การใช้เอ็นไซม์กำจัดหมึกพิมพ์จากเศษกระดาษ

นีโลบล สุวรรณาภินันท์

ปัญหาของการนำเศษกระดาษกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ จะเกิดจากขั้นตอนการกำจัดหมึกพิมพ์ออกจากเยื่อซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากมาก โดยเฉพาะการกำจัดหมึกพิมพ์ออกจากเศษกระดาษประเภทกระดาษอัดสำเนา กระดาษโทรสาร และกระดาษพิมพ์ด้วยระบบเลเซอร์ สาเหตุก็คือหมึกพิมพ์ของเศษกระดาษประเภทนี้มีลักษณะเป็นโคพอลิเมอร์ระหว่างสารประกอบสไตรีน (styrene) กับ อะคริเลต (acrylate) ซึ่งมีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติกและมีกรรมวิธีการพิมพ์ที่ต้องใช้ความร้อนขณะพิมพ์ ทำให้หมึกพิมพ์เกิดการหลอมรวมติดเข้ากับเส้นใยของกระดาษที่เป็นสารประกอบเซลลูโลส การกำจัดหมึกพิมพ์แบบเดิมเป็นการใช้สารเคมี เช่น โซดาไฟ ฯลฯ ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและยังต่อเนื่องไปยังระบบอื่นๆอีกด้วย เช่น การสลัดน้ำออก การกระจายเยื่อเม็ดหมึกแตกหลุดออกจากเส้นใย การลอยตัวของเม็ดหมึกขึ้นเหนือผิวน้ำ และการล้างเยื่อ อีกทั้งเป็นกระบวนการที่ใช้ต้นทุนสูง และยังไม่สามารถกำจัดหมึกพิมพ์ให้หลุดออกจากเส้นใยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการค้นคว้าเอกสารพบว่าเกี่ยวกับกระบวนการกำจัดหมึกพิมพ์จากเศษกระดาษได้มีการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์หลายชนิด เช่น xylanase cellulase, lipase, และ amylase นำมากำจัดหมึกพิมพ์ออกจากเศษกระดาษได้ และการใช้เอนไซม์เหล่านี้ยังจะเป็นกรรมวิธีแบบใหม่ในการกำจัดหมึกชนิดใหม่ที่มีลักษณะอ่อนโยนเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าการใช้สารเคมีในการกำจัดหมึกพิมพ์แบบเดิม ทั้งนี้เพราะเอนไซม์เป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตทางชีวภาพจึงไม่ก่อปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม แต่จากการค้นคว้าเอกสารรายงานพบว่าการกำจัดหมึกพิมพ์ใช้เอนไซม์บริสุทธิ์แทบทั้งสิ้น ไม่พบการใช้เอนไซม์ดิบ (crude enzymes) ในการกำจัดหมึกพิมพ์จากเศษกระดาษแต่อย่างใด คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดใช้เอนไซม์ดิบโดยตรง เช่น เอนไซม์เซลลูเลสดิบ (crude cellulase) ทั้งนี้เพราะมีปริมาณเอนไซม์ดิบอยู่มากพอสมควร ประกอบกับสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น เหมาะกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่จะสามารถผลิตเอนไซม์ดิบชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังมีต้นทุนการผลิตต่ำ และเทคโนโลยีการผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ภายในประเทศยังมีขีดจำกัด คือ ยังไม่สามารถผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ได้

ด้วยเหตุนี้กรมวิทยาศาสตร์บริการจึงได้ศึกษาวิจัยการใช้เอนไซม์กำจัดหมึกพิมพ์จากเศษกระดาษ โดยเน้นการใช้เอนไซม์เซลลูเลสดิบที่ผลิตขึ้นเอง พร้อมทั้งศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์ การทำให้มีลักษณะเป็นเอนไซม์สำเร็จรูป และศึกษาวิธีการเก็บรักษาให้เอนไซม์มีค่าความเสถียร (stabilization) ที่เหมาะสม พร้อมที่จะนำมาใช้งาน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เอนไซม์บริสุทธิ์

เอนไซม์เซลลูเลส บริสุทธิ์ที่ใช้ในการทดลอง ซื้อจากบริษัท Sigma จำกัด เป็นชนิด Lyophilized

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เพาะเลี้ยงเอนไซม์มีทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยมีเชื้อราจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Trichodema reesei TISTR 3080* และ *Trichoderma viride TISTR 3160* ส่วนเชื้อแบคทีเรียมีจำนวน 1 สายพันธุ์คือ *Cellulomonas sp. ATCC 21399*

3. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดิบ

การทดลองผลิตเอนไซม์เซล-

ลูเลสดิบจากเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

3.1 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดิบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย อาหารที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เป็นส่วนผสมของ nutrient broth ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ร่วม กับ substrate 3 ชนิดคือ ใบไผ่ตากแห้งบด ผักตบชวาตากแห้งบด และชานอ้อยตากแห้งบด

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น(g/l)
เซลลูโลส (substrate)	
Peptone form meat	5.0
Meat extract	3.0

ตารางที่ 1 แสดงสูตรธาตุอาหารที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดิบด้วยเชื้อแบคทีเรีย

3.2 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดิบโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา อาหารที่ใช้เป็นสูตรทั่วๆ ไป โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 2 โดยใช้ร่วมกับ substrate ชนิด Avicel เป็นเซลลูโลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาแล้วซึ่งจะเป็น แหล่งคาร์บอนที่ดี และชานอ้อยบดที่ผ่านการแช่ล้างด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH_2)$) มาแล้ว

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น(g/l)
เซลลูโลส (substrate)	10 หรือ ผันแปร
$(HN_4)_2SO_4$	1.4
KH_2PO_4	2.0
$MgSO_4$	0.3
$CaCl_2$	0.4
$FeSO_4$	0.2
สารอื่นที่อาจเติม $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $CaCl_2$, Urea, Tween-80	ในปริมาณน้อย

ตารางที่ 2 แสดงสูตรธาตุอาหารที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดิบด้วยเชื้อรา

4. การวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีการศึกษาทดลอง 5 วิธี ดังนี้

4.1 วิธี Reducing sugar เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลที่ถูกรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)

4.2 วิธี Fpase เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ย่อย substrate ที่เป็นกระดาษกรอง (filter paper) และอ่านค่ากิจกรรมเอนไซม์จากกราฟของน้ำตาลมาตรฐาน แล้วคำนวณค่า unit of enzyme = ((conc sample - conc control) x 0.093)/0.5, unit/mL

4.3 วิธี CMCase เป็นวิธีที่ใช้ให้เอนไซม์ย่อย substrate ที่เป็นเซลลูโลส ชนิด CMC (Caboxyl methyl cellulose) และอ่านค่ากิจกรรมเอนไซม์จากกราฟของน้ำตาลมาตรฐาน แล้วคำนวณค่า unit of enzyme = ((conc sample - conc control) x 0.093)/0.5, unit/mL

4.4 วิธี β-Glucosidase เป็นวิธีใช้เอนไซม์ย่อย substrate ที่เป็น β- Glucosidase และอ่านค่ากิจกรรมเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานของ β-Glucosidase ค่าที่อ่านได้คือค่าของ β-Glucosidase (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)

4.5 วิธีโปรตีน เป็นวิธีการอ่านค่ากิจกรรมเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

5. กรรมวิธีทำให้เอนไซม์เซลลูเลสดิบเข้มข้นมีลักษณะสำเร็จรูป

นำเอนไซม์เซลลูเลสดิบเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แยกเก็บน้ำหมักส่วนที่เป็นสารละลายใสไว้ นำมาผ่านแผ่นกรองทำด้วย nylon 66 ที่มีรูกรองขนาด 0.45 μm. เพื่อแยกสารปนเปื้อนออกและทำให้สารละลายใสยิ่งขึ้น แล้วจึงนำไปทำให้เอนไซม์เข้มข้นด้วยเครื่อง ultrafiltration

6. การทดลองหาค่าความเสถียรของเอนไซม์และการเก็บรักษา

ในการศึกษาวิจัยนี้ใช้วิธีเก็บรักษาเอนไซม์ดิบเข้มข้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในตู้เย็นทั่วๆ ไป การใช้งานเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมนั้น ต้องการเซลลูเลสที่มีราคาถูก สามารถทำกิจกรรม (activity) อยู่ได้นาน และมีความเสถียรในการเก็บรักษาอยู่ได้นาน แต่จะไม่นิยมเก็บที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่านี้ เพราะจะทำให้น้ำในส่วนประกอบกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งมีการแปรสภาพ (denature) ได้ นอกจากนี้ยังมีการเติมสารบางชนิดที่เป็น วัตถุกันเสีย(preservative) เช่น โซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ และมีการเติมสารทำให้เสถียร (stabilizer) ซึ่งเป็นความลับทางการค้าเพื่อช่วยเก็บรักษาเอนไซม์ให้มี shelf-life ที่นานขึ้น เอนไซม์ดิบเข้มข้นที่เก็บอยู่ในตู้เย็น จะถูกนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ทุกๆ 7 วันเป็นเวลา 3 เดือน

7. การทดลองใช้เอนไซม์กำจัดหมึกพิมพ์ออกจากเศษกระดาษ

ประกอบด้วยขั้นตอนสรุปดังต่อไปนี้

- การเตรียมเยื่อเศษกระดาษ
- การ treat เยื่อด้วยเอนไซม์ตามสภาวะที่กำหนด
- การคลุกเคล้าเยื่อโดยใช้เครื่อง Hydrapulper ตามสภาวะที่กำหนด
- ขั้นการกำจัดหมึกแบบลอยตัวด้วยฟองอากาศ ในการทดลองได้ใช้เครื่อง floatation unit เยื่อที่ผ่านการคลุกเคล้าและกระจายจากเครื่อง Hydrapulper จะถูกนำมาผ่านการทำงานของเครื่อง Formax เพื่อแยกเยื่อออก และส่วนที่เป็นเม็ดหมึกพิมพ์จะถูกดันให้ลอยขึ้นและเอ่อล้นไหลออกไป จากนั้นชั่งน้ำหนักเยื่อและวิเคราะห์ค่าความชื้นเพื่อหาค่าผลผลิตเยื่อสะอาดและเม็ดหมึกคิดเป็นร้อยละ
- เตรียมแผ่นทดสอบด้วยอุปกรณ์ทำแผ่นมาตรฐาน แผ่นทดสอบมีขนาดพื้นที่ 200 ตร.ซม. และมีน้ำหนักมาตรฐาน (Basis weight) 60 กรัมต่อตารางเมตร (g/m^2)
- การทดสอบสมบัติทางกายภาพของเยื่อในสภาวะการทดสอบที่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์คงที่ 65 ± 2% อุณหภูมิ 27 ± 1°c ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานสากล ISO 1977 และมีรายการทดสอบ ดังนี้

● ความขาวสว่าง (Brightness) เป็นการทดสอบความขาวของกระดาษวัดเป็นร้อยละ

● น้ำหนักมาตรฐาน (Basis weigh) มีหน่วยเป็นกรัมต่อตารางเมตร

● ดัชนีความต้านแรงดันทะลุ (Burst Index) มีหน่วยเป็นกิโลพาสคัล.ตารางเมตรต่อกรัม ($kPa.m^2/g$)

ฯลฯ

- การเตรียมแผ่นสำหรับวิเคราะห์จำนวนเม็ดหมึกตกค้างในเยื่อ เตรียมเช่นเดียวกับการทำแผ่นทดสอบขนาดพื้นที่ 200 ตารางเซนติเมตร โดยให้มีน้ำหนักมาตรฐานของกระดาษคิดเป็น 20 กรัมต่อตารางเมตร
- การวิเคราะห์จำนวนเม็ดหมึกตกค้างในเยื่อ วิเคราะห์หาจำนวนเม็ดหมึกพิมพ์ตกค้างและค่า f factor ได้จากเครื่อง Image Analyzer โดยใช้ program Pc_Image VGA วัดค่าจำนวนเม็ดหมึกตกค้างในเยื่อ (Particle no.) และอ่านค่า f factor รายงานผล

ผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยการใช้เอนไซม์กำจัดหมึกพิมพ์จากเศษกระดาษได้ทดลองผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดิบขึ้นเองจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cellulomonase spp.* รา สายพันธุ์ *Trichoderma reesei* และ *Trichoderma viridae* ผลการทดลองสามารถปรับปรุงให้เชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma viridae* ที่มีอัตราการเจริญเติบโตให้ผลผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดิบปริมาณสูงได้เป็นผลดีที่สุด ในระยะเวลา 10-12 วัน ได้เอนไซม์ปริมาณสูง ที่คิดเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์ Fpase 0.05 IU/ml เมื่อนำไปผลิตเป็นเอนไซม์เข้มข้นลักษณะสำเร็จรูปสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์ขึ้นได้เป็น 4.2 - 5.99 IU/ml และพบว่ามีค่าความเสถียรขณะเก็บรักษาไม่เกินร้อยละ 10 ในระยะเวลา 3 เดือน เมื่อนำเอนไซม์เซลลูเลสดิบเข้มข้นฯ ผลิตเองไปทดลองใช้กำจัดหมึกพิมพ์จากเศษกระดาษถ่ายสำเนา พบว่าใช้กำจัดหมึกได้ผลดีระดับหนึ่ง แต่

ผลการทดลองยังไม่น่าพอใจ เช่น เมื่อใช้เอนไซม์เซลลูเลสดิบเข้มข้นฯ ผลิตเอง ปริมาณ คิดเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์รวมทั้งหมด 84 Units จะได้เยื่อหลังการกำจัดหมึก มีค่าความขาวสว่างร้อยละ 88.18 ค่าจำนวนเม็ดหมึกตกค้าง 5134 จุด และสมบัติทางกายภาพ เช่น Burst Index 1.10 kPa.m^2/g ซึ่งดีกว่าของเยื่อตัวอย่างควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ผลโดยรวมยังด้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อที่ใช้เอนไซม์เซลลูเลสบริสุทธิ์ที่ซื้อจากต่างประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตัวอย่าง cellulase	ปริมาณเม็ดหมึก	ค่า Brightness
Blank	16091	85.04
Sigma (เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ซื้อจากต่างประเทศ)	3848	88.09
Cellucast (เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ซื้อจากต่างประเทศ)	3441	87.92
Celluzyme (เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ซื้อจากต่างประเทศ)	5443	86.09
Crude (เอนไซม์เซลลูเลสดิบที่ผลิตเอง)	5134	88.18
Crude 2 (เอนไซม์เซลลูเลสดิบที่ผลิตเอง)	4144	87.97

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณเม็ดหมึกพิมพ์ตกค้างในเยื่อ และค่าความขาวสว่างของเยื่อที่ใช้และไม่ใช้เอนไซม์กำจัดหมึก

สำหรับการกำจัดหมึกออกจากเศษกระดาษเมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์เซลลูเลสดิบ ที่ผลิตเองกับเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ซื้อจากต่างประเทศ และรวมทั้งเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม พบว่าได้ผลไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าเอนไซม์เหล่านี้จะสามารถกำจัดหมึกได้ในระดับหนึ่ง แต่ควรมีการหาค่าความจำเพาะของเอนไซม์ (specificity) ต่อการใช้งานภายใต้สภาวะที่ต้องการด้วย

วิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องด้วยการประสบกับปัญหาที่เกิดจากสายพันธุ์ของเชื้อราทั้ง Trichoderma viridae TISTR 3160 และ Trichoderma reesei TISTR 3080 ที่ซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เพาะเลี้ยงแล้วเติบโตดี แต่ไม่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส หรือผลิตก็จริงแต่ว่าปริมาณต่ำมาก และมีปริมาณไม่คงที่ จึงแก้ปัญหาโดยการจัดหามาใหม่จาก บริษัท MIRCEN จัดว่าเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน ผู้ดูแลเชื้อได้นำออกมาจากการเก็บรักษาภายใต้ไนโตรเจนเหลวโดยตรง อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะเป็น type strain ก็ตามพบว่าสายพันธุ์มีลักษณะการเจริญและการสร้างสปอร์ในอาหารแข็งที่ไม่คงที่ ทำให้มีผลต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสคือการผลิตในแต่ละครั้งได้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จากการสอบถามจากผู้ที่เคยทำการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้เชื้อสายพันธุ์นี้ก็พบปัญหาเช่นเดียวกัน หากทำการแก้ไขโดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยเทคนิคทาง mutation หรือการทำ genetic engineering นั้นจะยุ่งยากและใช้เวลามาก การแก้ไขปัญหาที่ดีที่สุดขณะนี้คือ ให้เตรียมหัวเชื้อในรูปของสปอร์ (spore) ไว้เป็นจำนวนมาก หากหัวเชื้อ lot ใดดีก็ทำเป็น stock เก็บไว้แล้วนำออกใช้ผลิตเอนไซม์แต่ละครั้งต่อ ๆ ไป

ปัญหาที่ประสบและยุ่งยากอีกปัญหาหนึ่งคือการทำเอนไซม์เข้มข้นลักษณะสำเร็จรูป พบว่า ultrafiltration โดยใช้ระบบ dialysis bag ที่มีอยู่ก็ทำไม่ได้ด้วยแผ่น membrane filter มี cellulose เป็นองค์ประกอบไม่สามารถนำมาใช้ในการเตรียมเอนไซม์เซลลูเลสเข้มข้นได้ การแก้ปัญหาในข้อนี้ทำได้โดยการใช้ ultrafiltration ในระบบแบบ tangential flow filtration (TTF) เพราะมีความสะดวกในการใช้งานและสามารถใช้เตรียมเอนไซม์ได้ครั้งละมากขึ้น แต่ก็ยังมีข้อจำกัดที่ขนาดของอุปกรณ์ TTF ที่ใช้ทดลองมีขนาดเล็กเป็นแบบใช้ในห้องปฏิบัติการ การเตรียมเอนไซม์เข้มข้นที่จะใช้งานกำจัดหมึกพิมพ์ฯ จึงต้องใช้เวลามาก อีกทั้งผลิตได้ครั้งละปริมาณน้อย ๆ ไม่พอเพียงต่อการนำไปใช้งานกำจัดหมึกแต่ละครั้ง ๆ ได้

เอกสารอ้างอิง

Clarke, A.J. **Biodegradation of cellulose : enzymology and biotechnology**. Basel : Technomic Pub, 1997.

Godfrey, T and West, S. **Industrials enzymology**. 2nd ed. Basingstoke : Stockton Press, 1997.

Jefries, T.W ; Klungness, J.H. and Coworker. Comparison of enzyme-enhanced with Conventional deink of xerographic and laser printed paper. **Tappi Journal**, April, 1994, vol. 77, no.4, p. 173 -179.

Pasad, D.Y. Enzymatic deink of layer and xerographic office waste. **Appita**, April, 1993, vol. 46, no. 4, p. 289 - 292.

Pelach, M.A, et al. Enzymic deinking of old newspapers with cellulase. **Process Biochemistry**, 2002, vol 38, p. 1063 -1067.