การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติระหว่างปาเปนตริงรูปบนเม็ดทรายกับปาเปนอิสระ

นางสาว สันศณี จงจิตสำราญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-395-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16754074

COMPARISON OF NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION EFFICIENCY BETWEEN SAND-IMMOBILIZED AND FREE PAPAIN

Miss Sansanee Jongjitsumrun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Biotechnology Programme

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-395-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติระหว่างปาเปนตริงรูปบนเม็ดทรายกับปาเปนอิสระ
โดย	นางสาว สันศณี จงจิตสำราญ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ชำวิวรรธน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งนิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ชำวิวรรธน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชยากริต ศิริอุปถัมภ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สันศณี จงจิตสำราญ: การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ ระหว่างปาเปนตรึงรูปบนเม็ดทรายกับปาเปนอิสระ (COMPARISON OF NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION EFFICIENCY BETWEEN SAND-IMMOBILIZED AND FREE PAPAIN) อ.ที่ปรึกษา ผศ. วินิจ ข้าวิวรรธน์. อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. จริยา บุญญวัฒน์. 123 หน้า. ISBN 974-632-395-4

การตรึงปาเปนบนทรายโดยวิธีเชื่อมข้าม เมื่อใช้ melamine เป็นตัวกระตุ้นทราย กลูทารัลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อมข้าม และมี 20 มิลลิโมลาร์ ซีสเตอีน 10 มิลลิโมลาร์ EDTA ในสารละลายปาเปนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร pH 8.5 ตรึงเป็นเวลา 150 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ได้ปาเปนตรึงรูปที่มี โปรตีน 0.59-0.63 มิลลิกรัม/ กรัม ทราย มีแอคติวิตีในช่วง 40-50 CDU/กรัม ทราย pH ที่เหมาะสมของปาเปนตรึงรูปในการย่อยเคซีนคือ 6.5 ค่า K_m = 4.319 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สูงกว่าปาเปนอิสระ (3.770 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เล็กน้อย ความเสถียรที่ pH 8-10 ดีกว่าปาเปนอิสระแต่ทนต่ออุณหภูมิเพียง 40 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าปาเปนอิสระ (60 องศาเซลเซียส) ปาเปนตรึงรูปมีความเสถียรต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส ในลักษณะของแข็งดีกว่าการแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 9 ปาเปนตรึงรูปสามารถใช้งานแบบต่อเนื่องในลักษณะคอลัมน์โดยการชะด้วยเคซีน (1%) ได้ถึง 7 วัน โดยแอคติวิตีไม่เปลี่ยนแปลง แต่การใช้ซ้ำเป็นงวดแบบไม่ต่อเนื่อง 3 ครั้ง ปาเปนตรึงรูปสูญเสียแอคติวิตี 50%

เมื่อใช้น้ำยางธรรมชาติ 25% เนื้อยางแห้ง (DRC) เป็นซับสเทรต ปาเปนตรึงรูป 200 CDU/น้ำยาง 20 มิลลิลิตร ในภาวะเหมาะสม pH 8.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณโปรตีนวัดในรูป % ไนโตรเจน (ปริมาณโปรตีน = 6.25 × ปริมาณไนโตรเจน%) เหลือ 0.37% ถ้าปั่นแยกน้ำยางก่อนปรับความเข้มข้นเป็น 10% เนื้อยางแห้งแล้วเติมปาเปนตรึงรูปสามารถลดปริมาณไนโตรเจนเหลือเพียง 0.15% ที่ปริมาณเอนไซม์ที่เท่ากัน อย่างไรก็ดี ที่ปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 200 CDU ปาเปนตรึงรูปมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไนโตรเจนในน้ำยางธรรมชาติได้ต่ำกว่าปาเปนอิสระ คือจากปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 0.67% ลดเหลือ 0.37% แต่ปาเปนอิสระลดได้เหลือ 0.29% เมื่อใช้เอนไซม์ 200 CDU เท่ากัน ยางธรรมชาติโปรตีนต่ำที่ผลิตได้จากปาเปนตรึงรูปมีสมบัติทางกายภาพและมีสิ่งเจือปนที่ไม่ใช่ยางในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากเมื่อผลิตด้วยปาเปนอิสระ ความเสถียรของปาเปนตรึงรูปเมื่อใช้กับน้ำยางธรรมชาติแบบเป็นงวดไม่ต่อเนื่อง ใช้ได้อย่างมาก 2 ครั้ง แอคติวิตีของเอนไซม์ลดเหลือ 50% เทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น ดังนั้นการใช้ปาเปนตรึงรูปลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจึงไม่คุ้มทุน เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการตรึงปาเปนเพิ่ม 40 เท่าของการใช้ปาเปนอิสระ

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C426711 MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: NATURAL RUBBER /DEPROTEINIZED RUBBER /IMMOBILIZED PAPAIN

SANSANEE JONGJITSUMRAN : COMPARISON OF NATURAL RUBBER LATEX DEPROTEINIZATION EFFICIENCY BETWEEN SAND-IMMOBILIZED AND FREE PAPAIN. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. VINICH KHAMVIWATH, M.Sc. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. JARIYA BOONJAWAT , Ph.D. 123 pp. ISBN 974-632-395-4

Papain can be immobilized on sand by cross-linking method, using melamine and glutaraldehyde as activator and cross-linking agent. In the presence of 20 mM Cystein, 10 mM EDTA and 1 mg/ml papain solution pH 8.5 for 150 minutes at room temperature, the immobilized papain contains 0.59-0.63 mg protein/g sand and the activity is 40-50 CDU/g sand. Using casein as substrate, the optimum pH of immobilized papain is 6.5 with pH stability in the range of 8-9, which is higher than free papain, but the stability to temperature is only 40°C, lower than free papain (60°C). The K_m value of immobilized papain is 4.319 mg/ml, which is slightly higher than free papain (3.770 mg/ml), but its storage stability at 4°C as moist cake is longer than in buffer solution pH 9. Immobilized papain packed in a column is able to digest casein (1%) continuously for 7 days without loss of activity, but in the batch system immobilized papain lost 50% of its activity after 3 repeated uses.

When natural rubber latex 25% DRC is used as substrate for immobilized papain 200 CDU/20 ml latex at optimum pH 8.5, temperature 45°C and reaction time 4 hrs. Immobilized papain can reduce protein in natural rubber latex assayed as the reduction of nitrogen content (% protein content = 6.25 × % nitrogen content) down to 0.37%. When the natural rubber latex was centrifuged and diluted to 10% DRC before adding immobilized papain, the nitrogen content can be reduced to 0.15% with the same amount of enzyme. However immobilized papain still has lower deproteinization efficiency than free papain. At equal amount of 200 CDU, immobilized papain can reduce nitrogen content from 0.67% to 0.37%, where free papain can reduce nitrogen content to 0.29%. The deproteinized natural rubber (DPNR) produced by immobilized papain shows similar raw rubber properties, and other non-rubber contaminants at the same level as DPNR produced by free papain. The stability of immobilized papain decreased 50 %, after 2 repeated uses for latex deproteinization in the batch system, therefore immobilized papain is still not valid for natural rubber latex deproteinization, because the operating cost for papain immobilization is 40 fold of using free papain

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ข่าวิวรรธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาแนะนำและให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการดำเนินงานวิจัยด้วยดีตลอดมา ตลอดจนได้ให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จริยา บุญญวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการจัดหาน้ำยางธรรมชาติสำหรับใช้ในงานวิจัยและยังให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ชยากริต ศิริอุปถัมภ์ ที่ได้กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี ที่ได้ให้ความสะดวกและความช่วยเหลือในด้านสถานที่ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนนิสิตปริญญาโทเทคโนโลยีทางชีวภาพ ชีวเคมี และเคมีเทคนิคทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือต่างๆ

ท้ายสุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ กำลังใจและความเข้าใจเป็นอย่างดีมาตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

คำย่อ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์..... 19

ครุภัณฑ์..... 19

เคมีภัณฑ์..... 22

ยางมะละกอที่ใช้ในการทดลอง..... 23

น้ำยางสดที่ใช้ในการทดลอง..... 23

ทรายที่ใช้ในการทดลอง..... 23

3. วิธีการทดลอง..... 24

การเตรียมปาเปน..... 24

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต..... 24

การวัดปริมาณโปรตีนที่ติดบนทราย..... 25

ขั้นตอนการเตรียมทราย..... 26

ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์บนทราย..... 26

การหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงปาเปนโดยใช้ Melamine

เป็นตัวกระตุ้นทราย..... 29

หน้า

การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิ ที่มีต่อการย่อยสลายเคซีน
ของเอนไซม์..... 31
การศึกษาผลของ pH และอุณหภูมิ ที่มีต่อความ
เสถียรของเอนไซม์..... 32
การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต..... 33
การศึกษาความเสถียรในการเก็บรักษาปาเปนตรึงรูป..... 33
การหาความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนโดยปาเปนตรึงรูป
ในคอลัมน์แบบต่อเนื่อง..... 33
การศึกษาความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนด้วยปาเปนตรึงรูป
ในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง..... 35
ขั้นตอนการเตรียมน้ำยางสด..... 35
การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในแผ่นยาง..... 36
การเตรียมยางโปรตีนต่ำ..... 37
การศึกษาประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนของ
ปาเปนตรึงรูปและปาเปนอิสระ..... 39
การทดสอบสมบัติทางกายภาพของยางโปรตีนต่ำ..... 39
การผลิตยางโปรตีนต่ำจากน้ำยางที่ผ่านการปั่นแยก..... 44
การศึกษาผลของ stabilizer ต่อความสามารถ
ในการลดไนโตรเจนด้วยปาเปนตรึงรูป..... 45
การศึกษาผลของสารเคมีบางชนิดต่อการลดไนโตรเจน
ด้วยปาเปนตรึงรูป..... 45
การศึกษาความเสถียรของปาเปนตรึงรูปในการลดปริมาณไนโตรเจน
ในน้ำยางเมื่อนำมาใช้ในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง..... 45
4. ผลการทดลอง..... 46

หน้า

ผลของการตริงปาเปนบนทราย..... 46
ผลของการเปรียบเทียบสมบัติของปาเปนตริงรูปบนทราย
ด้วยพันธะโควาเลนซ์กับปาเปนอิสระ..... 54
ผลการลดโปรตีนในน้ำยางสดด้วยปาเปนตริงรูปบนทราย..... 67
ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดโปรตีนของ
ปาเปนตริงรูปกับปาเปนอิสระ..... 69
ผลการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของยางโปรตีนต่ำ..... 74
ผลการศึกษาการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยน้ำยางสดที่ผ่านการแยก
โปรตีนออกบางส่วน..... 77
ผลการศึกษาการใช้สาร stabilizer บางชนิด
ในการเตรียมยางโปรตีนต่ำ..... 79
ผลการศึกษาสาร HH และ SMS ที่มีผลต่อแอคติวิตี
ของปาเปนตริงรูป..... 82
ผลการศึกษาความเสถียรต่อการทำงานของปาเปนตริงรูป
ในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่องเมื่อนำมาใช้กับน้ำยางสด..... 82
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 86
เอกสารอ้างอิง..... 105
ภาคผนวก..... 113
ประวัติผู้เขียน..... 123

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	สมบัติต่างๆ ของปาเปน.....	9
1.2	องค์ประกอบต่างๆ ของน้ำยางพารา.....	13
4.1	เปรียบเทียบผลของตัวกระตุ้นทุราธชนิดต่างๆ ต่อการตริงปาเปน.....	47
4.2	อิทธิพลของซีสเตอีนและ EDTA ต่อแอคติวิตีของปาเปนตริงรูป.....	56
4.3	สมบัติทางกายภาพของยางดิบโปรตีนต่ำที่เตรียมได้จาก ปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ.....	76
4.4	เปรียบเทียบการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูประหว่าง วิธีการปั่นแยกน้ำยางกับการเจือจางน้ำยาง.....	78
4.5	ปริมาณ Triton X-100 ที่เหมาะสมต่อการผลิตยางโปรตีนต่ำ ด้วยปาเปนตริงรูป.....	81
4.6	ผลของสารเคมีบางชนิดที่มีต่อประสิทธิภาพการลดไนโตรเจน ด้วยปาเปนตริงรูป.....	83
5.1	ประมาณต้นทุนในการเตรียมปาเปนตริงรูป 1,000 CDU	103
5.2	ประมาณต้นทุนในการเตรียมยางโปรตีนต่ำ 1 กิโลกรัม ด้วยปาเปนตริงรูป	104

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	กระบวนการทาเอนไซม์ตริงรูป.....	3
1.2	ลาดับของกรดอะมิโนของปาเปน.....	7
1.3	สูตรโครงสร้างของ cis-1,4-polyisoprene.....	12
1.4	การแยกองค์ประกอบของน้ำยางสดโดย ultracentrifugation.....	14
3.1	ขั้นตอนการตรึงปาเปนบนทราย.....	28
3.2	คอลัมน์ของปาเปนตรึงรูป.....	34
3.3	ขั้นตอนการผลิตยางธรรมชาติโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตรึงรูป.....	38
4.1	ขนาดของทรายที่ใช้ในการตรึงปาเปน.....	49
4.2ก	ปริมาณ MM ที่ใช้ในการกระตุ้นทรายเพื่อตรึงปาเปน.....	50
4.2ข	เวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการกระตุ้นทรายด้วย MM.....	50
4.3ก	ปริมาณกลูทารัลดีไฮด์ที่ใช้เมื่อทำการตรึงปาเปนบนทรายโดยใช้ MM เป็นตัวกระตุ้น.....	51
4.3ข	เวลาที่ใช้ในการทาปฏิกิริยาระหว่างทรายที่ถูกกระตุ้นด้วย MM กับกลูทารัลดีไฮด์.....	51
4.4	อิทธิพลของความเป็นกรดเป็นด่างของสารละลายต่อการตรึงเอนไซม์.....	52
4.5	เวลาที่ใช้ในการตรึงปาเปนบนทราย.....	53
4.6	แสดงค่าความเข้มข้นของปาเปนที่ใช้ในการตรึงปาเปนบนทราย.....	55
4.7	เปรียบเทียบสภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเคซีนระหว่างปาเปนตรึงรูปกับปาเปนอิสระ.....	58

รูปที่ หน้า

4.8 เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเคซีนระหว่างปาเปนตริงรูปกับปาเปนอิสระ..... 59

4.9 เปรียบเทียบความเสถียรของปาเปนตริงรูปกับปาเปนอิสระที่สภาพความเป็นกรด-ด่างต่างๆ..... 61

4.10 เปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิของปาเปนตริงรูปกับปาเปนอิสระ..... 62

4.11ก กราฟ Lineweaver-Burk plot ของปาเปนอิสระโดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต..... 63

4.11ข กราฟ Lineweaver-Burk plot ของปาเปนตริงรูปโดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต..... 63

4.12 เปรียบเทียบความเสถียรของปาเปนตริงรูปที่เก็บในภาวะต่างๆ..... 65

4.13 ความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนในลักษณะแบบต่อเนื่อง..... 66

4.14 ความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง..... 68

4.15 แสดงสภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำยางสดที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนของปาเปนตริงรูป..... 70

4.16 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนด้วยปาเปนตริงรูป..... 71

4.17 แสดงเวลาที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนด้วยปาเปนตริงรูป..... 72

4.18 แสดงปริมาณปาเปนตริงรูปที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนในน้ำยางสด..... 73

4.19 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนในน้ำยางสดระหว่างปาเปนตริงรูปกับปาเปนอิสระ..... 75

4.20 เปรียบเทียบผลการใช้สาร stabilizer บางชนิดต่อประสิทธิภาพ

รูปที่ หน้า

การลดไนโตรเจนด้วยปาเปนดริงรูป..... 81

4.21 ความเสถียรต่อการลดไนโตรเจนในน้ำยางสดด้วยปาเปนดริงรูป
เมื่อนามาใช้งานในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง..... 85

คำย่อ

มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
A	=	Absorbance
BSA	=	bovine serum albumin
CDU	=	casein digestion unit
EDTA	=	ethylene diaminetetraacetic acid
K_m	=	Michaelis- Menten constant
mM	=	millimolar
CV-DPNR	=	constant viscosity deproteinized natural rubber
DRC	=	dry rubber content
P_o	=	initial plasticity value of the unage test
p.h.r.	=	part per hundred of dry rubber
PRI	=	plasticity retention index
µg	=	microgram
DPNR	=	deproteinized natural rubber
APTS	=	aminopropyltriethoxysilane
HMT	=	hexamethylenetetramine
MM	=	melamine
ml	=	milliliter