บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองการจับก้อนยางจะใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR25 เพื่อลดปริมาณโปรตีนในเนื้อยางโดยอาศัยเอนไซม์โปรตีเอสที่แบคทีเรียผลิตขึ้นและทำให้ยางจับก้อนโดยใช้กรดแอซีติก

กรดแอซีติกสามารถผลิตได้โดยแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* TISTR102 จึงใช้ทดลองเปรียบเทียบกับการใช้กรดแอซีติก

การทดลองจะใช้น้ำยางสดรักษาสภาพด้วยแอมโมเนียประมาณ 0.3% และน้ำยางข้นปริมาณแอมโมเนียต่ำ เพื่อหาปริมาณยางแห้งที่จับก้อนกับเวลาเมื่อใช้กรดแอซีติกและแบคทีเรียเป็นสารจับก้อน กรรมวิธีการผลิตที่ทดลองกับน้ำยางสดรักษาสภาพด้วยแอมโมเนีย แปรปริมาณเนื้อยางแห้งเป็น 5, 15 แล 25 % ยังใช้นำมาทดลองกับน้ำยางข้นปริมาณแอมโมเนียต่ำ แปรปริมาณเนื้อยางแห้งเป็น 5, 15 และ25 % เพื่อเป็นแนวทางในการใช้แบคทีเรียช่วยในการทำให้น้ำยางข้นจับก้อนเป็นฟิล์มยางสำหรับเคลือบวัสดุอื่น ๆ สมบัติของยางดิบที่ได้จากน้ำยางสดและน้ำยางข้นจับก้อนโดยแบคทีเรียจะนำมาเปรียบเทียบกับยางดิบที่ผลิตจากน้ำยางสดและน้ำยางข้นจับก้อนโดยกรดแอซีติกและนำไปเทียบกับมาตรฐานยางแท่งไทย ชั้น STR 5L

ในการทดลองจึงใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อเลี้ยงแบคทีเรีย ตรวจสอบลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย การผสมน้ำยางและสารอาหารเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้ยางจับก้อน การรีดน้ำออกจากยางและการอบแห้ง ใช้สารเคมีและเครื่องมือดังรายการต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยมีดังต่อไปนี้

เครื่องมือ	แหล่งที่มา
1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Spectronic 20 Genesys
2. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน	Clement 2000
3. เครื่องเขย่า	เคมีเทคนิค
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ	Isuzu
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	ORION
6. ตู้อบ	WTB Binder ED-115i
7. ตู้ควบคุมการปนเปื้อน	Asian chemical & engineering Co,LTD.
8. ชุดเครื่องกวนปรับอัตราเร็วรอบได้	Jika Co,LTD.
9. ถาดสแตนเลส	ตลาดมหานาค
10. เครื่องรีดยางขนาดเล็ก	เวิ้งนครเกษม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยมีดังต่อไปนี้

สารเคมี	สมบัติ	หน้าที่	ที่มา
1.น้ำยางสดรักษาสภาพด้วยแอมโมเนีย	เหลว สีขาว มีเนื้อยางแห้ง 41 %	วัตถุดิบหลัก	บ.ไทยรับเบอร์แอนด์ ลาเท็คซ์ จำกัด
2. น้ำยางข้นชนิดปริมาณแอมโมเนียต่ำ	เหลว สีขาว มีเนื้อยางแห้ง 60 %	วัตถุดิบหลัก	จังหวัด ระยอง
3. กรดแอซีติก	เหลว ใส กลิ่นฉุน	จับก้อนยาง	บริษัท เอส อาร์ แล็ป จำกัด
4. เอทานอล	ความเข้มข้น 95 %	อาหารแบคทีเรีย	บริษัท กิมฮวด จำกัด
5. Yeast extract	ผงสีเหลือง	อาหารแบคทีเรีย	บริษัท เอส อาร์แล็ป จำกัด
6. Beef extract	ผงสีเหลืองอ่อน	อาหารแบคทีเรีย	บริษัท เบคไทย จำกัด
7. Peptone	ผงสีเหลืองอ่อน	อาหารแบคทีเรีย	บริษัท เอส อาร์แล็ป จำกัด
8. Glucose	ผงสีขาว	อาหารแบคทีเรีย	ศึกษาภัณฑ์ ราชดำเนิน
9. แป้งข้าวเหนียว	ผงสีขาว	อาหารแบคทีเรีย	ตลาดสามย่าน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

Bacillus subtilis TISTR 25 และ *Acetobacter aceti* TISTR102 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (Thailand institute of Scientific and Technological research) เป็นสายพันธุ์ที่แยกในประเทศไทย

3.4 การเตรียมสารละลาย

3.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ *Bacillus subtilis* (เกษม พงษ์มณี, 2536)

Nutrient agar slant (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
NaCl	5	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองแบบมีฝาปิดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเมื่อยังไม่นำมาใช้

3.4.2 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

อาหารสูตรปรับต่ำ (Minimal medium; MM)

Yeast extract	10	กรัม
แป้งข้าวเหนียว	2.5	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2$	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

อาหารสูตรสมบูรณ์ (Nutrient broth; NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม

NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา *Acetobacter aceti* TISTR102

อาหารสมบูรณ์หมายเลข 4 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ศูนย์จุลินทรีย์, 2543)

Glucose	100	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
$CaCO_3$	20	กรัม
Agar	25	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองแบบมีฝาปิดโดยแยกสารละลาย $CaCO_3$ ใส่ขวดรูปชมพู่ฆ่าเชื้อต่างหาก และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย $CaCO_3$ ก่อนที่อาหารจะแข็งตัวในภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นจึงนำหลอดมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเมื่อยังไม่นำมาใช้

3.4.4 อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter aceti*

สูตรที่ 1 FBV (Freborova, Masushita และ Adachi, 1997)

Yeast extract	3	กรัม
Polypeptone	2	กรัม
Glucose	5	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	3	กรัม
KH_2PO_4	1	กรัม
$K_2 HPO_4$	0.16	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.7	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
$Ca (NO_3)_2$	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สูตรที่ 2 GEY (สมบูรณ์ และ สุวิมล, 2542)

Glucose	10	กรัม
Ethanol	40	มิลลิลิตร
Yeast extract	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สูตรที่ 3 MED1

Glucose	20	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Peptone	3	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

สูตรที่ 4 REY0.5

น้ำยางสด	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
เอทานอล 95 %	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลาย yeast extract ในน้ำกลั่นก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อใน autoclave เมื่อปล่อยให้เย็นแล้วจึง เติมน้ำยางสดและเอทานอลภายใต้ภาวะควบคุมการปนเปื้อนในตู้ปลอดเชื้อ

3.4.5 การเตรียมสารละลายกรดแอซีติก 2 % v/v

ใช้ Glacial acetic acid ความหนาแน่น 1.048 -1.051 กรัม/มิลลิลิตร โดยเตรียมขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปในขวดก่อนประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตร ปิเปต กรดแอซีติก 2 มิลลิลิตร ลงไปในขวด แล้วเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

3.4 6 การเตรียมน้ำยาง

เมื่อทราบปริมาณเนื้อยางแห้ง (dry rubber content; drc) จากการวิเคราะห์ตามวิธี ISO126 (ภาคผนวก ข)

คำนวณโดยใช้สูตร

$C_1 V_1 = C_2 V_2$

เมื่อ C_1 แทนปริมาณเนื้อยางแห้งเริ่มต้น

C_2 แทนปริมาณเนื้อยางแห้งที่ต้องการเตรียม

V_1 แทนปริมาตรน้ำยางเริ่มต้นที่ต้องใช้ (มิลลิลิตร)

V_2 แทนปริมาตรน้ำยางสุดท้าย (มิลลิลิตร)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเลี้ยงและติดตามการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25

การเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculumn) เขี่ยเชื้อในอาหารแข็ง NA 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสูตรสมบูรณ์ NB นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิห้อง จนวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.5 หน่วย ถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว NB 100 มล. นำไปเขย่าต่อที่ภาวะเดิม ติดตามการเจริญของเชื้อ เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 4 ชั่วโมง วัดการเจริญ (ความขุ่น) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร วัดค่า pH และหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 5 มล.ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3500 g 10 นาที อบเซลล์ที่ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ทำให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น วัดน้ำหนักโดยเครื่องชั่งชนิดละเอียด

3.5.2 การเลี้ยงเชื้อและติดตามการเจริญของเชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR 102

การเตรียมเชื้อตั้งต้น จะเขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้น 1 loop ใส่ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ MED1 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิห้อง จนวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรได้ 0.5 หน่วย จึงถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลวที่เหมาะสม 100 มล. นำไปเขย่าต่อที่ภาวะเดิม ติดตามการเจริญของเชื้อ เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อทุก 4 ชั่วโมง วัดการเจริญ (ความขุ่น) ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วัดค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมด

3.5.3 การวิเคราะห์สมบัติของน้ำยางธรรมชาติเบื้องต้น (ภาคผนวก ข)

(1) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid content; tsc) (ISO124, 1995)

(2) การวิเคราะห์ปริมาณเนื้อยางแห้ง (dry rubber content; drc) (ISO126,1995)

(3) การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (alkalinity; NH_3) (ISO125,1995)

3.5.4 กระบวนการผลิตน้ำยางจับก้อนโดยใช้แบคทีเรีย

(1) ทดลองหาปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอาหารเหลวที่เหมาะสมเพื่อการลดปริมาณไนโตรเจนในยาง

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารที่ใช้เพื่อหาปริมาตรที่เหมาะสมของของสารอาหารเหลวเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* TISTR25 2 ชนิด ได้แก่ อาหารสูตรปรับต่ำ (MM) อาหารสูตรสมบูรณ์ (NB) เพื่อการลดปริมาณไนโตรเจนในยาง

ตัวอย่าง	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	อัตราส่วนต่อน้ำยาง (โดยปริมาตร)
น้ำยางสด drc 15 %	100	1
แบคทีเรีย *B. subtilis* ในอาหาร MM อายุ 44 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.51 g/l	20, 10 และ 5	1:5, 1:10 และ 1:20
แบคทีเรีย *B. subtilis* ในอาหาร NB อายุ 44 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 2.48 g/l	20, 10 และ 5	1:5, 1:10 และ1:20

(2) กระบวนการผลิตยางดิบจากน้ำยางจับก้อนโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR25 ร่วมกับ *Acetobacter aceti* TISTR102 เปรียบเทียบกับการใช้กรดแอซีติก

ในการทดลองจะต้องเตรียมวัตถุดิบดังนี้

แบคทีเรีย *B. subtilis* ในสารอาหารเหลว MM และ NB เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 44 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการเจริญในระยะ early stationary phase

แบคทีเรีย *A. aceti* ในสารอาหารเหลว REY0.5 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 44 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อจะเจริญในระยะ late log phase

น้ำยางสดรักษาสภาพด้วยแอมโมเนียและน้ำยางข้นปริมาณแอมโมเนียต่ำซึ่งภายหลังเจือจางด้วยน้ำกลั่นและ *B. subtilis* ในสารอาหารเหลวจะมีเนื้อยางแห้ง 5, 15 และ 25 %

(1) ขั้นตอนการผลิตยางแผ่นดิบเพื่อหาปริมาตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR25 ในสารอาหาร MM และ NB ที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนในยาง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) ขั้นตอนการผลิตยางดิบแห้งจากน้ำยางสดจับก้อนโดยใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR25 ร่วมกับ *Acetobacter aceti* TISTR102

ปริมาณสารที่ต้องเติมแสดงในภาคผนวก ค

3. 5. 5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของยางดิบ (ภาคผนวก ข)

(1) ปริมาณสิ่งสกปรก (dirt content) (ASTM D1278-91, 1991)

(2) ปริมาณสิ่งระเหย (volatile matter content) (ASTM D1278-91, 1991)

(3) ปริมาณเถ้า (ash content) (ASTM D1278-91, 1991)

(4) ปริมาณไนโตรเจน (nitrogen content) (ASTM D3533-90, 1990)

(5) ความอ่อนตัวเริ่มแรก (Initial Plasticity Index; Po) (ASTM D2007-81)

(6) ดัชนีความอ่อนตัว (Plasticity Retention Index; PRI) (ASTM D3194-84, 1984)

(7) ความหนืด มูนี (mooney Viscosity) (ASTM D1646-94, 1994)

(8) สี (lovibond Index) (ASTM D3517-84, 1984)

3. 5. 6 การวิเคราะห์สมบัติของยางผสมสารเคมี (ภาคผนวก ข)

(1) ลักษณะการคงรูปของยาง (cure characteristic)

(2) แรงดึงจนขาด (tensile strength) การยืดจนขาด (elongation at break) และแรงเค้นของยางที่ถูกยืดออกไปตามที่กำหนด (modulus) (ASTM D412-87, 1987)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย