.

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M. 1994. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. FEMS Microbiol. Rev. 13: 335.

Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M. and Sundquist, J. 1986. Bleaching with enzymes in bleaching. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Stockholm, Proc. 3rd Int. Conf.: 67-69.

Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M. and Sundquist, J. 1987. Application of enzymes in bleaching. Proceeding of the 4th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. Paris. 1: 151-154.

Viikari, L., Suumakki, A. and Buchert, J. 1996. Enzyme-added bleaching of kraft pulps: Fundamental mechanisms and practical applications. ACS Symp. Ser. 655: 15.

Visser, J., Beldman, G., Someren, M. A. K. V. and Voragen, A. G. J. 1992. Xylan and xylanase. Netherland, Elsevier Science Publishers.

Whistler, R. H. A. and Richards, E. L. 1970. Hemicellulose In The Cabohydrates. Edited by Pigman, W. and Horton, D. New York, Academic Press.: 447-469.

Wong, K. K. Y., de Jong, E. Saddler, J. N. and Allison, R. W. 1997b. Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp part 2: Target substrates. Appita J. 50(6): 509-518.

Wong, K. K. Y., Martin, L. A., Gama, F. M.,Saddler, J. N. and de Jong, E. 1997a. Bleach boosting and direct brightening by multiple xylanase treatments during peroxide bleaching of kraft plups .Biotechnol. Bioeng. 54(6): 312-318.

Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L. and Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of B-1,4-xylanase in microorganisms. Functions and applications. Microbiol. Rev. 52: 305-317.

Woodward, D. J.. 1987. Utilization of cellulose as a fermentation substrate: Problems and potential. In Stowell, J. D. Beardmore, A. J., Keevil, C. W. and Woodward, J. R. (eds) Carbon Substrates in Biotechnology. Vol. 21, IRL Press, Oxford.

Woodward, J. 1984. Xylanases: functions, properties and applications. Top Enzyme Ferment. Biotechnol. 8: 9-30.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร** Yeast Malt Xylose (YMX)

yeast extract	3	กรัม
malt extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
xylose	10	กรัม
วุ้นผง	1.5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร ถ่ายใส่หลอดเก็บเชื้อประมาณ 4 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที นำหลอดออกมาวางเอียงเป็นอาหารแข็งเอียง

2. **อาหารสูตรเพื่อการเจริญ**

xylose	10	กรัม
yeast nitrogen base	6.7	กรัม
asparagine	2	กรัม
KH_2PO_4	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. **อาหารสูตร** Production

xylose	10	กรัม
ammonium sulphate	2.5	กรัม
yeast extract	1	กรัม
KH_2PO_4	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 5.0 ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 95 มิลลิลตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4. Potato dextrose agar (PDA) **ประกอบด้วย**

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลแดร็กโตส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นำมันฝรั่งที่ล้างสะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุกโดยสังเกตได้จากเมื่อใช้มีดบีบแล้ว มันฝรั่งจะแตกออกโดยง่าย จากนั้นใช้ผ้าขาวบางกรองเอาแต่ส่วนน้ำ เติมส่วนประกอบที่เหลือลงไป คนให้ละลายหมด ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ ไซแลนเนส

การเตรียมสารเคมี

การเตรียม อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนท์

1. การเตรียม รีเอเจนท์ A

ชั่ง Na_2Co_3	25.0	กรัม
Rochelle Salt	25.0	กรัม
$NaHCO_3$	20.0	กรัม
$NaSO_4$	200.0	กรัม

ใส่ขวดวัดปริมาตร แล้วเติมน้ำจนสารละลายมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

2. การเตรียม รีเอเจนท์ B

ชั่ง $CuSO_4.5H_2O$ 15 กรัม ละลายน้ำจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม conc. H_2SO_4 2 หยด

3. เตรียมโดยการปิเปต รีเอเจนท์ A 25 มิลลิลิตร ผสมกับ Reagent B 1 มิลลิลิตร (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

การเตรียม อาเซโนโมลิบเดต รีเอเจนท์

ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต 25 กรัม ละลายในน้ำ 450 มิลลิลิตร แล้วเติม conc. H_2SO_4 21 มิลลิลิตร ในขณะทำการกวนให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3 กรัม ของ $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ที่ละลายอยู่ในน้ำ 2.5 มิลลิลิตร ลงไป แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ใส่ขวดสีน้ำตาลและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

การวิเคราะห์เอนไซม์

1.ใส่เอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ

2. เติมไซแลน 1 เปอร์เซ็นต์(สับสเตรต)ลงไป เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3. จากนั้นเติม อัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนท์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

4. เติม อาเซโนโมลิบเดต รีเอเจนท์ 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร เขย่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความคลื่นแสง 520 นาโนเมตร โดยใช้ โซเดียม ฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 เป็นหลอดควบคุม จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลไซโลส จากกราฟน้ำตาลมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่าหน่วยของเอนไซม์

การคำนวณหาค่าหน่วยของเอนไซม์ตามวิธีการของ The international Union of Biochemistry

การคำนวณ หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนส

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1 μM ของสารตั้งต้นที่ถูกย่อยใน 1 นาที
= 1 μM ของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1นาที
= 0.150 มิลลิกรัม ของไซโลสที่ถูกปล่อยออกมาใน 1 นาที

ถ้า 0.150 มิลลิตร ไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า = 1 หน่วย

1.000 มิลลิกรัม ไซโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 10 นาที มีค่า = $\frac{1}{0.150 \times 10}$ หน่วย

= 0.67 หน่วย

หากปลดปล่อยกลูโคส x มิลลิลิตร ใน 10 นาที จะมีค่า = (x) x (0.67) หน่วย

จากการทดลองในปริมาณเอนไซม์ 0.25 มิลลิลิตร ถ้าหากใช้เอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร

= $\frac{(x) \times (0.67)}{0.25}$ หน่วย

หรืออาจคิดเป็น = $\frac{\text{(มิลลิกรัมไซโลส)} \times (0.67)}{\text{มิลลิลิตรของเอนไซม์}}$ หน่วยต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การหาค่าความขาวสว่างของเยื่อ (Measurement of ISO brightness of pulps **อ้างอิง** ISO 3688-1977 (E), ISO 2469-1977 (E))

ความขาวสว่างของเยื่อ (pulp brightness) หมายถึง ค่าแฟคเตอร์ของการสะท้อนแสงของแผ่นเยื่อที่หนามากจนแสงไม่สามารถทะลุผ่าน ที่ความยาวคลื่นแสง 457 นาโนเมตร โดยถือว่า perfect reflecting diffuser มีค่า factor การสะท้อนแสงเป็น 100 ค่าความขาวสว่างมีหน่วยเป็นร้อยละ (%)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องตีเยื่อ (ISO 2469)
2) Spectrophotometer Elrepho 2000 (ISO 2469)
3) Two working standard
4) Buchner fennel เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 115 มิลลิเมตร ความจุไม่น้อยกว่า 500 มิลลิลิตร
5) Hydraulic disk-press
6) Disk เส้นผ่านศูนย์กลาง 160 มิลลิเมตร หนาประมาณ 1.0-1.5 มิลลิเมตร
7) กระดาษซับขนาด 25 กรัม/ตารางเมตร
8) กระดาษกรองเบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร

วิธีการเตรียมเยื่อ

เยื่อกระดาษที่จะนำมาวัดค่าความขาวสว่าง ควรเก็บในที่ปราศจากความร้อน แสง และมีความชื้นคงที่ โดยจะใช้เยื่อ 2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อ 1 แผ่น จำนวน 4 แผ่น

1) นำเยื่อมาแช่ในน้ำกลั่น โดยใช้เวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเยื่อไปตีในเครื่องกระจายเยื่อความเร็ว 600 รอบต่อนาที
2) นำน้ำเยื่อที่ได้มาเทใส่ในกระบอกตวงปริมาตร 2 ลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 2 ลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เยื่อกระจายตัวสม่ำเสมอ แบ่งน้ำเยื่อออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน

3) เทน้ำเยื่อปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงใน buchner funnel ซึ่งมีกระดาษกรองหนาวางอยู่ ใช้น้ำกลั่นฉีดให้เปียก เพื่อไล่ฟองออก จากนั้นดูดน้ำออก แล้วนำกระดาษกรองอีกแผ่น ทำเครื่องหมาย top side วางลงไป นำไปวางลงบนกระดาษซับ
4) นำเยื่อกระดาษมา press ตามลำดับขั้นตอนการวางดังนี้
   - แผ่น plate
   - กระดาษซับ 2 แผ่น ประกบกัน
   - test sheet
   - กระดาษซับ 2 แผ่น
   - แผ่น plate
   - กระดาษซับ 2 แผ่น ป้องกันการบิดเบี้ยวของ plate
5) ทำการ press โดยใช้ pressure 300 Kpa โดยใช้เวลานาน 3 นาที
6) นำ sheet ที่ผ่านการ press มาวางลงบนกระดาษซับแผ่นใหม่ประกบทั้ง 2 ด้าน นำไปวางไว้บน ring ซึ่งทำจากเหล็กหรือพลาสติก เพื่อป้องกันการบิดงอของแผ่น sheet ในระหว่างที่ผึ่งตากแผ่น sheet ซึ่งใช้เวลานาน 24 ชั่วโมง

วิธีการวัดค่าความขาวสว่าง

1) อ่านค่า working standard ตรงกับ assign value + 0.3
2) กดปุ่ม (^) (7) จะปรากฏ Measuring brightness
3) วาง test sheet ด้าน top side ลงบนเครื่อง Elrepho จากนั้นกดปุ่มสีเหลืองบันทึกค่า brightness

ภาคผนวก ง

การวัดค่าคับปานัมเบอร์ของเยื่อ
(อ้างอิง T 236 cm - 85)

ค่าคับปานัมเบอร์ (Kappa number) ของเยื่อ คือ จำนวนมิลลิลิตรของโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ที่ใช้ไปต่อเยื่อ 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ภายใต้เงื่อนไขที่กำหนดโดยผลลัพธ์ที่จะได้จะถูกแปลงให้สมดุลย์กับปริมาณ 50% ของ 0.1 นอร์มัล โปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ที่ใช้เติมลงไปในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

1) เครื่องปั่นเหวี่ยงหรือเครื่องตีเยื่อ (blender)
2) แท่งคนแม่เหล็ก
3) เทอร์โมมิเตอร์
4) บีกเกอร์ ขนาด 2000 มิลลิลิตร
5) บีกเกอร์ ขนาด 250 มิลลิลิตร
6) บิวเรต ขนาด 100 มิลลิลิตร
7) บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้

1) Potassium permanganate ความเข้มข้น 0.1 N (0.1+0.0005 N $KMnO_4$)
2) Sodium thiosulfate ความเข้มข้น 0..2 N (0.2+0.0005 N $Na_2S_2O_3$)
3) Potassium iodide solution ความเข้มข้น 0.1 N หรือ 16.6% KI
4) Sulfuric acid ความเข้มข้น 4 N (4 N H_2SO_4)
5) Starch indicator solution 0.2%

วิธีการวัดค่าคับปานัมเบอร์

1) ปริมาณตัวอย่างของเยื่อที่ใช้จะต้องทำการลองผิดลองถูกเพื่อให้ปริมาณลิกนินสมดุลกับ 0.1 N $KMnO_4$ จำนวน 50% ของที่เติมซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิเช่น ชนิดของเยื่อ ความชื้นของเยื่อ กระบวนการต้มเยื่อ เป็นต้น ปริมาณเยื่อตาม standard เท่ากับ 50/kappa number โดยประมาณ ปรับปริมาณของเยื่อที่ใช้จนกระทั่งมีปริมาณ consumed สารเคมีเป็น 50%

2) นำตัวอย่างของเยื่อที่ต้องการหาค่าคับปานัมเบอร์ มาตีกระจายในน้ำกลั่นจนกระทั่งเยื่อกระจายตัว

3) ใส่ตัวอย่างของเยื่อที่ผ่านการตีกระจายลงไปในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 795 มิลลิลิตร ไปวางบน magnetic stirrer ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 25 °C ± 0.2 °C

4) ปิเปต 0.1 N $KMnO_4$ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ 4 N H_2SO_4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เทลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร พร้อมๆ กัน จากนั้นปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานาน 10 นาที

5) หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 16.6% KI ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

6) ไตเตรตหาปริมาณไอโอดีนอิสระ (I_2) ที่เกิดขึ้น ด้วย 0.2 N $Na_2S_2O_3$ จะเกิดสารละลายสีเหลืองอ่อน เติมน้ำแป้ง 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีน้ำเงินเข้ม ไตเตรตต่อไปจนสีน้ำเงินจางหายไปจนไม่มีสี บันทึกปริมาตร 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ ก็จะทราบถึง 0.1 N $KMnO_4$ ที่เหลือจากการทำปฏิกิริยา

7) การทำ Blank test

- เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร
- เติม 4 N H_2SO_4 และ 0.1 N $KMnO_4$ อย่างละ 100 มิลลิลิตร ลงไปพร้อมๆ กัน
- เติม 16.6% KI ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
- ไตเตรตด้วย 0.2 N $Na_2S_2O_3$ จะได้สารละลายสีเหลืองอ่อน จึงเติมน้ำแป้ง สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นไตเตรตต่อจนได้สารละลายใสไม่มีสี บันทึกปริมาตร 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้

วิธีการคำนวณ

$$\text{Kappa number} = \frac{Pf}{W\,[1+0.013\,(25-t)\,]}$$

โดยที่ P = (b-a) N/0.1

b = จำนวนมิลลิลิตรของ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ไปในการทำ blank test

a = จำนวนมิลลิลิตรของ 0.2 N $Na_2S_2O_3$ ที่ถูกใช้ไปโดยตัวอย่างเยื่อ

W = น้ำหนักของเยื่อ (กรัม)

N = จำนวนนอร์มัลลิตี้ (Normality) ของ $Na_2S_2O_3$

f = factor สำหรับแปลงผลลัพธ์ให้สมดุลย์กับปริมาณ 50% ของ 0.1 N $KMnO_4$ ที่เติมลงไปในการทดลอง (ตารางค่า f)

t = อุณหภูมิระหว่างทำการทดลอง ($^{\circ}C$)

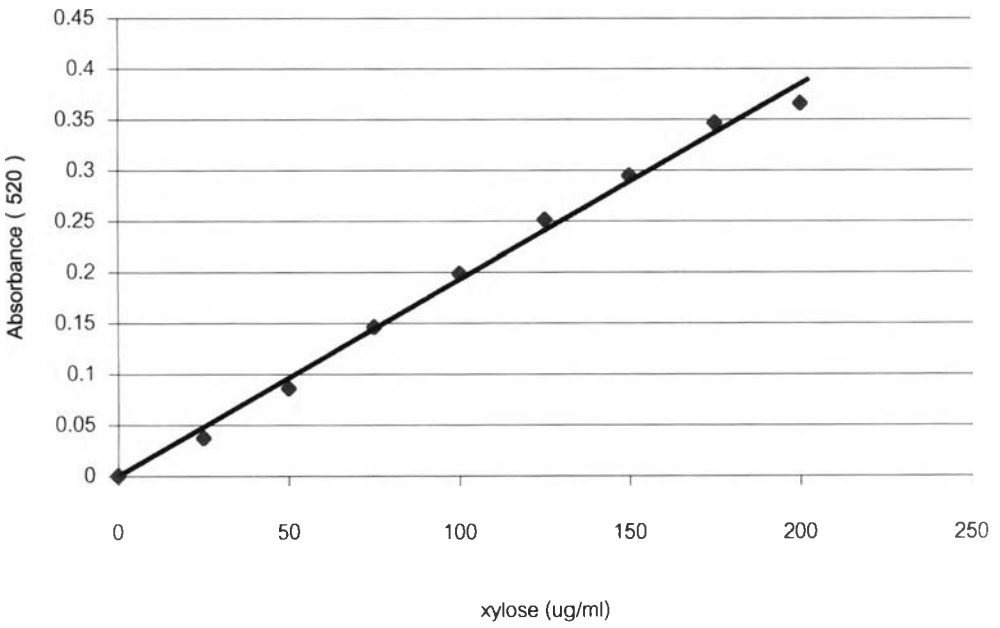
Factor f to correct for different percentages of permanganate used

f	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0.958	0.960	0.962	0.964	0.966	0.968	0.970	0.973	0.975	0.977
40	0.979	0.981	0.683	0.985	0.987	0.989	0.991	0.994	0.996	0.998
50	1.000	1.002	1.004	1.006	1.009	1.011	1.013	1.015	1.017	1.019
60	1.022	1.024	1.026	1.028	1.030	1.033	1.035	1.037	1.039	1.042
70	1.044									

ภาคผนวก จ

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 25 50 75 100 120 150 175และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองว0.5 มิลลิลิตร เติมอัลคาไลน์ คอปเปอร์ รีเอเจนท์ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมอาเซโนโมลิบเดท รีเอเจนท์ หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลไซโลสดังแสดงในภาพที่ 30.



ภาพที่ 30. กราฟน้ำตาลมาตรฐาน

ภาคผนวก ฉ

ตาราง ANOVA

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	11	485.6399	44.1491	19.81**
ERROR	24	53.4997	2.2292	
TOTAL	35	539.1396		

CV = 8.8%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	11	708.3424	64.3948	65.52**
ERROR	24	23.5882	0.9828	
TOTAL	35	731.9306		

CV = 6.1%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	15	2414.9357	160.9957	177.07**
ERROR	32	29.0948	0.9092	
TOTAL	47	2444.0305		

CV = 10.0%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ที่เลี้ยงในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิต่างๆกัน

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	15	2219.4507	147.9636	207.40**
ERROR	32	22.8294	0.7134	
TOTAL	47	2242.2845		

CV = 8.1%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	15	108.3345	7.2223	79.09**
ERROR	32	2.9223	0.0913	
TOTAL	47	111.2568		

CV = 13.2%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	15	29.9888	1.9993	84.97**
ERROR	32	0.7530	0.0235	
TOTAL	47	30.7418		

CV = 7.8%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้รำละเอียดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	19	152.2408	8.0127	33.85**
ERROR	40	9.4675	0.2367	
TOTAL	59	161.7083		

Cv = 14.7%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนหน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงโดยใช้ฟางข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	19	84.3667	4.4405	81.21**
ERROR	40	2.1872	0.0546	
TOTAL	59	86.5560		

CV = 6.9%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน หน่วยของเอนไซม์ของไซแลนเนสที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สองสายพันธุ์ ในอาหารที่มีค่า pH 5 ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เลี้ยงในแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมความเข้มข้นต่างๆ

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	39	236.8784	6.0738	41069**
ERROR	80	11.6548	0.1457	
TOTAL	119	248.533		

CV = 11.4

** = significant at 1% level

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าคัปปานัมเบอร์ของเยื่อกระดาษหลังจากการฟอกด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* 2 สายพันธุ์

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	6	3.0025	0.5004	15.42**
ERROR	14	0.4542	0.0324	
TOTAL	20	3.4567		

CV = 2.0%

** = significant at 1% level

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนค่าความขาวสว่างของเยื่อกระดาษหลังจากการฟอกด้วยไซแลนเนสจาก *A. pullulans* 2 สายพันธุ์

SV	DF	SS	MS	F
TREAT(T)	6	1.5893	0.2649	13.00**
ERROR	35	0.7133	0.0204	
TOTAL	41	2.3026		

Cv = 0.3%

** = significant at 1% level

ประวัติผู้เขียน

นางสาวธาริณี พังจุนันท์ เกิดวันที่ 25 กันยายน พ.ศ. 2515 เพชรบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2543