

การคัดกรองจุลินทรีย์แอโรบิกไฟโบรไลติกเพื่อใช้ผลิตกลูโคส จากขยะประเภทกระดาษ

ประภาวรรณ ผลอินทร์ และ ชลธิชา เพิ่มรุ่งเรือง
โรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาภรณราชวิทยาลัย ลพบุรี
216 หมู่ 1 ตำบลห้วยโป่ง อำเภอโคกสำโรง จังหวัดลพบุรี 15120
อีเมลล์: Prapajava@gmail.com

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีขยะประเภทกระดาษจำนวนมาก โดยกระดาษมีเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ดังนั้นจึงสามารถใช้ กระดาษเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตกลูโคสได้ จุลินทรีย์แอโรบิกไฟโบรไลติกสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสำหรับการย่อยเซลลูโลสเป็นน้ำตาลกลูโคส โครงการนี้ได้เก็บตัวอย่างจากธรรมชาติมาหาแหล่ง ได้แก่ น้ำในแม่น้ำ น้ำในนา ดินโคลนในสวน มูลวัวแห้งและมูลวัวสด และบ่มเพาะเชื้อ ด้วยกระดาษกรองเซลลูโลส ผลปรากฏว่ากระดาษกรองในสารละลายมูลวัวแห้งและมูลวัวสดถูกย่อย สรุปลงได้ว่าในมูลวัวแห้งและมูลวัวสดมีจุลินทรีย์ในกลุ่มแอโรบิกไฟโบรไลติก ต่อมานำกระดาษกรองที่ย่อยแล้วไปใส่ในสารละลายมูลวัวแห้งและมูลวัวสดซึ่งผ่านการต้มแล้ว และใส่กระดาษกรองและเศษกระดาษแล้วนำมาบ่ม ผลปรากฏว่าเศษกระดาษก็ถูกย่อยเช่นกัน และเมื่อทดสอบกลูโคสโดยใช้สารละลายเบเนดิกต์แสดงให้เห็นว่ามีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้น

คำสำคัญ จุลินทรีย์แอโรบิกไฟโบรไลติก เซลลูโลส มูลวัว ขยะประเภทกระดาษ

1. บทนำ

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ประกอบด้วยกลูโคส น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) จำนวนหลายโมเลกุลมาเชื่อมต่อกัน จึงสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตกลูโคส เซลลูโลส เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช (cell wall) ช่วยให้พืชตั้งตรงและแข็งแรง เซลลูโลสจัดเป็นเส้นใยอาหาร (dietary fiber) ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ และมีความทนทานต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์กระเพาะเดี่ยวสามารถนำมาทำเครื่องนุ่งห่ม และกระดาษประเภทต่างๆ

ปริมาณการผลิตเอทานอล คาดว่ามีแนวโน้มสูงขึ้น เนื่องจากปริมาณการใช้สอยที่เพิ่มขึ้น ซึ่งวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลมีมูลค่าที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้โอกาสในการได้รับเอทานอลในราคาที่ต่ำมีโอกาสน้อยลง ซึ่งปัจจุบันมีขยะประเภทกระดาษเหลือทิ้งหลังจากการใช้งานเป็นจำนวนมาก ขยะประเภท

กระดาษมีเซลลูโลสที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกลูโคส

จุลินทรีย์ ประเภท แอโรบิกไฟโบรไลติก (aerobic fibrolytic microorganisms) หรือจุลินทรีย์ย่อยเยื่อใย สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เพื่อย่อยเซลลูโลส (รูป 1) และได้น้ำตาลกลูโคส สายพันธุ์ของเซลลูเลส จำแนกได้ดังนี้ Paenibacillus sp., Bacillus sp. และ Aeromonas sp. ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ Paenibacillus sp. มีศักยภาพสูงใน

แป้ง $\xrightarrow{\text{เอนไซม์}}$ กลูโคส $\xrightarrow{\text{ยีสต์}}$ เอทานอล + คาร์บอนไดออกไซด์

ขยะกระดาษ (เซลลูโลส) $\xrightarrow{\text{เซลลูเลส}}$ กลูโคส $\xrightarrow{\text{ยีสต์}}$ เอทานอล + คาร์บอนไดออกไซด์

รูปที่ 1. กระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้กลูโคสที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยเศษกระดาษ(เซลลูโลส)โดยเซลลูเลส

การผลิตเซลล์สูงสุด (Islam, 2018) ซึ่งในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์ประเภทแอโรบิกไฟโบรไลติกหลายชนิด เช่น เชื้อราแบคทีเรียแอคติโนมัยซีส (actinomycetes) (อรพรรณ, 2012)

ทิพย์นภา และ คณะ (2013) พบแบคทีเรีย 26 ไอโซเลต แอคติโนมัยซีส 4 ไอโซเลตและเชื้อรา (fungus) 1 ไอโซเลต จากการคัดแยกจุลินทรีย์เซลล์ไลโอไลติก (cellulolytic) แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืชจากฟิลเลอร์เค้กและน้ำกากส่าจากโรงกลั่นเหล้า Saraswati และคณะ (2012) ได้แสดงให้เห็นว่า เซลลูเลสจากมูลวัวมีคุณภาพดีกว่า เมื่อเทียบกับเซลล์จากแหล่งอื่น ๆ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบสารละลายจากตัวอย่างจากธรรมชาติ เพื่อศึกษาสารละลายที่มีเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยได้ดีที่สุด และนำไปใช้ในการย่อย ขยะกระดาษหรือขยะที่มีเยื่อใยเซลลูโลส เพื่อให้ได้กลูโคส และนำไปผลิตเอทานอล โดยจุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้คือการลดต้นทุนการผลิตเอทานอลและเพิ่มทางเลือกในการผลิตให้มากขึ้นนั่นเอง

2. วิธีการทดลอง

การบ่มเชื้อจุลินทรีย์

นำอุปกรณ์ที่ต้องการใช้งานมาฆ่าเชื้อ และเตรียมกระดาษกรองเซลลูโลส 100% ทำการบ่มเชื้อจุลินทรีย์ จากตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติ ห้าแหล่ง ได้แก่ น้ำในแม่น้ำ น้ำในนา ดินโคลนจากสวนมูลวัวสด และ มูลวัวแห้ง ในปริมาณ 40 mL โดยเจือจางด้วยน้ำต้มฆ่าเชื้อ 10 mL ใส่ลงในขวด พร้อมกระดาษกรองเซลลูโลส 100% หนัก 0.085 กรัม (3

ซ้ำ) จากนั้นบ่มเชื้อ จนกว่าจะพบว่ากระดาษกรองถูกย่อย โดยสังเกตการเปื่อยย่อยของกระดาษ และชุดทดลองควบคุม (Negative control) โดยนำตัวอย่างไปต้มฆ่าเชื้อและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์แอโรบิกไฟโบรไลติก

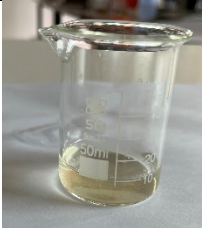
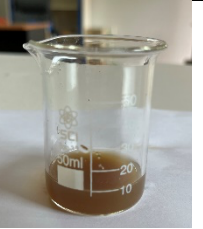
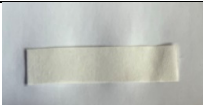
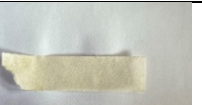
นำกระดาษกรองที่ถูกย่อยแล้ว ในแต่ละขวดใส่ในสารละลายมูลวัวแห้ง และมูลวัวสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการต้มแล้ว แทนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่กระดาษกรองเซลลูโลส 100% ลงไปและบ่มเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมง (3 ซ้ำ) สังเกตการย่อยสลายของกระดาษ โดยดูจากการย่อย และเกิดการตะกอนของกระดาษในขวด

การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเศษกระดาษ

เลี้ยงจุลินทรีย์แอโรบิกไฟโบรไลติก ที่เกิดจากการย่อยสลายของกระดาษเซลลูโลส โดยสารละลายมูลวัวแห้ง ด้วยการนำเศษกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในขวด แล้วบ่มอีกครั้ง สังเกตการย่อยของกระดาษ จากนั้นนำสารละลาย ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มาตรวจสอบหากลูโคสโดยการทดสอบเบเนดิกต์

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

รูปที่ 2 แสดงผลจากการบ่มเชื้อจากห้าตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติที่ จากรูปถ่ายแถบบนแสดงให้เห็นว่าเกิดการตะกอนในขวดใส่มูลวัวแห้ง และ มูลวัวสด อย่างเดียว จากรูปถ่ายแถบล่างได้สังเกตการย่อยของกระดาษที่ใส่ในขวดใส่มูลวัวแห้งและมูลวัวสด ซึ่งสรุปได้ว่า ในสารละลายของน้ำในแม่น้ำ น้ำในนา และดิน

น้ำในแม่น้ำ	น้ำในนา	ดิน	มูลวัวแห้ง	มูลวัวเปียก
				
				

รูปที่ 2 การย่อยกระดาษกรองเซลลูโลสในสารละลายตัวอย่างจากธรรมชาติ

	น้ำในแม่น้ำ	น้ำในนา	ดิน	มูลวัวแห้ง	มูลวัวเปียก
ก่อนบ่ม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	น้อย 	น้อย 
หลังบ่ม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	มาก 	มาก 
หลังการ เพาะเลี้ยงเชื้อ	ไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ			มาก 	มาก 

รูปที่ 3 ผลการทดสอบกลูโคสด้วยเบนดิคซ์

โคลนในสวน กระจาดกรองเซลลูโลสไม่ถูกย่อย แต่ในสารละลายมูลวัวแห้ง และมูลวัวสด กระจาดกรองเซลลูโลสถูกย่อย สรุปได้ว่า ในตัวอย่างสารละลายมูลวัวแห้ง และสารละลายมูลวัวสด มีจุลินทรีย์แอโรบิกไฟโบรไลติก แต่ในตัวอย่างสารละลายที่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อไม่ได้ถูกย่อย

ขั้นตอน ต่อมา ทำการเพาะเชื้อ ผลแสดงว่า กระจาดถูกย่อย ในขั้นตอน สุดท้ายทำการตรวจสอบน้ำตาลกลูโคส ด้วยการทดสอบด้วยเบนดิคซ์ทุกสภาวะการย่อยของกระจาด (รูปที่ 3) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเบนดิคซ์ของมูลวัวแห้ง และมูลวัวสดก่อนการบ่มเชื้อ และหลังการบ่มเชื้อ ได้ผลเป็นสีเขียวที่มีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งในมูลวัวแห้ง และมูลวัวสดก่อนการบ่มเชื้อจะมีกลูโคสที่เกิดจากการย่อยอาหารของวัว ทำให้เมื่อนำมาทดสอบกับสารละลายเบนดิคซ์ จะพบว่ามีสีเขียวย่อนเกิดขึ้น หลังจากการบ่ม จุลินทรีย์ไฟโบรไลติกมีการเจริญเติบโต ทำให้เมื่อทดสอบเบนดิคซ์ ให้ผลเป็นบวกที่มีสีเขียวย่นขึ้น แต่ในสารละลายของน้ำในแม่น้ำ น้ำในนา และดินโคลนในสวน ให้ผล

เป็นลบ ทำให้ทราบว่าในสารละลายมูลวัวแห้ง และมูลวัวสดมีกลูโคสอยู่ในสารละลายผลจากการศึกษา พบว่าสามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ แอโรบิกไฟโบรไลติกในมูลวัวสด และมูลวัวแห้ง ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส นำมาย่อยเซลลูโลสของกระจาดเหลือทิ้ง เป็นกลูโคส เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นเพียงการคัดกรองจุลินทรีย์ประเภทแอโรบิกไฟโบรไลติก เท่านั้นซึ่งในอนาคต หากใช้เพื่อการผลิตกลูโคส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม ขนาดใหญ่ จำเป็นต้องแยกและเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากเฉพาะเอนไซม์สำหรับย่อยกลูโคสเท่านั้น

4. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลอง กระจาดกรอง เซลลูโลสในตัวอย่างทั้งห้า ได้แก่ น้ำในแม่น้ำ น้ำในนา ดินโคลนในสวน มูลวัวแห้ง และมูลวัวสด ได้ผลลัพธ์ดังนี้ น้ำในแม่น้ำและนา และสารละลายดินโคลนไม่เกิดการย่อยสลาย แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งสามนี้ไม่มีจุลินทรีย์แอโรบิกไฟโบรไลติก แต่ในส่วนของ กระจาดกรองเซลลูโลส ในสารละลายมูลวัวแห้ง และมูลวัวสด นั้นถูกย่อยแสดงให้เห็นว่าทั้งสองอย่างนี้ มีจุลินทรีย์ แอโรบิกไฟโบรไลติก และเมื่อนำ กระจาดกรอง ที่ถูกย่อยแล้วไปใส่สารละลาย มูลวัวแห้ง และมูลวัวสด ซึ่งผ่านการต้มฆ่าเชื้อผลปรากฏว่าเศษกระจาด ย่อยสลายและเมื่อนำผลลัพธ์ที่ได้ไปทดสอบหาน้ำตาลกลูโคสพบว่าผลการทดสอบเป็นบวก

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารละลายจากมูลวัวสด และมูลวัวแห้ง สามารถนำมาใช้ย่อยขยะประเภทกระจาดที่เหลือทิ้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อลดต้นทุนวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล เพิ่มมูลค่าและลดปริมาณขยะประเภทกระจาด

5. เอกสารอ้างอิง

- ทิพย์นภา วงษ์คุณ, โสภณ บุญลือ และ นันทวัน ฤทธิเดช. (2013). การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวาน (*Zeamays* L. var. *sacchata*). วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวชิราวุธวิทยาลัย. 41(4) 954-966.
- อรพรรณ เสี่ยงเกษม. (2022). การคัดแยกและศึกษาลักษณะบางประการของ แบคทีเรียย่อยเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก. รายงานปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Bai, S., Kumar, M.R., Mukesh Kumar, D.J., Balashanmugam, P., Kumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T. (2012). Cellulase production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung. Archives of Applied Science Research, 4 (1):269-279
- Islam, F., Roy, N. (2018). Screening, purification and characterization of cellulase from cellulase producing bacteria in molasses. BMC Research Notes 11, 445. DOI: 10.1186/s13104-018-3558-4.

Madhu. (2019). Difference Between Cellobiose and Cellulose, Retrieved from <https://www.differencebetween.com>

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์อรรทัย ลำสัน โรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาภรณราชวิทยาลัย ลพบุรี คุณอรพรรณ เสี่ยงเกษม เทคโนโลยีชีวภาพจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รศ.ดร.สุริยา สะวานนท์ ปริญญาเอก ศาสตราจารย์ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตร กำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ ดร. Yasuo Kobayashi ศาสตราจารย์ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรมหาวิทยาลัยฮอกไกโด สำหรับการคำปรึกษาและความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สัตวศาสตร์ภาควิชาเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่ได้ช่วยเหลือให้ข้อมูล และขอขอบคุณ รองอธิการบดี เอ็ม สกิต รองผู้อำนวยการกลุ่มบริหารวิชาโรงเรียนวิทยาศาสตร์จุฬาภรณราชวิทยาลัย ลพบุรี ที่ช่วยติดต่อประสานงาน