บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การเตรียมปาเปน (crude enzyme)

ดัดแปลงจากวิธีของ ทวีศักดิ์ วุฒิเวียงธรรม (2536)

เนื่องจากยางมะละกอที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนแข็ง เพื่อความสะดวกในการนำมาใช้ จึงทำการเตรียมยางมะละกอให้อยู่ในรูปของผงละเอียด โดยวิธีการนำก้อนยางมะละกอมาละลายด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 คนให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปอบในตู้อบสุญญากาศ อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6-8 ชั่วโมง บดยางมะละกอแห้งให้เป็นผงละเอียด แล้วเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต

1. การวัดแอคติวิตีของปาเปนอิสระ

ดัดแปลงจากวิธีของ FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1981) (การเตรียมสารละลายดูภาคผนวก ก)

บ่มสารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายปาเปน 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 30 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรแอซีติก 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที นำสารละลายไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 xg เป็นเวลา 10 นาที

แยกเฉพาะส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

หลอดควบคุม (control) เติมทุกอย่างเหมือนกันแต่ใส่เอนไซม์ภายหลังการเติมกรดไตรคลอโรแอซีติก

2. การวัดแอคติวิตีของปาเปนตริงรูป

ดัดแปลงจากวิธีของ Ghayal และ Joshi (1983)

ชั่งปาเปนตริงรูป 0.5 กรัม (น้ำหนักเปียก) เติมสารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว แยกปาเปนตริงรูปออกจากสารละลาย หยุดปฏิกิริยาด้วย 30 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอแอซีติก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที นาสารละลายไปปั่นและวัดค่าการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกับปาเปนอิสระ

หลอดควบคุมให้ใช้ทรายที่ไม่ได้ผ่านการตริงรูปแทนปาเปนตริงรูป

กำหนดให้ 1 หน่วยปาเปน (casein digestion unit = CDU) หมายถึง ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ทำการทดลองโดยเปรียบเทียบเป็นไมโครกรัมของไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

การวัดปริมาณโปรตีนที่ติดบนทราย

ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry (1951) (การเตรียมสารละลายดูได้จากภาคผนวก ง)

การหาปริมาณโปรตีนที่ติดบนทรายหาได้จาก ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของสารละลาย

เอนไซม์ก่อนการตริง จากนั้นจึงหาปริมาณโปรตีนที่เหลือของสารละลายเอนไซม์หลังการตริง ปริมาณโปรตีนที่ติดบนทรายคำนวณได้จากปริมาณโปรตีนเริ่มต้นหักออกจากปริมาณโปรตีนที่เหลือ

ใช้ตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (สารละลาย C) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เติมฟีนอลรีเอเจนต์ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA)

ขั้นตอนการเตรียมทราย

ดัดแปลงจากวิธีของ Puvanakrishnan และ Bose (1980)

1. การคัดขนาดทราย

นำทรายมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปร่อนแยกขนาดด้วยเครื่องคัดขนาด ขนาดของทรายที่คัดแยกได้คือ 40-60, 60-80, และ 80-120 เมช (mesh)

2. การล้างทราย

นำทรายแต่ละขนาด แช่ในกรดไนทริกเข้มข้นนาน 48 ชั่วโมง แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำ การตรวจสอบว่ามีกรดหลงเหลืออยู่ในทรายหรือไม่ สามารถทำได้โดยการวัด pH ของน้ำ ถ้าไม่มีกรดหลงเหลืออยู่ pH ของน้ำขณะที่ใช้ล้างทรายจะต้องเท่ากับ pH ของน้ำก่อนนำมาใช้ จากนั้นจึงอบทรายให้แห้งที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการตริงเอนไซม์บนทราย

ดัดแปลงจากวิธีของ Puvanakrishnan และ Bose (1980)

1. การกระตุ้นทราย

วิธีที่ใช้ในการกระตุ้นทราย มีอยู่ 3 วิธีที่แตกต่างกัน คือ

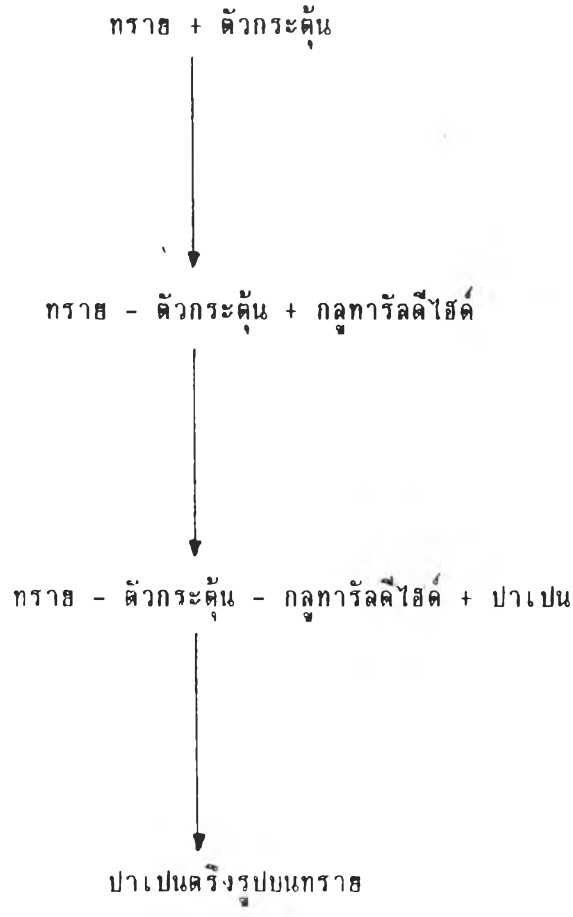
วิธีที่ 1 แช่ทรายในสารละลาย 2 เปอร์เซ็นต์ aminopropyltriethoxysilane (APTS 2 มล.+ Acetone 98 มล.) ในอัตราส่วนทราย : สารละลาย APTS = 5 กรัม : 10 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างทรายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

วิธีที่ 2 แช่ทรายในสารละลาย melamine (MM 0.25 กรัม + 10 มล. 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8) ในอัตราส่วน ทราย : สารละลาย MM = 5 กรัม : 10 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

วิธีที่ 3 แช่ทรายในสารละลาย hexamethylenetetramin (HMT 2 เปอร์เซ็นต์ 5 มล.+ 15 มล. 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8) ในอัตราส่วนทราย : สารละลาย HMT = 5 กรัม : 10 มิลลิลิตร กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างทรายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

2. การคริงเอนไซม์

นำทรายที่ถูกกระตุ้นแล้วจำนวน 5 กรัม มาเติม 20 มิลลิลิตร ของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ (กลูทารัลดีไฮด์ 25 เปอร์เซ็นต์ 2 มล. + 18 มล. 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8) กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นผสมทรายกับสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ทำการคริงเอนไซม์เป็นเวลา 120 นาที โดยกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง แยกทรายออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง (ขั้นตอนการคริงปาเปนบนทรายดังแสดงในรูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการตรึงปาเปนบนทราย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการดริงเอนไซม์ปาเปนโดยใช้ melamine เป็นตัวกระตุ้นทราย (MM เป็นตัวกระตุ้นที่เหมาะสมที่ได้จากการผลทดลอง)

1. ศึกษาขนาดของทราย

โดยการแปรผันขนาดของทราย 3 ขนาด คือ 40-60 60-80 และ 80-120 เมช นำทรายแต่ละขนาดจำนวน 5 กรัม มาแช่ในสารละลาย MM 10 มิลลิลิตร (MM 0.25 กรัม + 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8) กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นนำมาเติม 20 มิลลิลิตรของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25 เปอร์เซ็นต์ (กลูทารัลดีไฮด์ 25 เปอร์เซ็นต์ 2 มล. + 18 มล. 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8) กวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างทรายด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ผสมทรายกับสารละลายเอนไซม์ปาเปน 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ประกอบไปด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ซีสเตอีน และ 10 มิลลิโมลาร์ EDTA (เมื่อกำหนดให้ความเข้มข้นของเอนไซม์คงที่ มีค่าประมาณ 60 CDU/มิลลิลิตร) ทำการดริงเป็นเวลา 120 นาที โดยกวนเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแยกทรายออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

ส่วนปัจจัยตัวอื่นๆ ทำการศึกษาโดยการดริงเอนไซม์ตามภาวะมาตรฐานดังกล่าวข้างต้น แล้วแปรผันปัจจัยแต่ละตัวที่ใช้ในขั้นตอนการดริงเอนไซม์ ดังต่อไปนี้

2. ศึกษาปริมาณ MM

โดยการแปรผันปริมาณที่ใช้ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม

3. ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ MM

โดยการแปรผันเวลา 30 60 90 120 และ 150 นาที

4. ศึกษาความเข้มข้นของกลูทารัลดีไฮด์

โดยการแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายกลูทารัลดีไฮด์ คือ 1 1.25 2.5 3.75 และ 5 เปอร์เซ็นต์

5. ศึกษาเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับกลูทารัลดีไฮด์

โดยการแปรผันเวลา 15 30 60 90 และ 120 นาที

6. ศึกษา pH ของสารละลายเอนไซม์

โดยการเตรียมสารละลายเอนไซม์ปาเปนในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ คือ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 6 - 7.5 สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 7.5-9.5 และสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 9.5-10

7. ศึกษาเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์

โดยการแปรผันเวลา 30 60 90 120 150 และ 180 นาที (ทำการตรึงที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สารละลายปาเปน 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ประกอบไปด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ซีสเตอีน และ 10 มิลลิโมลาร์ EDTA เอนไซม์มีความเข้มข้น เท่ากับ 60 CDU/มิลลิลิตร)

8. ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์

โดยการแปรผันปริมาณทั้งหมดของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรึง ตั้งแต่ 100 จนถึง 900 CDU/10 มิลลิลิตร (ทำการตรึงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 นาที โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ประกอบไปด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ซีสเตอีน และ 10 มิลลิโมลาร์ EDTA)

9. ศึกษาความเข้มข้นของซีสเตอีน

โดยการแปรผันความเข้มข้นของซีสเตอีนที่เติมลงในสารละลายเอนไซม์ คือ 2 5 10 20 30 และ 40 มิลลิโมลาร์ ให้ความเข้มข้นของ EDTA เท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์ (ทำการตริงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 นาที โดยใช้สารละลายปาเปน 10 มิลลิลิตร ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่ประกอบด้วย 20 มิลลิโมลาร์ ซีสเตอีน และ 10 มิลลิโมลาร์ EDTA เอนไซม์มีความเข้มข้นเท่ากับ 60 CDU/มิลลิลิตร)

การเลือกปัจจัยที่เหมาะสมแต่ละชนิด จะทำการเลือกโดยดูจากค่าแอคติวิตีสูงสุดของปาเปนตริงรูปที่ได้

การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิ ที่มีต่อการย่อยสลายเคซีนของเอนไซม์

1. การศึกษาผลของ pH ที่มีต่อการย่อยสลายเคซีน

เตรียมสารละลายเคซีนในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ สารละลายแอซีเทรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 5.5-6 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 6-7.5 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 7.5-9.5 และสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 9.5-10 ทำการวัดแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ โดยใช้สารละลายเคซีนที่ pH ต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นเป็นซับสเทรต

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการย่อยสลายเคซีน

วัดแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ โดยใช้สารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7 เป็นซับสเทรต แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับเคซีน ในช่วง 30-90 องศาเซลเซียส (เวลาที่ใช้ในการบ่มเท่ากับ 15

นาที)

การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์

1. การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ คือ สารละลายแอซีเทรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 4-6 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 6-8 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 8-10 และสารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 10-12 นำปาเปนอิสระและปาเปนตริงรูปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมาตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลือโดยการใช้เคซีนใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

นำปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระมาบ่มในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20 30 40 50 60 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปวัดแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้สารละลายเคซีนใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต บ่มกับเอนไซม์เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ระหว่างปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ จะกำหนดให้ความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกันเสมอ คือประมาณ 50-60 CDU

การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต

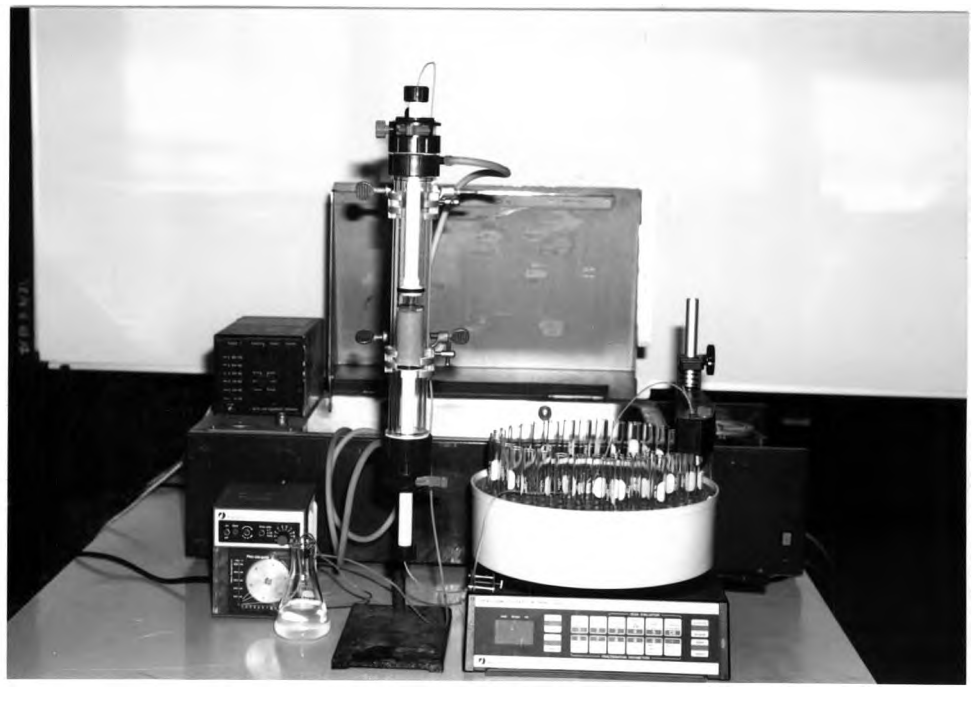
วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้เคซีนที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต แปรผันความเข้มข้นของสารละลายเคซีนให้มีค่าตั้งแต่ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (เตรียมใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7) บ่มเอนไซม์และซับสเทรตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง 1/v และ 1/[s] (Lineweaver Burk plot) แล้วคำนวณค่า K_m ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด

การศึกษาความเสถียรในการเก็บรักษาปาเปนตริงรูป

นาปาเปนตริงรูปมาเก็บรักษาในสภาวะที่แตกต่างกัน 2 สภาวะ คือ 1. เก็บรักษาปาเปนตริงรูปในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2. เก็บรักษาปาเปนตริงรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปราศจากสารละลายบัฟเฟอร์ เก็บตัวอย่างปาเปนตริงรูปมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้เคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นซับสเทรต ทุกๆ วันเป็นระยะเวลา 140 วัน

การหาความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนโดยปาเปนตริงรูปในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง

คอลัมน์ที่ใช้สำหรับศึกษาความเสถียรของปาเปนตริงรูปนั้น เป็นคอลัมน์ 2 ชั้น ชั้นในเป็นแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร ความยาว 35 เซนติเมตร (รูปที่ 3.2) ชั้นนอกเป็นพลาสติคมีท่อสำหรับต่อให้น้ำไหลผ่าน โดยสามารถควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ได้จากเครื่องควบคุมอุณหภูมิ นำปาเปนตริงรูปหนัก 40 กรัม (น้ำหนักแห้ง) มาบรรจุลงในคอลัมน์ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ใช้ เคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต โดยมีอัตราการป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำแต่ละ



รูปที่ 3.2 แสดงคอลัมน์ของปาเปนคริงรูป

แฟรคชั่นไปตกตะกอนเคซีนด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรแอซีติก วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น

การศึกษาความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนด้วยปาเปนตรึงรูปในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง

บ่มปาเปนตรึงรูปกับสารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ (ที่เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หาแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปตาม จากนั้นนำปาเปนตรึงรูปกลับมาใช้ย่อยสลายสารละลายเคซีนซ้ำอีก 4 ครั้ง วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือในแต่ละครั้งเปรียบเทียบกับแอคติวิตีที่วัดได้ในครั้งแรก

ขั้นตอนการเตรียมน้ำยางสด

1. การหาปริมาณเนื้อยางแห้ง (dry rubber content,DRC)

ทำตามวิธีของ Tillekeratne และคณะ (1987)

เทน้ำยางสดลงในจานแก้วประมาณ 20 มิลลิลิตร ทำให้ยางจับตัวเป็นก้อนด้วยกรดแอซีติก 5 เปอร์เซ็นต์ในเอธิลแอลกอฮอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ล้างชิ้นยางด้วยเอธานอลและน้ำ นำชิ้นยางไปรีดให้หนาไม่เกิน 2 มิลลิเมตร หลังจากนั้นจึงอบชิ้นยางให้แห้ง ชั่งน้ำหนักของชิ้นยางที่ได้นำไปคำนวณปริมาณเนื้อยางแห้ง (%DRC) ตามสมการข้างล่าง

$$\%DRC = W/V \times 100$$

เมื่อให้ W = น้ำหนักของชิ้นยางแห้ง (กรัม)

V = ปริมาตรของน้ำยางสดที่ใช้ (มิลลิลิตร)

I16754074

2. การเตรียมน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ (25 % DRC)

นำน้ำยางสดมากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อขจัดสิ่งสกปรกออก จากนั้นหาปริมาณเนื้อยางแห้งและเจือจางน้ำยางสดด้วยน้ำกลั่นให้ได้เนื้อยางแห้งเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH ของน้ำยางสดตามต้องการด้วยการเติม 25 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนีย หรือการระเหยแอมโมเนียออกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในแผ่นยาง

ใช้วิธี Micro-Kjeldahl (วิธีการเตรียมสารละลายดูภาคผนวก จ)

ชั่งชิ้นยางตัวอย่างหนัก 0.2-0.3 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อย เติมสารเร่งปฏิกิริยา 0.65 กรัม (K_2SO_4 : $CuSO_4.5H_2O$: SeO = 30 : 4 : 1) และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 7.5 มิลลิลิตร นำชิ้นยางไปย่อยสลายจนได้สารละลายใสสีเขียว ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายสารละลายลงในหลอดกลั่น จุ่มปลายของหลอดควบแน่นลงในฟลาสก์ที่มีสารละลายผสมของกรดบอริก (เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) 5 มิลลิลิตร น้ำ 5 มิลลิลิตร และเมทธิลเรด-บรอมกลีซอลกรีน 2 หยด เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดกลั่น ทำการกลั่นนานประมาณ 4 นาทีให้ได้สารละลาย 150 มิลลิลิตร ล้างปลายหลอดควบแน่นด้วยน้ำกลั่น นำไปไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าไนโตรเจนคำนวณได้จาก

$$\text{ไนโตรเจน (\% กรัม)} = \frac{2.8014 \times M(H_2SO_4) \times V_1(H_2SO_4) - V_2(H_2SO_4)}{\text{น้ำหนักยาง}}$$

$M(H_2SO_4)$ = ความเข้มข้นของกรดซัลฟิวริก (โมลาร์)

$V_1(H_2SO_4)$ = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไตเตรทกับสาร

ละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

$V_2(H_2SO_4)$ = ปริมาตรของกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไตเตรทกับ Blank

การเตรียมยางโปรตีนต่ำ (DPNR)

เทน้ำยาง 20 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ pH ประมาณ 8.5 ลงในบีกเกอร์ ชั่งปาเปนตริงรูปจำนวน 4 กรัม (น้ำหนักเปียก มีแอคติวิตีประมาณ 200 CDU) กวนน้ำยางและปาเปนตริงรูปด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำให้ยางจับตัวเป็นก้อนในเครื่อง autoclave เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำแผ่นยางที่ได้ไปเข้าเครื่องรีด แล้วอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ขั้นตอนการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูป แสดงในรูปที่ 3.3)

ในการศึกษาผลของปัจจัยแต่ละชนิดที่มีต่อการลดปริมาณไนโตรเจนด้วยปาเปนตริงรูป เริ่มด้วยการเตรียมยางโปรตีนต่ำตามภาวะดังกล่าวข้างต้น แล้วแปรผันปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาผลของ pH ของน้ำยางสด

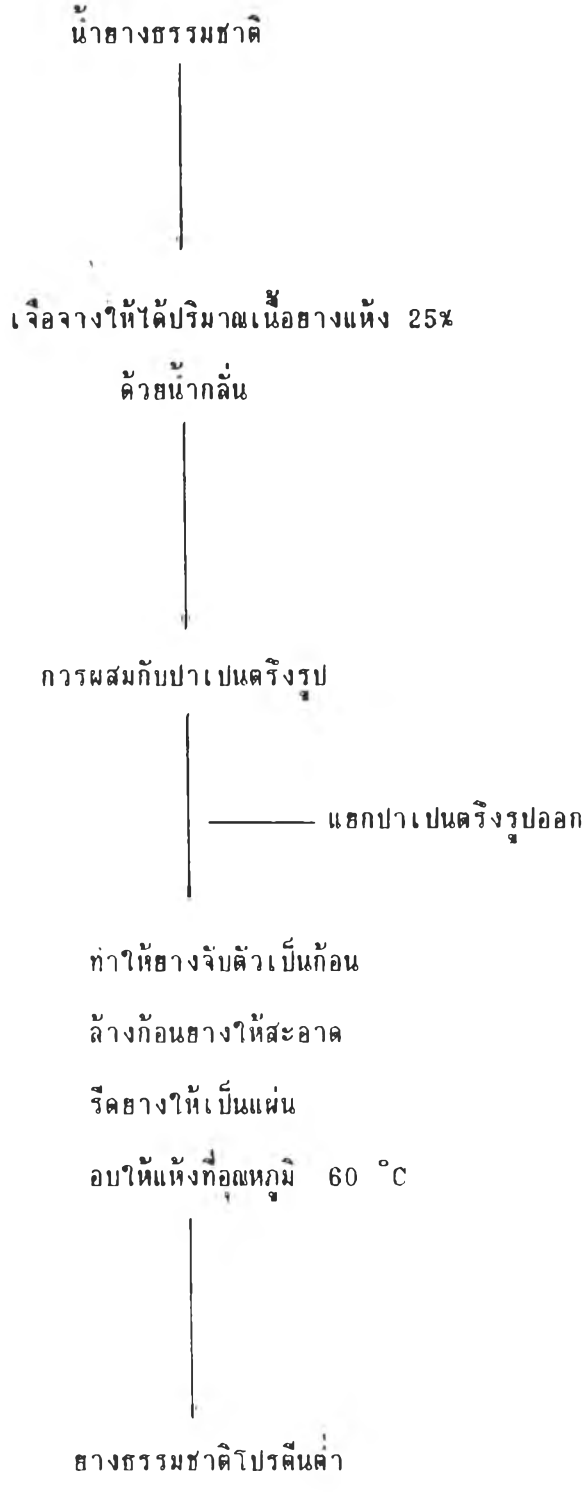
โดยการแปรผัน pH ของน้ำยางที่ใช้เตรียมยางโปรตีนต่ำ คือ pH 7-8 pH 8-9 และ pH 9-10

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการลดปริมาณไนโตรเจน

โดยการแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในขณะกวนน้ำยางกับปาเปนตริงรูป คือ 45 50 และ 60 องศาเซลเซียส

3. ศึกษาปริมาณของปาเปนตริงรูปที่สามารถลดปริมาณไนโตรเจนได้มากที่สุด

โดยการแปรผันปริมาณปาเปนตริงรูปที่ใช้ ตั้งแต่ 40 ถึง 360 CDU



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการผลิตยางธรรมชาติโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูป

การเลือกปัจจัยที่เหมาะสมแต่ละชนิด พิจารณาจากปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในยางดิบด้วยวิธี Micro-Kjeldahl โดยมียางแห้งที่เตรียมได้จากน้ำยางสด pH 8.5 เป็นตัวควบคุม

การศึกษาประสิทธิภาพการลดปริมาณโปรตีนของปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ

เตรียมยางโปรตีนต่ำ จากน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ pH 8.5 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้ปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระมีปริมาณตั้งแต่ 40-360 CDU (ปาเปนอิสระเตรียมได้จากการนำผงเอนไซม์ปาเปนมาละลายด้วยน้ำกลั่น) ปาเปนตริงรูปใช้เวลาในการลดไนโตรเจนเท่ากับ 4 ชั่วโมง ส่วนปาเปนอิสระแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ใช้เวลาในการลดไนโตรเจนเท่ากับ 2 ชั่วโมง และชุดที่ 2 ใช้เวลาในการลดไนโตรเจนเท่ากับ 4 ชั่วโมง เปรียบเทียบประสิทธิภาพของปาเปนทั้ง 2 ชนิดโดยพิจารณาจากปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในยางแห้ง เมื่อใช้ยางแห้งที่เตรียมได้จากน้ำยางสด pH 8.5 เป็นตัวควบคุม

การทดสอบสมบัติทางกายภาพของยางโปรตีนต่ำ

ทำตามวิธีของ RRIM (1970)

เตรียมยางโปรตีนต่ำ ด้วยปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 200 CDU สำหรับปาเปนตริงรูปใช้เวลาในการกวนน้ำยางกับเอนไซม์เท่ากับ 4 ชั่วโมง ส่วนปาเปนอิสระใช้เวลาเท่ากับ 2 ชั่วโมง ทำให้ยางจับตัวเป็นก้อนด้วยเครื่อง autoclave จากนั้นนำยางโปรตีนต่ำไปทดสอบสมบัติทางกายภาพต่างๆ เปรียบเทียบกับยางควบคุม

สมบัติทางกายภาพที่ทดสอบประกอบด้วย 6 ประการ ได้แก่ ปริมาณผง (Dirt) ปริมาณเถ้า (Ash) ปริมาณไนโตรเจน (Nitrogen) ปริมาณสิ่งระเหย (Volatile

matter) ค่าความอ่อนตัวเริ่มแรกและดัชนีความอ่อนตัวของยาง (P_o และ PRI -Plasticity Retention Index) และดัชนีสี (Color)

ตัวอย่างยางที่นำมาทดสอบจะต้องบดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเสียก่อน โดยใช้เครื่องบดผสมที่มีลูกกลิ้ง 2 ลูก (Laboratory two roll mill) ลูกกลิ้งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ยาว 12 นิ้ว ก่อนและตลอดเวลาการบดผสมตัวอย่างยาง ต้องทำให้ลูกกลิ้งเย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยผ่านน้ำเย็นเข้าลูกกลิ้ง ปรับช่องว่างระหว่างลูกกลิ้งทั้งสองให้ห่างกัน 0.065 นิ้ว หรือ 1.62 มิลลิเมตร

นำตัวอย่างยาง (น้ำหนักตัวอย่างประมาณ 300 กรัม) ไปผ่านลูกกลิ้งที่ปรับระยะแล้ว จำนวน 6 ครั้ง ยางที่ผ่านลูกกลิ้งออกมาแต่ละครั้งม้วนเป็นรูปทรงกระบอก ใส่ปลายข้างหนึ่งเข้าเครื่องในการบดผสมครั้งถัดๆ มา ส่วนครั้งที่ 6 รีดยางออกมาเป็นแผ่น (ไม่ต้องม้วน) เสร็จแล้วนำไปตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อทดสอบหาคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

1. <u>การทดสอบหาปริมาณผง (Dirt content)</u>

ตัดตัวอย่างยางที่บดผสมไว้แล้วนั้นมา 25-30 กรัม นำเข้ารีดกับลูกกลิ้งเย็นที่ปรับช่องห่าง 0.013 นิ้ว (0.33 มิลลิเมตร) จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำไปตัดเป็นชิ้นทดสอบให้ได้น้ำหนักแน่นอนระหว่าง 10 กรัม เสร็จแล้วทำการตัดชิ้นยางทดสอบออกเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในฟลาสก์ ชั่งเติม Mineral turpentine จำนวน 250 มิลลิลิตร และสารเคมีละลายยาง (xylyl mercaptan (36 %)) จำนวน 1 มิลลิลิตร ไว้ก่อนแล้ว นำฟลาสก์ขึ้นตั้งไฟ (ความร้อนจากหลอดไฟอินฟราเร็ด) ให้ได้อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ยางจะละลายหมด

เมื่อยางละลายหมด นำสารละลายที่ร้อนเทผ่านตัวกรองที่สะอาด แห้ง และทราบน้ำหนักก่อนแล้ว เสร็จแล้วนำตัวกรองพร้อมผง อบแห้งในตู้อบ ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 90-100

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน Desicator และชั่งให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

$$\text{Dirt (\%)} = \frac{(B-A) \times 100}{W}$$

เมื่อ A = น้ำหนักตัวกรองเปล่า

B = น้ำหนักตัวกรอง + ผง

W = น้ำหนักชิ้นทดสอบ

2. การทดสอบหาปริมาณสิ่งระเหย (Volatile matter)

คัดตัวอย่างยางมา 10 กรัม ชั่งให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม แล้วนำไปผ่านเครื่องรีดเย็นซึ่งมีช่องว่าง 0.02 นิ้ว (หรือ 0.51 มิลลิเมตร) วางตัวอย่างลงในถาดอลูมิเนียมนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง จึงนำยางออกจากตู้อบทีละถาด นำยางแต่ละชิ้นใส่ถุงพลาสติก ปล่อยชิ้นยางในถุงพลาสติกให้เย็น ซึ่งใช้เวลาราว 30 นาที แล้วนำไปชั่งให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

$$\text{V.M. (\%)} = \left[\frac{(A - B)}{A}\right] + \left[\frac{(C - D)}{C}\right] \times 100$$

เมื่อ A = น้ำหนักตัวอย่างยางก่อนบดผสม

B = น้ำหนักตัวอย่างยางหลังบดผสม

C = น้ำหนักชิ้นยางทดสอบก่อนอบแห้ง

D = น้ำหนักชิ้นยางทดสอบหลังอบแห้ง

3. การทดสอบหาปริมาณเถ้า (Ash content)

ตัดยางจากตัวอย่างที่บดผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนั้น นำมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 5 กรัม ห่อชิ้นยางทดสอบด้วยกระดาษกรองใส่ใน crucible ที่ทราบน้ำหนัก แล้วนำ crucible และยางเข้าเผาใน Muffle furnace ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งหมดคาร์บอน (ใช้เวลาประมาณ 2 - 4 ชั่วโมง) เมื่อเผายางจนเปลี่ยนเป็นเถ้าสมบูรณ์แล้วนำไปทำให้เย็นใน Desicator แล้วชั่งให้ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม

$$\text{Ash (\%)} = \frac{(B - A) \times 100}{W}$$

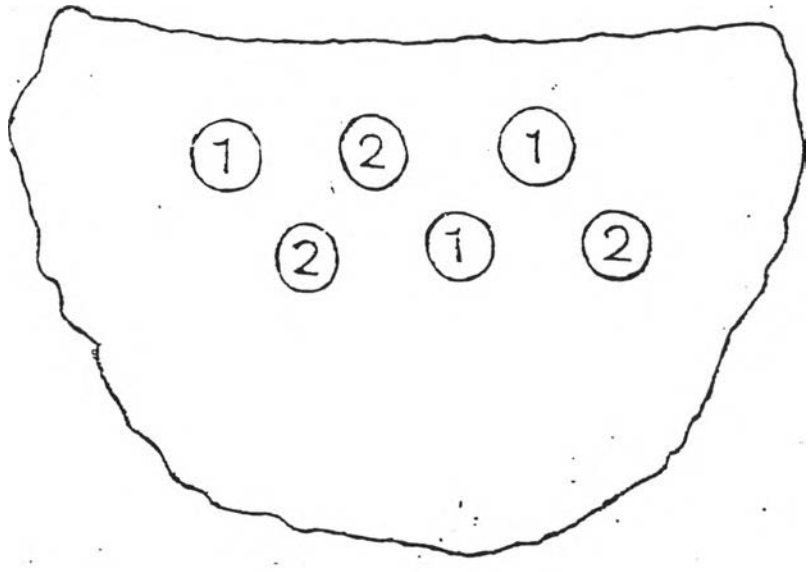
เมื่อ A = น้ำหนัก crucible

B = น้ำหนัก crucible + เถ้า

W = น้ำหนักชิ้นทดสอบ

4. การทดสอบหาค่าดัชนีความอ่อนตัวของยาง (PRI-Plasticity Retention Index)

ตัดตัวอย่างยางจากที่บดผสมแล้ว จำนวน 20 กรัม นำไปผ่านเครื่องบดเย็นที่ปรับช่องว่างระหว่างลูกกลิ้งไว้แล้ว 1.65 มิลลิเมตร ผ่าน 2 ครั้ง แล้วพับสองโดยกดเบาๆ จะต้องได้ความหนาของชิ้นทดสอบระหว่าง 3.2 - 3.6 มิลลิเมตร เจาะตัวอย่างยางตามรูป



ตัวอย่าง 1 นาไปหาค่า Plasticity โดยไม่อบ (P_o)

ตัวอย่าง 2 นาไปหาค่า Plasticity หลังจากอบแล้ว (P_{30})

นาชิ้นทดสอบเข้าตู้อบ อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นทดสอบออก แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จึงนาไปหาค่า Plasticity ต่อไป

ก่อนนำชิ้นทดสอบไปหาค่า Plasticity ด้วยเครื่อง Wallace Rapid Plastimeter ชิ้นทดสอบจะต้องปิดบนและล่างด้วยกระดาษมวนบุหรี่ก่อนเข้าเครื่อง

$$PRI = \frac{(P_{30} \times 100)}{P_o}$$

PRI = Plasticity Retention Index

P_o = ค่ามัธยฐานของค่า Plasticity ของยางที่ไม่อบ

P_{oo} = ค่ามัธยฐานของค่า Plasticity ของยางที่อบแล้ว

5. การทดสอบวัดดัชนีสี (Color index determination)

คัดตัวอย่างยางจากที่บดผสมแล้ว จำนวน 20 กรัม นำไปผ่านเครื่องบดเย็นที่ปรับช่องว่างระหว่างลูกกลิ้งไว้แล้ว 1.65 มิลลิเมตร ผ่าน 2 ครั้ง แล้วพับสองโดยกดเบาๆ จะต้องได้ความหนาของชิ้นทดสอบระหว่าง 3.2 - 3.6 มิลลิเมตร เจาะตัวอย่างโดยใช้ Wallace punch จำนวน 2 ชิ้น และนำชิ้นทดสอบ 2 ชิ้นนี้มาประกบกัน นำชิ้นทดสอบวางลงในแบบพิมพ์ประกบแบบพิมพ์ด้วยแผ่น polyester หรือ cellulose film แล้วจึงประกบด้วยแผ่น stainless หรืออลูมิเนียม นำแบบพิมพ์เข้าเครื่องอัด (Hydraulic press) ที่ความดัน 500 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นทดสอบไปเปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน Lovibond

การผลิตยางโปรตีนต่ำจากน้ำยางที่ผ่านการปั่นแยก (centrifugation)

นำน้ำยางสดมาปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแรงเหวี่ยงสูงที่อุณหภูมิต่ำที่ความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำยางส่วนที่เป็นชั้นบนสุดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 34 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้น้ำยางสดที่ได้มาผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนครึ่งรูป หาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในยางเปรียบเทียบกับยางโปรตีนต่ำที่ได้จากน้ำยางที่ไม่ได้ผ่านการปั่นแยก แต่มีปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากัน โดยใช้ยางดิบที่ได้จากน้ำยางสด pH 8.5 มีปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวควบคุม

การศึกษาผลของ stabilizer ต่อความสามารถในการลดโปรตีนของปาเปนตริงรูป

เตรียมยางโปรตีนต่ำจากน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณปาเปนตริงรูป เท่ากับ 200 CDU แปรผันชนิดของ stabilizer คือ Triton X-100 Teepol และ SDS (sodium dodecyl sulphate)ให้ปริมาณที่ใช้เท่ากับ 0.4 p.h.r. เติมstabilizer แต่ละชนิดลงในน้ำยางพร้อมกับปาเปนตริงรูป หาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในยาง เปรียบเทียบกับยางโปรตีนต่ำที่ไม่มีการเติม stabilizer ใดๆ

การศึกษาผลของสารเคมีบางชนิดต่อการลดไนโตรเจนด้วยปาเปนตริงรูป

เตรียมยางโปรตีนต่ำจากน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณปาเปนตริงรูปเท่ากับ 200 CDU แปรผันสารเคมีชนิดต่างๆ เติมลงในน้ำยางขณะกวนน้ำยางกับเอนไซม์ โดยมีปริมาณดังต่อไปนี้ คือ Triton X-100 0.4 p.h.r. sodium-metabisulfite 0.05 p.h.r. hydroxylamine hydrochoride 0.15 p.h.r. EDTA และ cystein 0.05 p.h.r. หาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในยางโปรตีนต่ำที่ผลิตได้ในแต่ละวิธี

การศึกษาความเสถียรของปาเปนตริงรูปในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางเมื่อนำมาใช้ในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง

เตรียมยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูปที่มีปริมาณ 200 CDU แยกปาเปนตริงรูปออกจากน้ำยาง แล้วทำให้ยางจับตัวเป็นก้อนด้วยเครื่อง autoclave จากนั้นนำปาเปนตริงรูปกลับมาใช้ผลิตยางโปรตีนต่ำซ้ำอีก 4 ครั้ง นำยางที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมาหาปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดโปรตีนของปาเปนตริงรูปกับการใช้งานครั้งแรก