บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันบทบาทของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมต่างๆ มีศักยภาพสูงทั้งในลักษณะเอนไซม์อิสระ (free enzyme) และเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) หรือเอนไซม์ดัดแปลง (modified enzyme) แต่การใช้เอนไซม์ในรูปอิสระมีขีดจำกัดอยู่หลายประการ เช่น เอนไซม์อิสระไม่เสถียร เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงในสารละลายของซับสเทรตและผลผลิตทำให้แยกออกไม่ได้ และโดยเฉพาะในแง่ของการไม่สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำหรือต่อเนื่อง ทำให้สิ้นเปลืองเอนไซม์ การศึกษาเอนไซม์ดัดแปลงในลักษณะเอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) จึงเป็นทางออกของการนำเอนไซม์สู่อุตสาหกรรม แม้ว่าบางครั้งจะพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปด้อยกว่าเอนไซม์อิสระ แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณาข้อได้เปรียบด้านอื่นๆ เช่น เสถียรภาพการใช้งาน (operation stability) ภาวะการทำปฏิกิริยา (reaction condition) การกำหนดเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) เป็นต้น จะพบว่าเอนไซม์ตรึงรูปมีสมบัติดังกล่าวในระดับสูงกว่าเอนไซม์อิสระ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

เอนไซม์ตรึงรูป

หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้อยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมีกับตัวยึด (carrier) ละลายน้ำได้ยากขึ้นหรือไม่ละลายเลย มีผลทำให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysts) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535) โดยทั่วไปการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปสามารถทำได้ 3 วิธี (Chibata,

1978) คือ

1. การตรึงเอนไซม์กับตัวยึด (carrier-binding method)

ใช้ตัวยึดที่ไม่ละลายน้ำเกาะกับเอนไซม์ การยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับตัวยึดใช้หลักการต่างๆ กันได้แก่ แรงดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) การเกิดพันธะเชิงไอออน (ionic bond) และการเกิดพันธะโคเวเลนซ์ (covalent bond)

วิธีนี้เป็นวิธีตรึงเอนไซม์ที่เก่าแก่ที่สุด ปริมาณของเอนไซม์ที่เกาะกับตัวยึดและแอคติวิตีหลังการตรึงขึ้นอยู่กับธรรมชาติของตัวยึด ดังนั้นการเลือกตัวยึดและวิธีในการยึดเอนไซม์กับตัวยึด จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการตรึงวิธีนี้

ตัวยึดที่นิยมใช้กันมากได้แก่ อนุพันธ์ของพอลิแซ็คคาไรด์ (polysaccharide) เช่น เซลลูโลส (cellulose) อากาโรส (agarose) และพอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel)

2. การเชื่อมข้าม (cross-linking method)

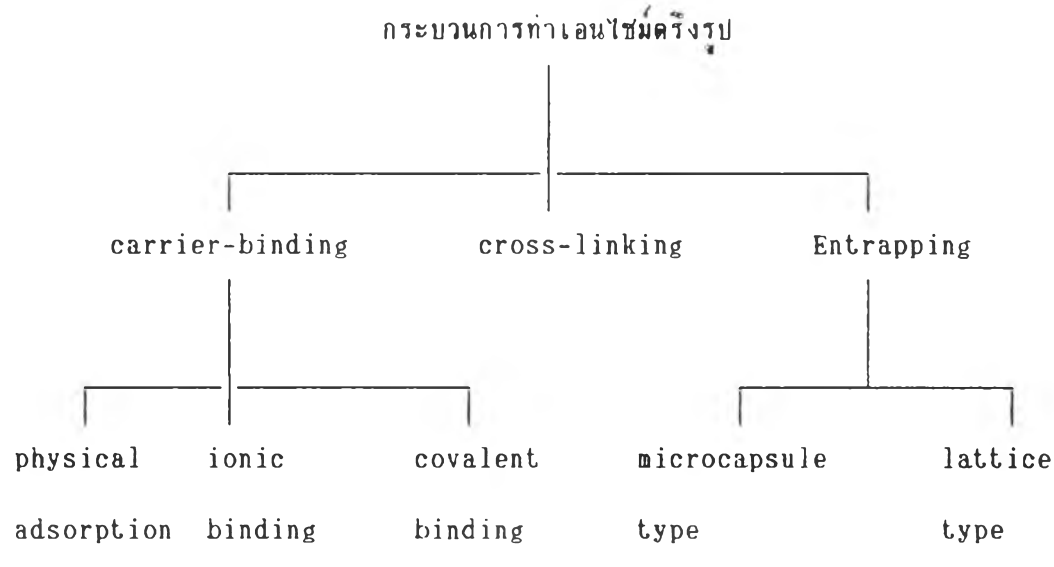
ใช้ปฏิกิริยาระหว่างสาร bi- หรือ multi-functional reagent เกาะกับเอนไซม์แบบเชื่อมข้าม วิธีนี้มีแรงยึดที่แข็งแรง แต่ต้องใช้ปฏิกิริยาที่รุนแรง เอนไซม์มีแอคติวิตีต่ำ ใช้ปริมาณเอนไซม์มาก เสถียรภาพต่ำ วิธีนี้นิยมใช้ควบกับการยึดเกาะด้วยแรงดูดซับทางกายภาพ สารที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่เหมือนกันหรือต่างกันตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไปที่นิยมใช้ คือ กลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เอธิลีน มาลีอิค แอนไฮไดรด์ (ethylene meleic anhydride) เฮกซาเมทธิลีนไดไอโซไซยาเนท (hexamethylene diisocyanate)

3. การห่อหุ้ม (entrapping method)

เป็นการกักเอนไซม์อยู่ในตัวกลาง โดยเอนไซม์ไม่เกิดพันธะใดๆ กับตัวกลาง แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ 1. การห่อหุ้มเอนไซม์ในช่องตาข่ายของพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ (lattice type) และ 2. การห่อหุ้มเอนไซม์ในแคปซูลเล็ก (microcapsule type)

ตัวกลางที่ใช้ในการตรึงแบบแลททิซมักเป็นพอลิเมอร์ ซึ่งสังเคราะห์จากโมโนเมอร์ (monomer) อีกทีหนึ่ง เช่น พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) หรืออาจเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติ เช่น แป้ง เป็นต้น

ตัวกลางที่ใช้ในการตรึงแบบไมโครแคปซูล ได้แก่ ไนลอน (nylon) พอลิสไตรีน (polystyrene) ไนโตรเซลลูโลส (nitro cellulose)



รูปที่ 1.1 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป (Immobilization process)

ที่มา : Chibata, 1978

การตรึงเอนไซม์บนทราย

ทรายเป็นสารอนินทรีย์ประเภทเดียวกับซิลิกา มีผู้สนใจนำทรายมาใช้เป็นตัวยึดในการตรึงเอนไซม์หลายชนิด (Thornton และคณะ, 1974 ; Brotherton และคณะ, 1976 ; Puvanakrishnan และ Bose, 1980 ; Thomplison และคณะ, 1983) ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติของทรายซึ่งเป็นวัสดุที่มีราคาถูก หาได้ง่าย มีความคงทนสูงต่อแรงกระทบ ไม่ถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ สามารถแยกออกจากระบบได้สะดวก และมีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้

เทคนิคที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์บนทราย คือ เทคนิคที่เรียกว่า carrier-crosslink (Chibata,1978) อาศัยหลักการ คือเอนไซม์จะยึดจับกับตัวยึดด้วยพันธะโคเวเลนซ์ เทคนิคนี้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ 1. ขั้นตอนการกระตุ้นทรายด้วยตัวกระตุ้น (carrier activator) 2. ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการเชื่อมข้าม (crosslinking)

ในขั้นตอนแรกบริเวณผิวของทรายจะถูกเปลี่ยนจากกลุ่มฟังชันเดิมให้เป็นกลุ่มฟังชันใหม่ที่มีความไวในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เช่นการทำปฏิกิริยา silanization ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่ aminoalkyl ของ 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ให้กับทราย จากนั้นจึงใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม (bifunctional reagent) โดยจะทำหน้าที่เชื่อมระหว่างหมู่อะมิโนของทรายกับหมู่อะมิโนของเอนไซม์

Thornton และคณะ (1974) ศึกษาการตรึงเอนไซม์ lactoperoxidase และ β-fructofuranosidase บนตัวยึด 3 ชนิด คือ เม็ดแก้ว (glass bead) แก้วพรุน (porous glass) และทราย ด้วยวิธีเชื่อมติดด้วยโลหะ (metal-link method) พบว่าที่ pH 4.5 เป็น pH ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตรึงเอนไซม์ทั้งสองชนิด

ด้วยวิธีนี้ และยังได้ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปบนทรายในด้านต่างๆ คือ lactoperoxidase ตรึงรูปมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเท่าเดิม แต่ค่า K_m เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (จาก 2.6×10^{-8} โมล เป็น 3.1×10^{-8} โมล) ส่วน β-fructofuranosidase ตรึงรูปมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เปลี่ยนจาก pH 4.4 เป็น pH 4.6

Brotherton และคณะ(1976) ศึกษาเทคนิคการตรึงเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) และ L-lactate dehydrogenase (LDH) บนทรายด้วยพันธะโคเวเลนซ์ พบว่าการกระตุ้นทรายด้วย APTS (3-aminopropyltriethoxysilane) ในสารละลายที่มีโทลูอีน (toluene) หรือปราศจากโทลูอีน ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การแช่ทรายในกรดไนทริกก่อนการใช้ จะช่วยให้ปริมาณโปรตีนที่ติดบนทรายสูงกว่าที่ติดบนเม็ดแก้ว (glass bead) 2-3 เท่า (65-92 ไมโครกรัมโปรตีน/กรัม ทราย) ADH และ LDH ตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.9 และ 137 ยูนิต (nkat)/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Puvanakrishnan และ Bose (1980) ทดลองตรึงรูปทริปซิน (trypsin) บนทรายด้วยพันธะโคเวเลนซ์ เปรียบเทียบตัวกระตุ้น (carrier activator) 4 ชนิด คือ APTS (3-aminopropyltriethoxysilane) HMT (hexamethylene-tetramine) HMD (hexamethylenediamine) และ MM (melamine) โดยมีกลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า APTS เป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้ทริปซินตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด (624 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) ส่วนขนาดของทรายที่เหมาะสม คือ ขนาด 44 เมช (mesh) ทริปซินตรึงรูปให้ค่า ความเสถียรต่อ pH และ ความเสถียรต่ออุณหภูมิ ดีกว่าทริปซินอิสระ

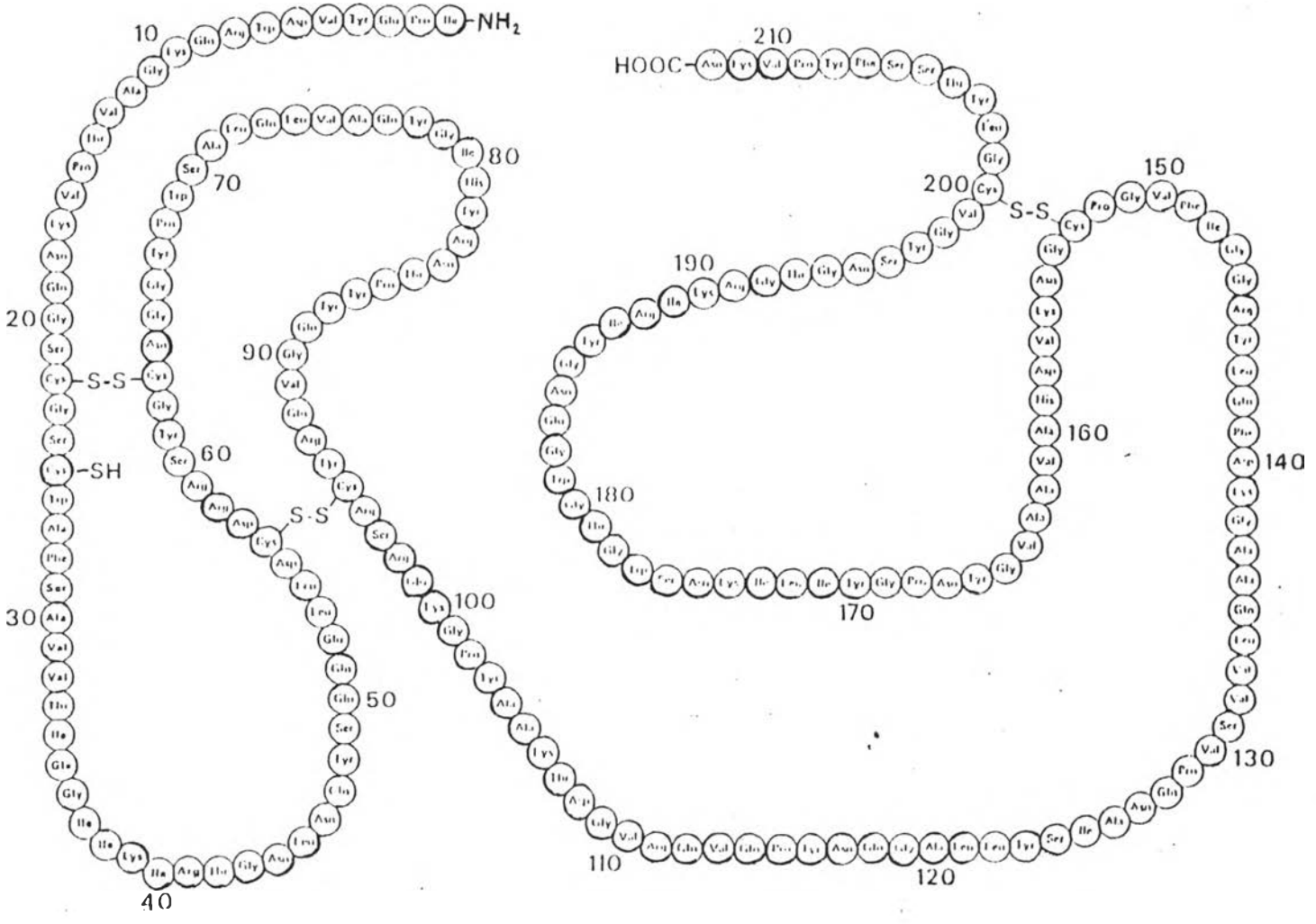
Thomplison และคณะ (1983) ได้ทดลองเบื้องต้นถึงความเป็นไปได้ในการใช้ทรายเป็นตัวยึดแทนแก้วพรุน โดยทดลองตรึงรูปเอนไซม์เรนนิน (rennin) บนทราย ด้วยพันธะโคเวเลนซ์ เมื่อใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้นและกลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม

ผลการทดลองพบว่าวิธีนี้สามารถทำให้เอนไซม์ติดบนทรายได้ประมาณ 54 เปอร์เซ็นต์(ปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 40 มิลลิกรัม/5 กรัม ทราย) และยังมีรายงานการใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบแพคเบดว่าให้ผลดีเช่นเดียวกับถังกวน นอกจากนี้เรนนินดริงรูปที่ใช้ถังกวนเป็นเครื่องปฏิกรณ์จะใช้เวลาในการตกตะกอนของนมสั้นกว่าเรนนินอิสระ

ปาเปน (Papain)

ปาเปน เป็นเอนไซม์ที่พบเฉพาะในยางมะละกอ ไม่ว่าจะได้จากส่วนลำต้น ใบ ก้านใบหรือผลดิบ จัดอยู่ในกลุ่มซัลไฟดริลโปรติเอส (Sulfhydryl protease) เช่นเดียวกับฟิซิน (Ficin) และบรอมิเลน (Bromelain) ปาเปนสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนได้ (Arnon,1970) อีกทั้งยังสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ในสารตั้งต้นสังเคราะห์ (synthetic substrate) เช่น Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) (Tokura และคณะ, 1971) Benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) (Smith และคณะ, 1958) เป็นต้น

ปาเปนมีลักษณะเป็นสายพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวที่เกิดขึ้นจากการเรียงตัวกันของกรดอะมิโนจำนวน 212 ตัว (รูปที่ 1.2) ซึ่งในจำนวนนั้นจะเป็นกรดอะมิโน ซิสเตอีน จำนวน 7 ตัว โดยที่กรดอะมิโนซิสเตอีนจำนวน 6 ตัวจะจับกันเป็นพันธะไดซัลไฟด์ 3 พันธะ และกรดอะมิโนซิสเตอีนอีกหนึ่งตัวจะอยู่ที่ตำแหน่งที่ 25 ซึ่งอยู่ในบริเวณเร่ง (active site) (Husain และ Lowe, 1970) มีช่วง pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง pH 5 ถึง 8 และ 60 ถึง 75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สารเคมีที่เร่งปฏิกิริยา (activators) ส่วนใหญ่จะเป็นพวกสารรีดิวซ์ (reducing agents) เช่น ซิสเตอีน ซัลไฟด์ (sulfide) ซัลไฟต์ (sulfite) ไซยาไนด์ (cyanide) และสารประกอบไธออล (Arnon,1970 ; Sluyterman,1967 b) ส่วนสารยับยั้งของปาเปนได้แก่สารประกอบโลหะหนัก เช่น Hg^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+} , Cd^{2+} (Sluyterman,1967 a) สารประ



รูปที่ 1.2 ลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ปาเปน

กอบคาร์บอนิล (Morihara, 1967), diisopropylfluorophosphate (DFP), กรดแอสคอบิค (Ozawa และคณะ, 1962) สรุปสมบัติต่างๆ ของปาเปนดังแสดงในตารางที่ 1.1

จากการที่ปาเปนในยางมะละกอมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์โปรตีนแล้วได้กรดอะมิโนและเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กนั้น ผลที่เกิดจากการทำงานของปาเปนสามารถใช้ในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ได้หลายวิธีด้วยกัน

Balls และคณะ (1940) ตรวจหาแอคติวิตีของปาเปนโดยใช้สารละลายปาเปนทาปฏิกิริยากับโปรตีนในสารละลายนมผงขาดมันเนย (skim milk powder) แล้วจับเวลาจนกระทั่งสารละลายนมเริ่มจับตัวเป็นก้อน

Miyada และ Tappel (1956) ตรวจหาแอคติวิตีของปาเปนโดยใช้ฮีโมโกลบินเป็นซับสเทรต เมื่อทำการไฮโดรไลซ์ด้วยปาเปนจะได้สารโอลิโกเพปไทด์และกรดอะมิโนและวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 277 นาโนเมตร

Ortiz และคณะ (1980) ได้ดัดแปลงวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาการทำงานของปาเปนจาก Skelton (1969) โดยใช้สารละลายเคซีนในซิเทรตบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 6 ทาปฏิกิริยากับสารละลายปาเปนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกที่เย็น ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที กรองส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับการดูดกลืนแสงของสารละลายไทโรซีนมาตรฐานภายใต้ภาวะเดียวกัน

ตารางที่ 1.1 สมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ปาเปน

สมบัติต่างๆ	ปาเปน
แหล่งที่มา	Carica papaya
ค่า pI	8.75
น้ำหนักโมเลกุล	20,700 – 24,000
pH ที่เหมาะสมในการทำงาน	5 – 8
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน	60 – 75 ° ซ
ความจำเพาะต่อการตัดพันธะเพปไทด์ระหว่าง	
กรดอะมิโน	กว้าง
สารยับยั้ง	ถูกยับยั้งด้วยสารออกซิไดซ์ ซัลไฟดริลและโลหะหนัก
สารกระตุ้น	สารรีดิวซ์ ,สารประกอบไธออลและซิสเตอีน

ที่มา : Ward (1983),Arnon (1970), Lynn (1979), Kunimitsu และ Yasunobu (1967)

1. ประโยชน์ของปาเปน

ปาเปนที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรม มักใช้ในรูปของเอนไซม์บริสุทธิ์ (purified enzyme) น้อยกว่าการใช้ในรูปของเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partially purified enzyme) เอนไซม์บริสุทธิ์จะใช้ในอุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ เป็นต้น (Jone และคณะ, 1974) มีรายงานการใช้ปาเปนในอุตสาหกรรมต่างๆ คือ

1.1 อุตสาหกรรมเบียร์ จะมีการเติมปาเปนลงไปในขั้นตอนของกระบวนการ mashing เพื่อที่จะช่วยในการย่อยโปรตีนในมอลท์ แอดจังค์ (malt adjunct) ซึ่งเป็นส่วนผสมของข้าวบาร์เลย์และมอลท์ สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ โปรตีนที่ถูกย่อยสลายจะกลายเป็นแหล่งไนโตรเจนของยีสต์ในการหมักเบียร์ นอกจากนั้นยังมีการใช้ในขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตเบียร์ โดยมีการเติมปาเปนลงไปเพื่อลดปริมาณของโปรตีนในน้ำเบียร์ เป็นการป้องกันการเกิดตะกอนในระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ (chill-haze prevention) หรือการทำให้เบียร์ใส (chill-proofing)

1.3 อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ จะใช้ปาเปนทำให้เนื้อนุ่มขึ้น โดยเอนไซม์จะย่อยสลายโปรตีนจำพวก myofibrillar และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อน จะย่อยสลายเนื้อสัตว์ในขณะที่หุงต้ม การทำงานของเอนไซม์จะเกิดได้ดีเมื่ออุณหภูมิเกือบถึง 50 องศาเซลเซียส และจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์เมื่ออุณหภูมิขึ้นประมาณ 90 องศาเซลเซียส การทำให้เนื้อนุ่มโดยปาเปน มี 2 วิธี คือ ใช้ก่อนการฆ่าสัตว์และหลังการฆ่าสัตว์ (Huffman และคณะ,1967)

2. ปาเปนตรึงรูป (Immobilized Papain)

ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยมากมายที่ศึกษาการใช้ปาเปนตรึงรูปในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น Jansen และ Olson (1969) ศึกษาการตรึงรูปปาเปนในลักษณะการเชื่อมข้าม (cross linking) ระหว่างโมเลกุลเป็นร่างแห โดยใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะ

ร่วมพบว่าปฏิกิริยาการเชื่อมข้ามนี้ขึ้นอยู่กับระดับ pH ของสารละลาย ปาเปนตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะ (specific esterase activity) เท่ากับ 6.0-9.1 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน นอกจากนี้ปาเปนตรึงรูปโดยวิธีนี้ในภาวะที่มีการเติม ซิสเตอีน จะได้เป็นรูปผลึก (crystalline) แต่ในภาวะที่ไม่มี ซิสเตอีน เอนไซม์ตรึงรูปที่ได้จะมีลักษณะเป็นเส้นใย (fibrous)

Venkatasubramanian และ คณะ (1975) ตรึงรูปปาเปนบน collagen membrane (ปาเปนตรึงรูปมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.15-3.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) เพื่อใช้ป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ และประกอบเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปเพื่อลดตะกอนเบียร์อย่างต่อเนื่อง พบว่าการใช้เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปครั้งที่ 1 ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ค่อนข้างสูง ตัวอย่างทุกตัวที่เก็บเป็นระยะเวลา 3 เดือน จะมีลักษณะใสเป็นที่ยอมรับ แต่หลังจากการใช้เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูปเป็นครั้งที่ 3 พบว่าเครื่องปฏิกรณ์มีประสิทธิภาพลดลง แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปสลายไป (decay)

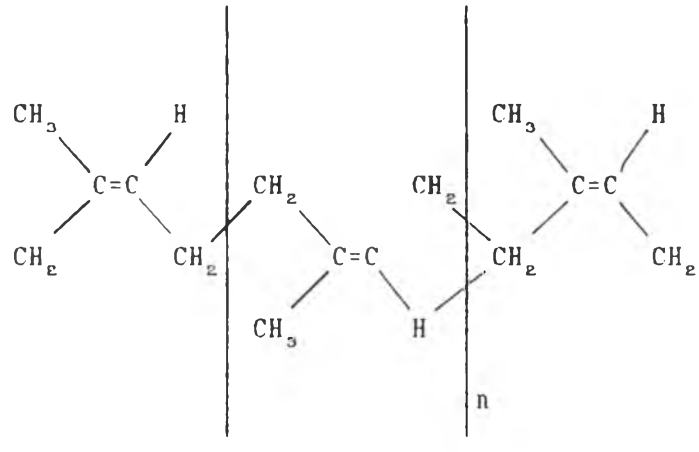
Finley และคณะ (1977) ตรึงรูปปาเปนบนไคติน แล้วเปรียบเทียบลักษณะการใช้ปาเปนตรึงรูป ในแบบคอลัมน์และแบบถังกวน (stirred tank) เพื่อป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ พบว่าการใช้ปาเปนตรึงรูปในแบบคอลัมน์จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า

Ghayal และ Joshi (1983) ตรึงรูปปาเปนบน paraffin wax พบว่าปาเปนตรึงรูปที่ได้สามารถจะนำไปใช้งานในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง (batch) เป็นเวลา 10 ครั้ง โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่ลดลง

น้ำยางธรรมชาติ

น้ำยางธรรมชาติ หรือน้ำยางพารา ได้มาจากน้ำยางซึ่งไหลจากเปลือกของลำต้น

ยางพาราที่ถูกกรีด ต้นยางมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Hevea brasiliensis เป็นสารคอลลอยด์ ที่มีลักษณะเป็นของเหลวมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม เรียกว่า น้ำยางสด (rubber latex) องค์ประกอบของน้ำยางจะมีอนุภาคยาง (rubber particles) ขนาดประมาณ 0.04-2.0 ไมครอน ซึ่งเป็นสารพวกไฮโดรคาร์บอนแขวนลอยอยู่ในชั้นน้ำ มีความหนาแน่นระหว่าง 0.975 ถึง 0.980 กรัม/มิลลิลิตร pH ตั้งแต่ 6.5 ถึง 7.0 ไฮโดรคาร์บอนเหล่านี้เป็น พอลิเมอร์ที่สังเคราะห์โดยเซลของต้นยาง ประกอบด้วยโมโนเมอร์หรือ 1 หน่วยย่อย คือ ไอโซพรีน (isoprene) มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวที่เรียกว่า ซิส 1,4-พอลิไอโซพรีน (cis-1,4-polyisoprene, $(C_5H_8)_n$) เป็นส่วนใหญ่ (วราภรณ์ ธรไชยกูล, 2524) (รูปที่ 1.3)



รูปที่ 1.3 สูตรโครงสร้างของ cis-1,4-polyisoprene

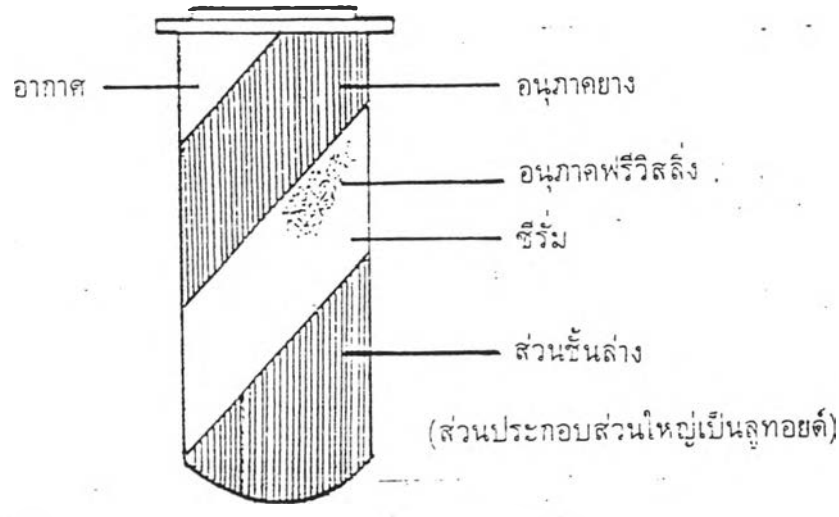
เมื่อทำให้อนุภาคยางจับเป็นก้อน(coagulation) ด้วยกรดฟอร์มิก 2 เปอร์เซ็นต์ อบให้แห้งจะได้น้ำหนักยางแห้ง (dry rubber content, DRC) ในช่วง 25-45 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ขึ้นกับฤดูกาลและปัจจัยอื่นๆ แต่ถ้านำน้ำยางทั้งหมดไปอบแห้ง จะได้ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid content, TSC) ซึ่งมีค่าสูงกว่า DRC ประมาณ 2-5 เปอร์เซ็นต์ ผลต่างระหว่าง TSC และ DRC จะขึ้นกับส่วนที่ไม่ใช่ยาง (non-rubber components) ซึ่งส่วนใหญ่ได้แก่โปรตีน ลิพิด กรดอะมิโน น้ำตาลและ เกลืออนินทรีย์ องค์ประกอบของน้ำยางธรรมชาติแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบต่างๆ ของน้ำยางธรรมชาติ

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์
สารไฮโดรคาร์บอน	36.0
น้ำ	58.5
โปรตีน	1.4
ลิพิด	1.6
เถ้า	0.5
คาร์โบไฮเดรทและอิโนซิทอล	1.6
สารประกอบพวกไนโตรเจน	0.3

ที่มา : Fong,1992

เมื่อนำน้ำยางไปปั่นโดยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (ultracentrifuge) จะแยกน้ำยางออกให้เห็นเป็น 3 ชั้นใหญ่ๆ (รูปที่ 1.4) คือชั้นที่มีอนุภาคยาง (rubber particles) ชั้นของ ซีรัมใส (C,clear serum) และชั้นล่างสุด (B,bottom fraction) เรียกว่าชั้นลูทอยด์ (lutoid fraction)ในส่วนล่างของชั้นอนุภาคยางมีสารที่เรียกกันว่า "อนุภาค ฟรี-วิสลิง (Frey-Wyssling) ซึ่งมีสีเหลืองเข้มมีอนุภาคใหญ่กว่ายางและมีความหนาแน่นมากกว่ายางเล็กน้อย มีคาโรทินอยด์ทำให้เกิดสีเหลืองเข้มมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณของสารคาโรทินอยด์ตัวนี้ ฟรี-วิสลิงมีส่วนประกอบของไขมัน อนุภาคเหล่านี้จะรวมตัวอยู่ในแอมโมเนียและแยกตัวออกจากยางอยู่ในส่วนของซีรัมเมื่อมีการเติมแอมโมเนีย (โกศล จริงสูงเนิน,2528)



รูปที่ 1.4 การแยกองค์ประกอบของน้ำยางสดโดย ultracentrifugation

ที่มา : โกศล จริงสูงเนิน, 2528

ซีรัมใสหรือส่วนที่เป็นชั้นน้ำของน้ำยางประกอบด้วยสารต่างๆ คือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและกรดอะมิโน ซึ่งโปรตีนที่สำคัญ ได้แก่ อัลฟา-โกลบูลิน (α-globulin) และฮีวิน (Hevein) อัลฟา-โกลบูลินเป็นโปรตีนชนิดที่มีมากในส่วนซีรัมใส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 มีสมบัติไม่ละลายในน้ำกลั่น แต่ละลายได้ในสารละลายของเกลือ กรด และด่าง

ฮีวีนเป็นโปรตีนชนิดที่เป็นผลึก มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพียงประมาณ 5,000 ละลายได้ดีในน้ำ ไม่ตกตะกอนด้วยความร้อน และไม่ค่อยมีผลกระทบกระเทือนต่อการคงสภาพเป็นสารแขวนลอยของน้ำยาง

นอกจากโปรตีนที่กระจายตัวอยู่ใน ซีรัมใส แล้วยังมีโปรตีนบางส่วนถูกดูดซับอยู่ที่ผิวของอนุภาคยาง โปรตีนส่วนนี้ถึงแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย แต่ประกอบด้วยหมู่สำคัญที่มีประจุบวกและประจุลบ และผลรวมที่เกิดจากการแตกตัวของประจุเหล่านี้ที่ pH ต่างๆ มีผลทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิ (net charge) แตกต่างกันความเป็นขั้วหรือการชอบน้ำ (hydrophilic) ของโปรตีน เชื่อว่าจะมีผลต่อสมบัติของยางในหลายๆ ส่วน เช่น ในกระบวนการทำให้ยางสุก (vulcanization) โปรตีนทำให้เกิดการเชื่อมข้าม (crosslink) บางส่วนมากเกินไป (Bloomfield,1973) ทั้งยังทำให้ค่าโมดูลัสเปลี่ยนไปด้วยเพราะว่ามีความไวต่อความชื้น น้ำจะถูกโปรตีนและสารอื่นๆ ที่ชอบน้ำดูดซับทำให้เพิ่มค่า stress relaxation หรือง่ายต่อการเสียรูปของยางเมื่อรับแรง เป็นผลให้ค่าโมดูลัสลดลง จากปัญหาข้างต้นจะเห็นว่าถ้าทำการผลิตยางที่มีโปรตีนต่ำมากจะช่วยปรับปรุงสมบัติของยางได้

ยางธรรมชาติโปรตีนต่ำ (Deproteinized Natural Rubber,DPNR)

ยางที่มีปริมาณโปรตีนหรือไนโตรเจนต่ำ หรือยาง DPNR เป็นยางธรรมชาติที่ได้กำจัดโปรตีนส่วนใหญ่ออกไป ทำให้ยางโปรตีนต่ำที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับยางสังเคราะห์ cis-1,4-polyisoprene ยางโปรตีนต่ำ จะมีค่า green strength และ building tack สูงกว่ายางสังเคราะห์ เมื่อเข้าสู่กระบวนการทำให้ยางสุกแล้วยางจะมีค่า creep และ compression set ต่ำกว่ายางธรรมชาติโดยทั่วไปในตลาด (Bloomfield, 1973) รวมทั้งมีค่าการเกิดความร้อนสะสม (heat build up) ต่ำ (Knight และ Tan, 1975) ความสามารถในการดูดซับน้ำ ต่ำ (Connolly และคณะ,1970) ทนต่อการแตกหักสูงและทำให้การกระจายของการสุกทั่วถึงทั้งหมด (Bernard,1973) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ดี

มากและเหมาะสมในการใช้งานทางวิศวกรรม ในปี 1977 Rubber Research Institute of Malaysia (RRIM) ได้กำหนดว่ายางโปรตีนต่ำที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติ จะต้องมีปริมาณไนโตรเจนอยู่น้อยกว่า 0.07 เปอร์เซ็นต์

การกำจัดโปรตีนมี 3 วิธีใหญ่ๆ ด้วยกันคือ

1. การกำจัดโดยใช้สารลดแรงตึงผิวหรือผงซักฟอก (surfactant, detergent)

โดยโปรตีนจะถูกดึงออกมาจากผิวของอนุภาคยาง

2. การกำจัดทางเคมี

โดยแช่ยางในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โปรตีนจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยปฏิกิริยาเคมี

3. การกำจัดทางชีวเคมี

โดยใช้เอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น ปาเปน ทริปซิน (Trypsin) Alcalase, Superase เป็นต้น ซึ่งจะไฮโดรไลซ์โปรตีนเป็นเพปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโนที่สามารถละลายน้ำได้

อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดโปรตีนออกโดยการใช้เอนไซม์ เป็นวิธีที่มีประโยชน์มากที่สุดทั้งนี้เนื่องจากภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเป็นภาวะที่ไม่รุนแรง และมีผลข้างเคียงต่อโมเลกุลของยางน้อยมาก

Yapa และ Balasingham (1974) ทดลองผลิตยางโปรตีนต่ำ (DPNR) จากน้ำยางสดด้วยปาเปน พบว่ายางโปรตีนต่ำมีปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่ 0.18-0.21 เปอร์เซ็นต์ ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ภาวะต่างๆ ทั้งอุณหภูมิและ pH ให้ผลที่ไม่ชัดเจนนัก แต่พอสรุปได้ว่าที่อุณหภูมิสูงๆ (30-100 °C) จะให้ผลในการลดไนโตรเจนได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำๆ (4 °C) ส่วนในภาวะที่น้ำยางมี pH เป็นด่าง ยางโปรตีนต่ำที่ได้จะมีสีขาวกว่าในภาวะที่

pH เป็นกรด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตยางโปรตีนต่ำที่มีค่าความหนืดคงที่ (CV-DPNR) ด้วยการเติมสาร hydroxylamine hydrochloride ส่วนข้อเสียของการใช้ปาเปนคือทำให้ยางดิบมีปริมาณเถ้า (ash) สูงขึ้นเล็กน้อย (จาก 0.12 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.23 เปอร์เซ็นต์)

John และคณะ (1977) ศึกษาการใช้ปาเปนเพื่อลดปริมาณไนโตรเจนในน้ำยางสด พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียวสามารถลดไนโตรเจนลงเหลือ 0.3 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใช้เอนไซม์ร่วมกับ Nonidet-40 จะลดไนโตรเจนลงเหลือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเจือจางปริมาณเนื้อยางแห้ง (DRC) ให้เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ จะลดไนโตรเจนลงเหลือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ยางโปรตีนต่ำที่ผลิตได้มีค่าการเกิดความร้อนสะสม (heat buid up) ต่ำ มีลักษณะการสุก (cure behaviour) และสมบัติทางกายภาพของยางวัลคาไนซ์ดีขึ้นเมื่อเทียบกับยางควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าปาเปนมีประสิทธิภาพการทำงานสูงกว่า Superase

Yapa และคณะ (1980) ได้พัฒนาขั้นตอนการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนโดยการเพิ่มขั้นตอนการแยกตะกอนของ Mg^{++} ออกจากน้ำยาง และเจือจางน้ำยางทั้งก่อนและหลังการเติมเอนไซม์ ซึ่งยางโปรตีนต่ำที่ผลิตด้วยวิธีนี้มีปริมาณเถ้าลดลงและมีสมบัติเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสาร hydroxylamine hydrochloride พร้อมกับเอนไซม์ในการผลิตยางโปรตีนต่ำที่มีค่าความหนืดคงที่ (CV-DPNR) จะมีผลต่อค่า heat build up ของยาง

วรรณพ วิเศษสงวน (2535) ได้ทำการศึกษาและวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตยางโปรตีนต่ำ ด้วยวิธีการขจัดโปรตีนออกจากน้ำยางข้น 60 เปอร์เซ็นต์ และน้ำยางสด โดยใช้เอนไซม์สองชนิด คือ ปาเปน และอัลคาเลส ผลการทดลองพบว่าในภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีศักยภาพสูงในการลดปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในยางได้ร้อยละ 70-75 ของปริมาณเริ่มต้น และให้ผลผลิตที่มีสมบัติของยางดิบเป็นที่น่าพอใจเมื่อเทียบกับมาตรฐาน

ระดับนานาชาติ ในลักษณะของการใช้น้ำยางสด ปาเปนจะมีข้อได้เปรียบกว่าอัลคาเลสในแง่ของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ ระยะเวลาที่ใช้ และ pH ของน้ำยางสด

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้โปรทิเอสชนิดอื่นๆ อยู่หลายประการ แต่การพัฒนายางโปรตีนต่ำสู่ระดับอุตสาหกรรมนั้น ค่าใช้จ่ายส่วนใหญ่จะอยู่ที่ราคาเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้มีราคาค่อนข้างสูง ไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ (Yapa และคณะ,1980 ;วรรณพ วิเศษสงวน,2535) โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงปาเปนบนทรายซึ่งเป็นตัวยึดที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก จากนั้นจึงศึกษาหาภาวะ วิธีการและความเป็นไปได้สำหรับการนำปาเปนตรึงรูปไปใช้เพื่อลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทางานระหว่างปาเปนตรึงรูปและปาเปนอิสระ นอกจากนี้งานวิจัยยังครอบคลุมไปถึงการศึกษาสมบัติต่างๆ ของปาเปนตรึงรูปที่ได้อีกด้วย

ขั้นตอนการวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตรึงปาเปนบนทราย

2. ศึกษาและเปรียบเทียบสมบัติทางจลนศาสตร์ของปาเปนตรึงรูปกับปาเปนอิสระเมื่อใช้เคซีนเป็นซับสเทรต

3. ศึกษาภาวะและกระบวนการที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ปาเปนตรึงรูปกับน้ำยางธรรมชาติ

4. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดปริมาณไนโตรเจนในน้ำยางธรรมชาติระหว่างปาเปนตรึงรูปกับปาเปนอิสระ