บทที่ 4

ผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วนด้วยกัน คือ ในส่วนแรกจะเป็นการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการตริงปาเปนบนทราย พร้อมทั้งศึกษาสมบัติของปาเปนตริงรูปที่ได้ ในส่วนที่สองจะเป็นการนาปาเปนตริงรูปมาประยุกต์ใช้กับน้ำยางธรรมชาติ เปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้งานระหว่างปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนาปาเปนตริงรูปไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ผลการศึกษาการตริงปาเปนบนเม็ดทราย

1. ผลการศึกษาชนิดของตัวกระตุ้นทรายที่เหมาะสม

ตริงเอนไซม์ปาเปนบนทรายทะเลขนาด 80-120 เมช โดยใช้ตัวกระตุ้น 3 ชนิด คือ aminopropyltriethoxysilane (APTS), hexamethylenetetramine (HMT) และ melamine(MM) ผลการทดลองแสดงว่าในการกระตุ้นทรายด้วยตัวกระตุ้นที่แตกต่างกันปริมาณโปรตีนที่ติดบนทรายจะมีค่าใกล้เคียงกันมาก คือประมาณ 0.59-0.63 มิลลิกรัมโปรตีน/กรัม ทราย แต่ MM เป็นตัวกระตุ้นที่ทาให้ปาเปนตริงรูปมีค่าแอคติวิตีและแอคติวิตีจาเพาะสูงที่สุด เมื่อเทียบกับการกระตุ้นด้วย HMT APTS หรือการไม่ถูกกระตุ้นเลย (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นจึงเลือกใช้ MM เป็นตัวกระตุ้นทรายตลอดการทดลอง

2. ผลการศึกษาขนาดของทรายที่เหมาะสม

ทรายเป็นตัวรองรับประเภทที่ไม่มีรูพรุน การนาทรายมาใช้ในการตริงเอนไซม์ พื้นที่ผิวจึงเป็นสิ่งที่ต้องคานึงถึง เตรียมทรายที่มีขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด คือ 40-60, 60-80

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบผลของตัวกระตุ้นทรายชนิดต่างๆ ต่อการตรึงปาเปน

ตัวกระตุ้น	โปรตีนที่ติดบนทราย (มก.โปรตีน/กรัม ทราย)	แอคติวิตี (CDU/กรัม ทราย)	แอคติวิตีจำเพาะ (CDU/มก.โปรตีน)
APTS	0.63	28	44.4
HMT	0.6	27	45
MM	0.59	32	54
ไม่ใช้ตัวกระตุ้น	0.30	12	40

ตรึงปาเปนบนทรายขนาด 80-12 เมช โดยใช้วิธีการตรึงที่แตกต่างกัน 4 วิธี คือ

1. APTS(2%)+กลูทารัลดีไฮด์(1.25%)+ปาเปน(ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7)
2. HMT(2%) +กลูทารัลดีไฮด์(1.25%)+ปาเปน(ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7)
3. MM(0.25 กรัม)+กลูทารัลดีไฮด์(1.25%)+ปาเปน(ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH7)
4. กลูทารัลดีไฮด์(1.25%)+ปาเปน(ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7)

และ 80-120 เมช นำทรายแต่ละขนาดมาตริงเอนไซม์โดยใช้ MM เป็นตัวกระตุ้น พิจารณาค่าแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปที่ได้ พบว่าทรายที่มีขนาดเล็กจะให้ค่าแอคติวิตีสูงกว่าทรายที่มีขนาดใหญ่ ทรายที่มีขนาด 80-120 เมช จึงเป็นขนาดที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้ตริงเอนไซม์ปาเปน (รูปที่ 4.1)

3. ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตริงปาเปนบนทราย

นอกจากขนาดของทรายแล้ว ปัจจัยที่ยังมีผลต่อแอคติวิตีของปาเปนตริงรูป ได้แก่จำนวนหมู่ฟังชันที่บริเวณผิวของทรายที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ซึ่งก็คือปริมาณของ MM และกลูทารัลดีไฮด์ ศึกษาอิทธิพลของสารทั้ง 2 ชนิด โดยแปรผันความเข้มข้นและเวลาในการทำปฏิกิริยาของสารดังกล่าว และศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายปาเปน ได้ผลดังต่อไปนี้ คือ

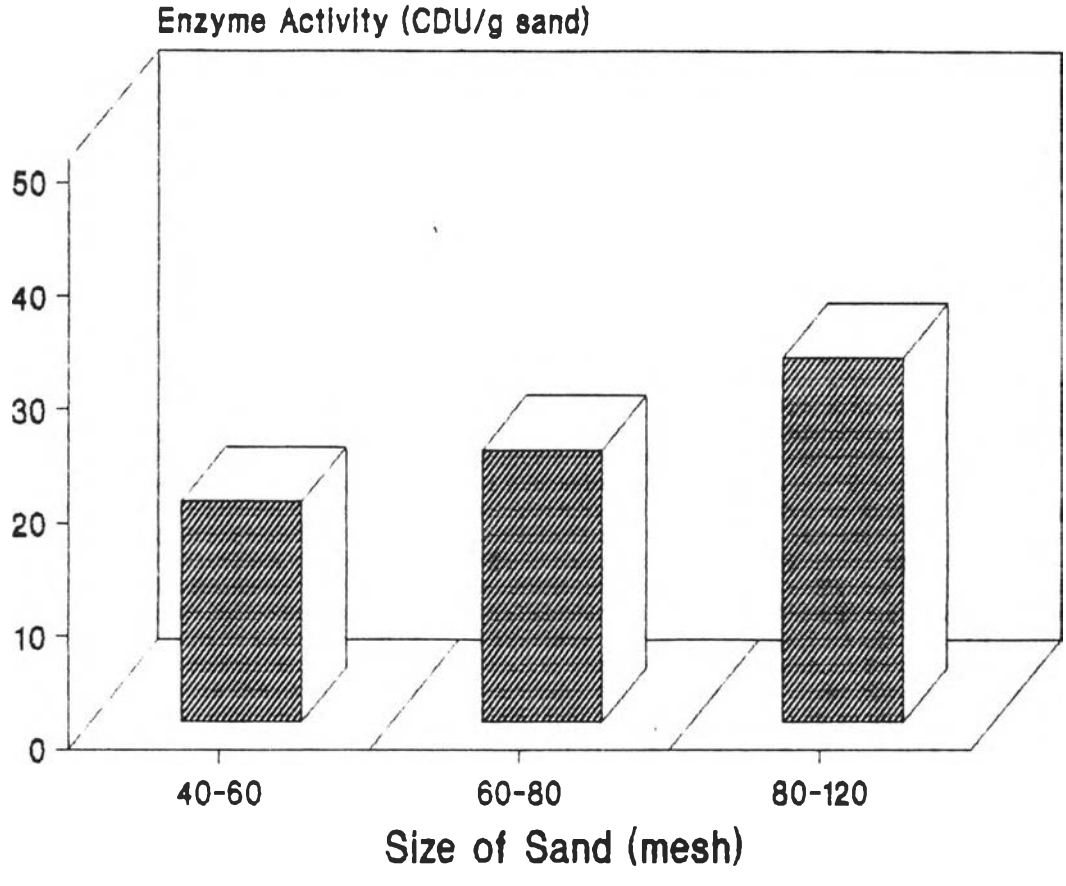
เมื่อใช้ทรายจำนวน 5 กรัม การใช้ MM เป็นตัวกระตุ้น ภาวะที่เหมาะสมคือใช้ MM ปริมาณ 0.3 กรัม เป็นเวลา 90 นาที (รูปที่ 4.2ก และ 4.2ข)

ภาวะที่เหมาะสมของการใช้กลูทารัลดีไฮด์ เพื่อทำให้เกิดการเชื่อมข้ามระหว่างปาเปนกับตัวยึด คือ ใช้กลูทารัลดีไฮด์ ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที (รูปที่ 4.3ก และ 4.3ข)

ในกรณีของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้ ภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้การสารละลายปาเปนใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.5 (รูปที่ 4.4) และใช้เวลาในการตริง 150 นาที (รูปที่ 4.5)

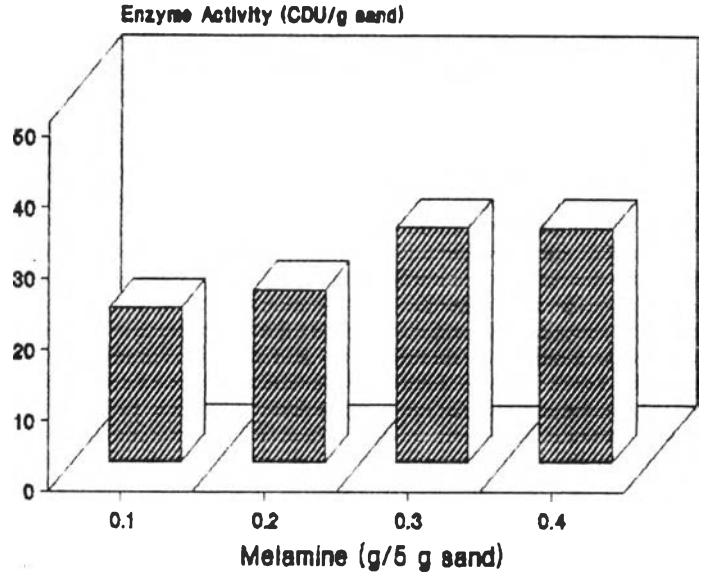
4. ผลการศึกษาปริมาณปาเปนที่เหมาะสม

หลังจากเลือกภาวะที่เหมาะสมในการตริงได้แล้ว จึงทำการทดลองเพื่อหาปริมาณ

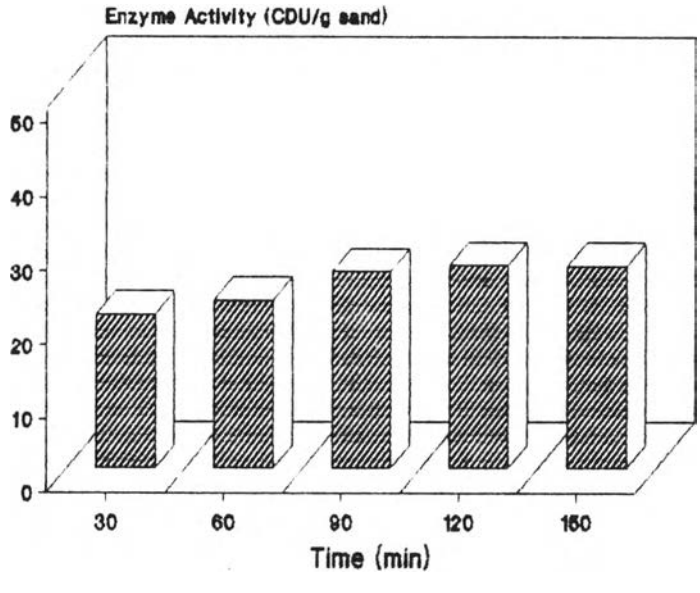


รูปที่ 4.1 ขนาดของทรายที่ใช้ในการตรึงปาเปน

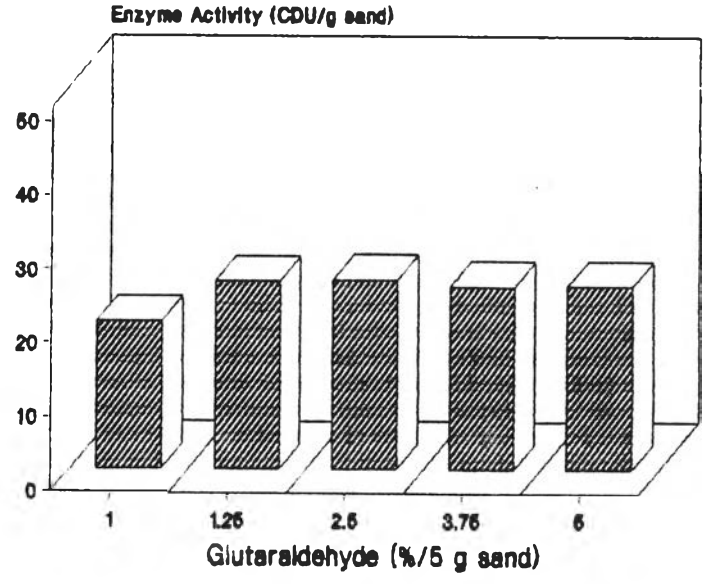
เมื่อทำการตรึงเอนไซม์ปาเปนบนทรายขนาดต่างๆ กัน 3 ขนาด คือ 40-60 60-80 และ 80-120 เมช โดยใช้ MM เป็นตัวกระตุ้น



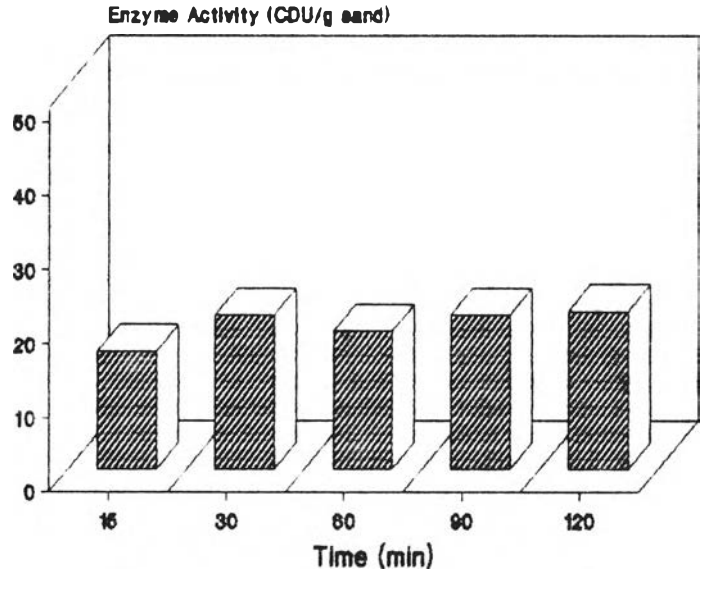
รูปที่ 4.2ก ปริมาณ MM ที่ใช้ในการกระตุ้นทรายเพื่อตรึงปาเปน



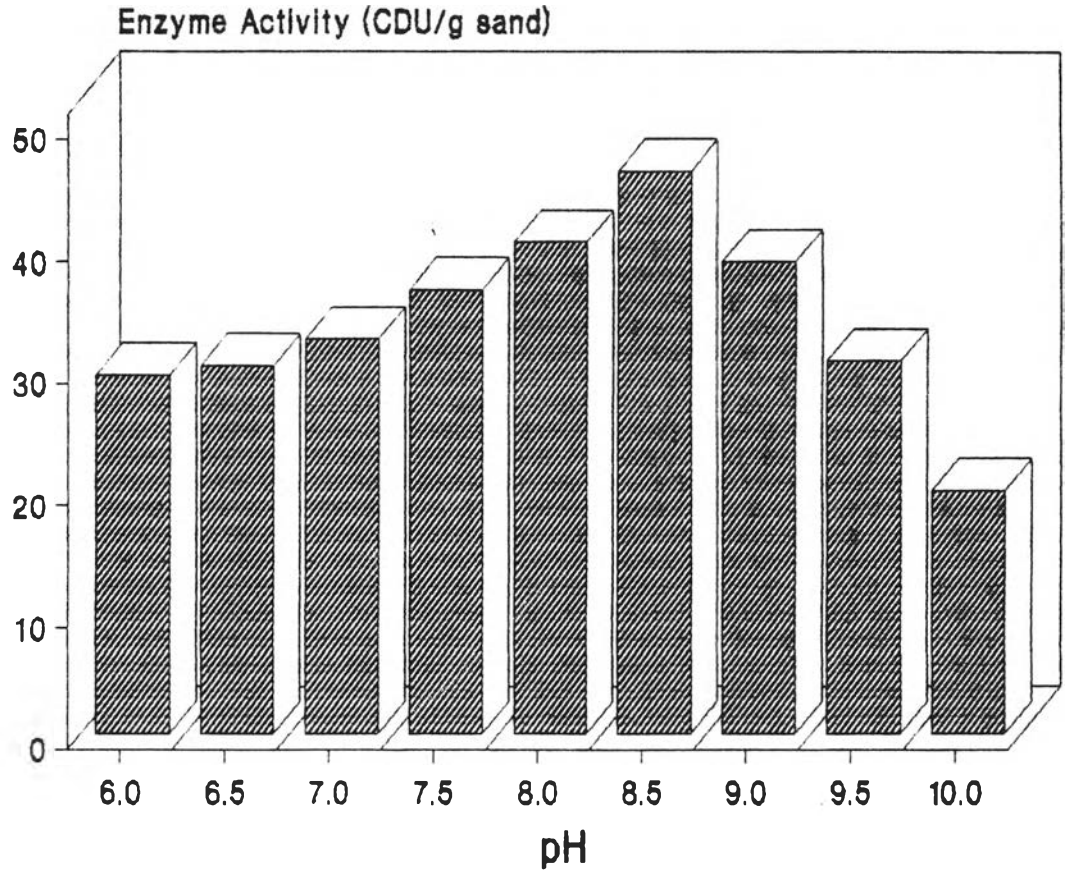
รูปที่ 4.2ข เวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการกระตุ้นทรายด้วย MM



รูปที่ 4.3ก ปริมาณกลูทารัลดีไฮด์ที่ใช้เมื่อทำการตรึงปาเปนบนทรายโดยใช้ MM เป็นตัวกระตุ้น

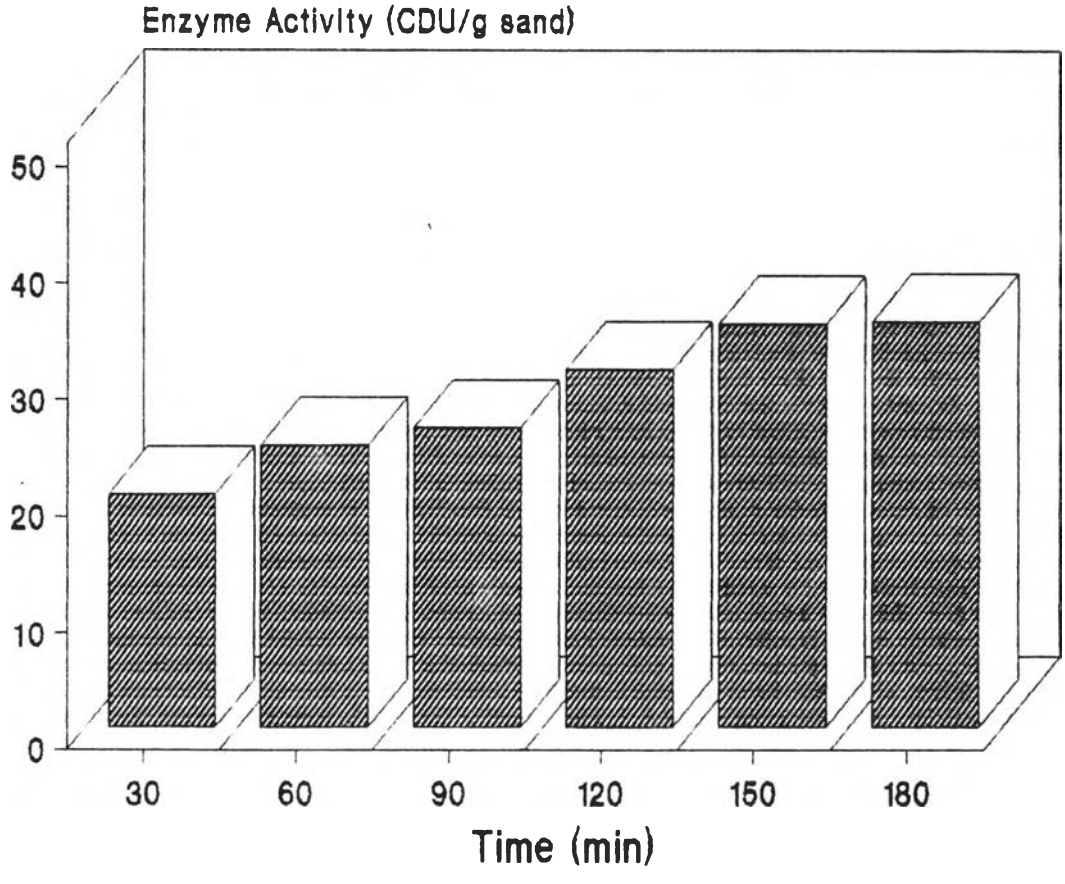


รูปที่ 4.3ข เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาระหว่างทรายที่ถูกกระตุ้นด้วย MM กับกลูทารัลดีไฮด์



รูปที่ 4.4 อิทธิพลของความเป็นกรด-ด่างของสารละลายต่อการตรึงเอนไซม์

ตรึงปาเปนที่ถูกกระตุ้นด้วย MM (0.25 กรัม) และมีกลูทารัลดีไฮด์ (1.25%) เป็นสารเชื่อมข้าม สารละลายเอนไซม์ถูกเตรียมในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้ 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



รูปที่ 4.5 แสดงเวลาที่ใช้ในการคริงปาเปนบนทราย

คริงปาเปนบนทรายที่ถูกกระตุ้นด้วย MM และมีกลูทารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมข้าม สารละลายเอนไซม์เคริยมใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 แปรผันเวลาที่ใช้ในการคริงเอนไซม์ ตั้งแต่ 30-180 นาที

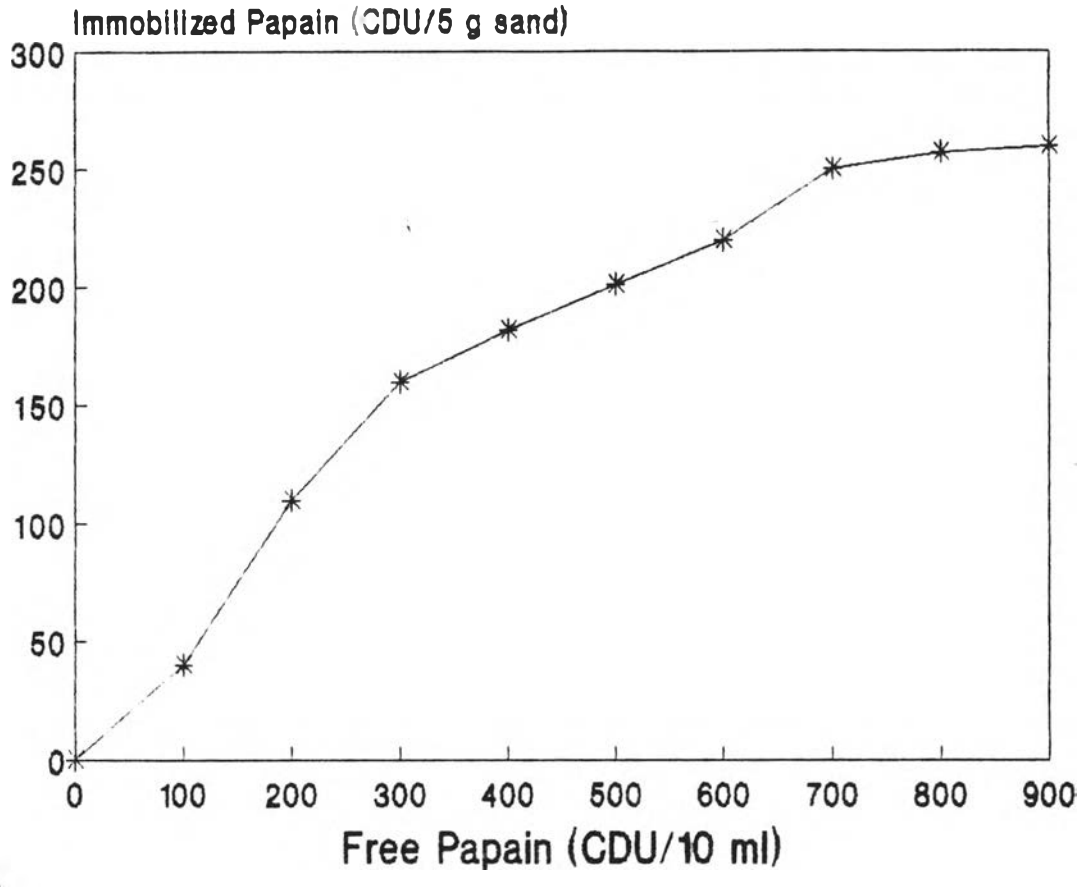
ปาเปนที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิต (yield) สูงสุด โดยตริงปาเปนบนทรายที่ใช้ MM เป็นตัวกระตุ้น (0.3 กรัม, 90 นาที) และใช้กลูทารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมข้าม (1.25 เปอร์เซ็นต์, 30 นาที) อัตราส่วนระหว่างสารละลายเอนไซม์กับทรายเท่ากับ 10 มิลลิลิตร : 5 กรัม แปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ (ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ตั้งแต่ 100 ถึง 900 CDU (สารละลายเอนไซม์เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 8.5) หาแอคติวิตีทั้งหมดของปาเปนตริงรูปจำนวน 5 กรัม ผลการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปจะสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 700 CDU ขึ้นไป แอคติวิตีของปาเปนตริงรูปจะคงที่ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 700 CDU โดยสามารถตริงเอนไซม์ได้ 250 CDU/5 กรัม ทราย คิดเป็นผลผลิต (yield) เท่ากับ 35.7 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.6)

5. <u>ผลการศึกษาอิทธิพลของซีสเตอีนและ EDTA ต่อแอคติวิตีของปาเปนตริงรูป</u>

ตริงเอนไซม์โดยใช้ภาวะที่เหมาะสม โดยเติมสารเคมี คือ EDTA หรือซีสเตอีน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในสารละลายเอนไซม์ปาเปนเปรียบเทียบกับการตริงเอนไซม์ที่ไม่มีการเติมสารใดๆ เลย (ตารางที่ 4.2) พบว่าซีสเตอีนทำให้แอคติวิตีของปาเปนตริงรูปสูงขึ้นประมาณ 2.4 เท่า เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารเคมีใดๆ และเมื่อเติมซีสเตอีน 20 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ แอคติวิตีของปาเปนตริงรูปจะเพิ่มขึ้นประมาณ 5.9 เท่า ส่วนการเติม EDTA เพียงอย่างเดียวมีผลต่อแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปน้อยมาก

6. <u>การเปรียบเทียบสมบัติของปาเปนตริงรูปบนทรายด้วยพันธะโคเวเลนต์กับปาเปนอิสระ</u>

สมบัติของเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ค่า Michaelis constant หรือ K_m และความเสถียรของเอนไซม์



รูปที่ 4.6 แสดงค่าความเข้มข้นของปาเปนที่ใช้ในการตรึงปาเปนบนทราย

ตรึงปาเปนบนทราย โดยใช้สารละลายเอนไซม์กับทรายในอัตราส่วนเท่ากับ 10 มิลลิลิตร : 5 กรัม แปรผันปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดตั้งแต่ 100-900 CDU/10 มิลลิลิตร (เตรียมใน 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 8.5) แอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปคิดเป็นแอคติวิตีทั้งหมดของทราย 5 กรัม

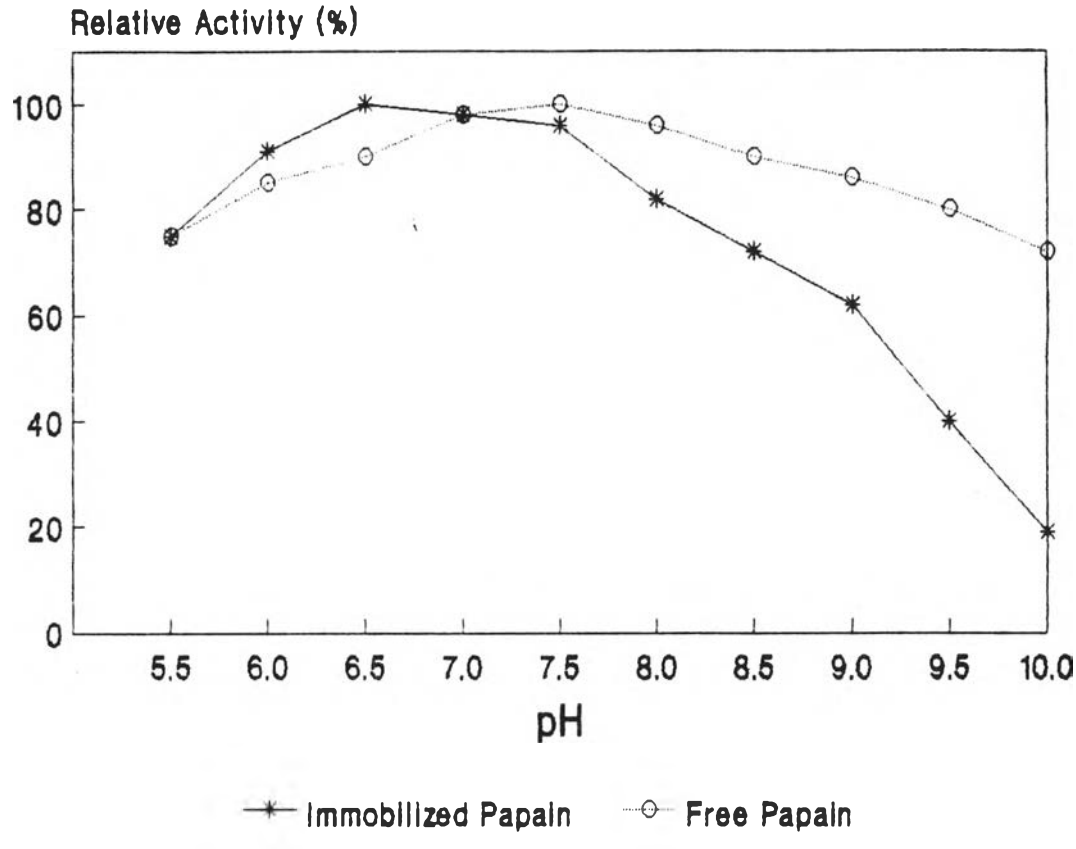
ตารางที่ 4.2 อิทธิพลของซีสเตอีนและ EDTA ต่อแอคติวิตีของปาเปนตริงรูป

สารเคมี	ปริมาณ (mM)	แอคติวิตีของปาเปนตริงรูป (CDU/กรัม ทราย)
-	-	10
EDTA	10	12
cystein	10	24
EDTA + cystein	10 + 2	15
EDTA + cystein	10 + 5	22
EDTA + cystein	10 + 10	38
EDTA + cystein	10 + 20	59
EDTA + cystein	10 + 30	59
EDTA + cystein	10 + 40	60

6.1 ผลการเปรียบเทียบ pH ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเคซีนระหว่างปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ ตรวจสอบแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ โดยละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 5.5-10 (pH 5.5-6 ใช้สารละลายแอซีเทรตบัฟเฟอร์ pH 6-7.5 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5-9.5 ใช้สารละลาย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ และ pH 9.5-10 ใช้สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) ผลการทดลองพบว่าปาเปนอิสระจะสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนได้ดีในช่วง pH ที่กว้างกว่าปาเปนตริงรูป คือ ตั้งแต่ pH 5.5-10 ส่วนปาเปนตริงรูปสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนได้ดีในช่วง pH 6-8 เท่านั้น pH ที่เหมาะสมที่สุดของปาเปนอิสระคือ 7.5 ส่วน pH ที่เหมาะสมที่สุดของปาเปนตริงรูป คือ 6.5 (รูปที่ 4.7)

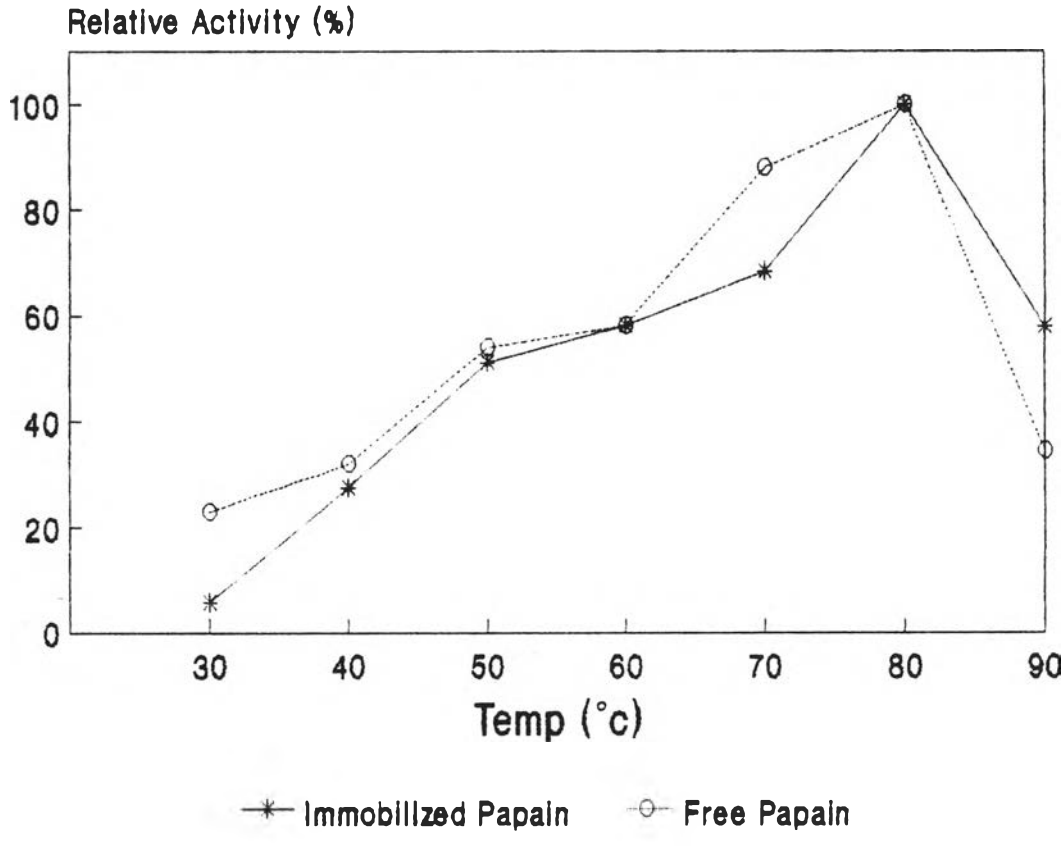
6.2 ผลการเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายเคซีนระหว่างปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ ตรวจสอบแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ โดยใช้สารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มตั้งแต่ 30-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที พบว่าปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำแอคติวิตีของเอนไซม์จะค่อนข้างน้อยแล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่มากขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ของโมเลกุลของเอนไซม์กับซับสเทรต ทำให้เกิดการชนกันได้มากขึ้นต่อหน่วยเวลา แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 80 องศาเซลเซียสแล้ว แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 4.8)

6.3 ผลการเปรียบเทียบความเสถียรของปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระที่ pH ต่างๆ บ่มปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีค่า pH แตกต่างกัน ตั้งแต่ pH 4-12 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระมี



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบสภาพความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเคซีนระหว่างปาเปนตรึงรูปกับปาเปนอิสระ

วัดแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปกับปาเปนอิสระ โดยใช้สารละลายเคซีนในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 5.5-10 เป็นซับสเทรต บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (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 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 9.5-10)



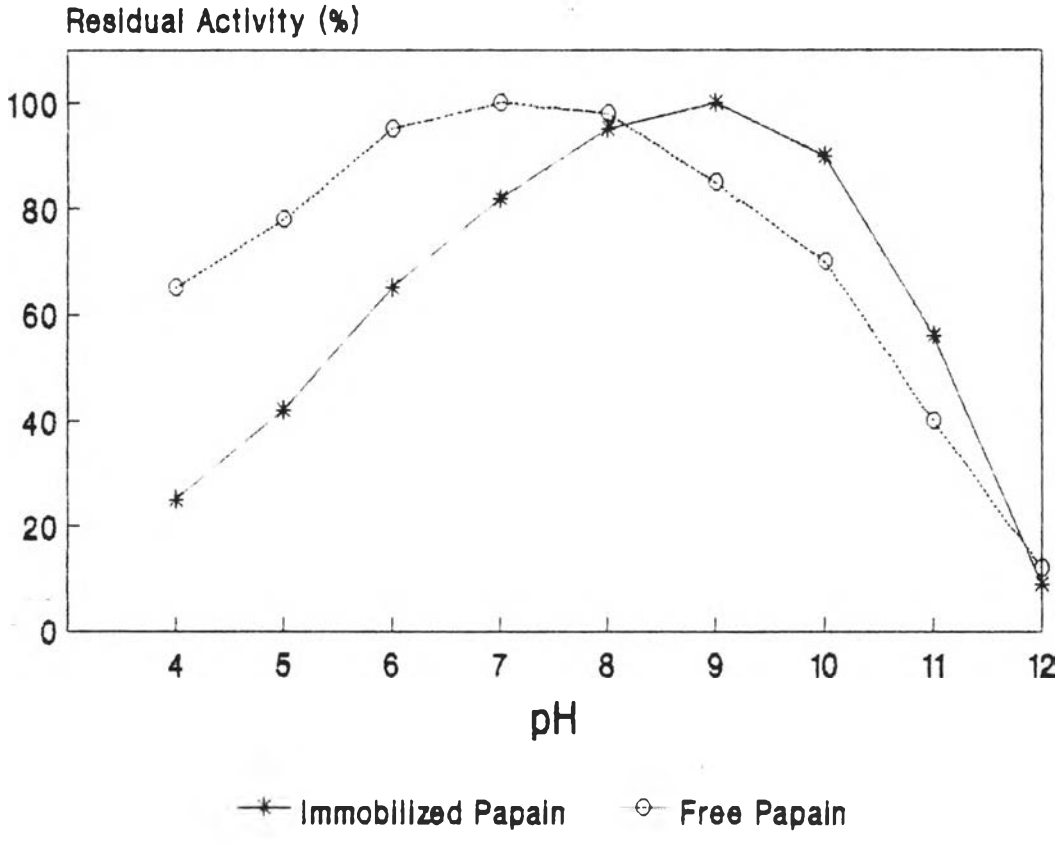
รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเคซีนระหว่างปาเปนดริงรูปกับปาเปนอิสระ

วัดแอคติวิตีของปาเปนดริงรูปกับปาเปนอิสระ โดยใช้สารละลายเคซีน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต แปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับซับสเทรตในช่วง 30-90 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการบ่ม 15 นาที

ความเสถียรต่อ pH แตกต่างกัน คือ ในช่วง pH ที่เป็นด่าง (8-10) ปาเปนตริงรูปจะมีความเสถียรมากกว่า แต่ทั้งปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระจะมีแอคติวิตีเหลือน้อยที่สุดที่ pH 12 (รูปที่ 4.9)

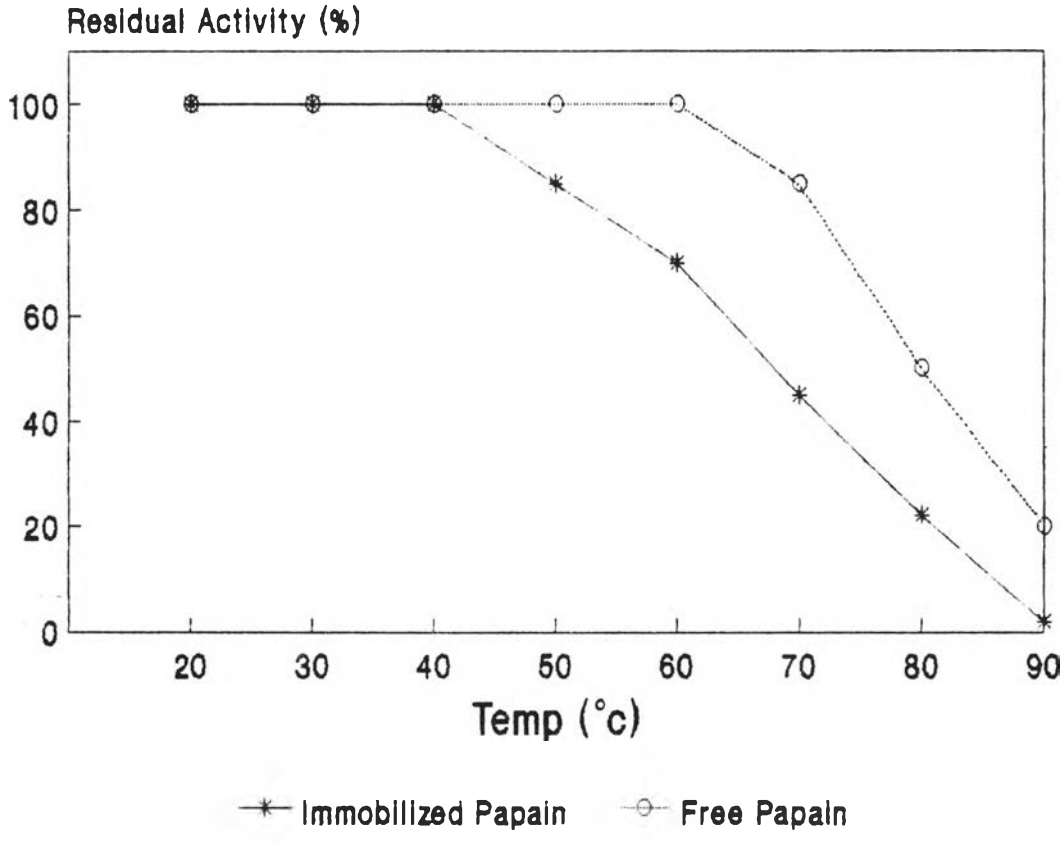
6.4 <u>ผลการเปรียบเทียบความเสถียรระหว่างปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระที่อุณหภูมิต่างๆ</u> บ่มปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ ตั้งแต่ 20-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้สารละลายเคซีน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเตรท ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปาเปนอิสระมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าปาเปนตริงรูป โดยปาเปนอิสระจะมีความเสถียรถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่ปาเปนตริงรูปมีความเสถียรถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเท่านั้น ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ปาเปนตริงรูปจะสูญเสียแอคติวิตีเกือบทั้งหมด ในขณะที่ปาเปนอิสระยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่บ้าง (รูปที่ 4.10)

6.5 <u>ผลการเปรียบเทียบค่า Michaelis constants (K_m) ระหว่างปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระโดยใช้เคซีนเป็นซับสเตรท</u> ตรวจสอบแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ โดยแปรผันความเข้มข้นของซับสเตรทเคซีน ตั้งแต่ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถึง 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของแอคติวิตีของเอนไซม์ (1/v) กับส่วนกลับของความเข้มข้นของเคซีน (1/[s]) โดย Lineweaver-Burk plot จากกราฟสามารถคำนวณค่า K_m ของปาเปนอิสระได้เท่ากับ 3.77 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนค่า K_m ของปาเปนตริงรูปมีค่าเท่ากับ 4.319 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.11ก และ 4.11ข) แสดงให้เห็นว่าปาเปนอิสระมีความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับซับสเทรตเคซีนดีกว่าปาเปนตริงรูป



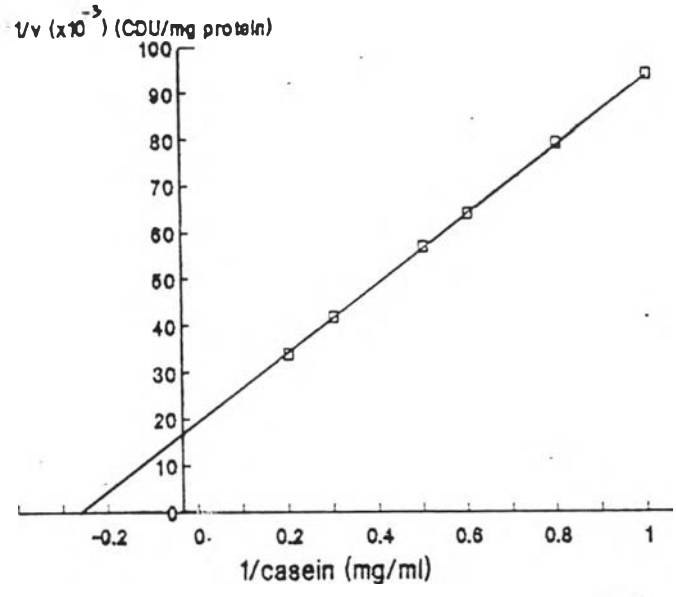
รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบความเสถียรของปาเปนครึงรูปกับปาเปนอิสระที่สภาพความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

บ่มปาเปนครึงรูปและปาเปนอิสระในสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ตั้งแต่ 4-12 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้สารละลายเคซีน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต (สารละลายแอซีเทรตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 4-6 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 6-8 สาระลายทริสไฮดโรคลอไรด์บัฟเฟอร์สำหรับ pH 8-10 สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ สำหรับ pH 10-12)



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบความเสถียรต่ออุณหภูมิของปาเปนตรึงรูปกับปาเปนอิสระ

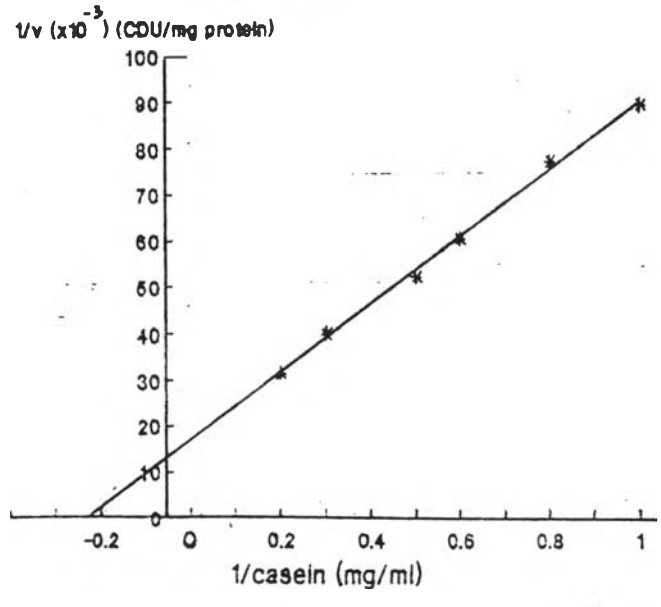
บ่มปาเปนตรึงรูปและปาเปนอิสระ ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 20-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดแอคติวิตีที่เหลือของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้สารละลายเคซีน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เป็นซับสเทรต อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.11ก กราฟ Lineweaver-Burk plot ของปาเปนอิสระโดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต

$1/K_m$ = 0.265 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)$^{-1}$

K_m = 3.77 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 4.11ข กราฟ Lineweaver-Burk plot ของปาเปนครึ่งรูปโดยใช้เคซีนเป็นซับสเทรต

$1/K_m$ = 0.232 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)$^{-1}$

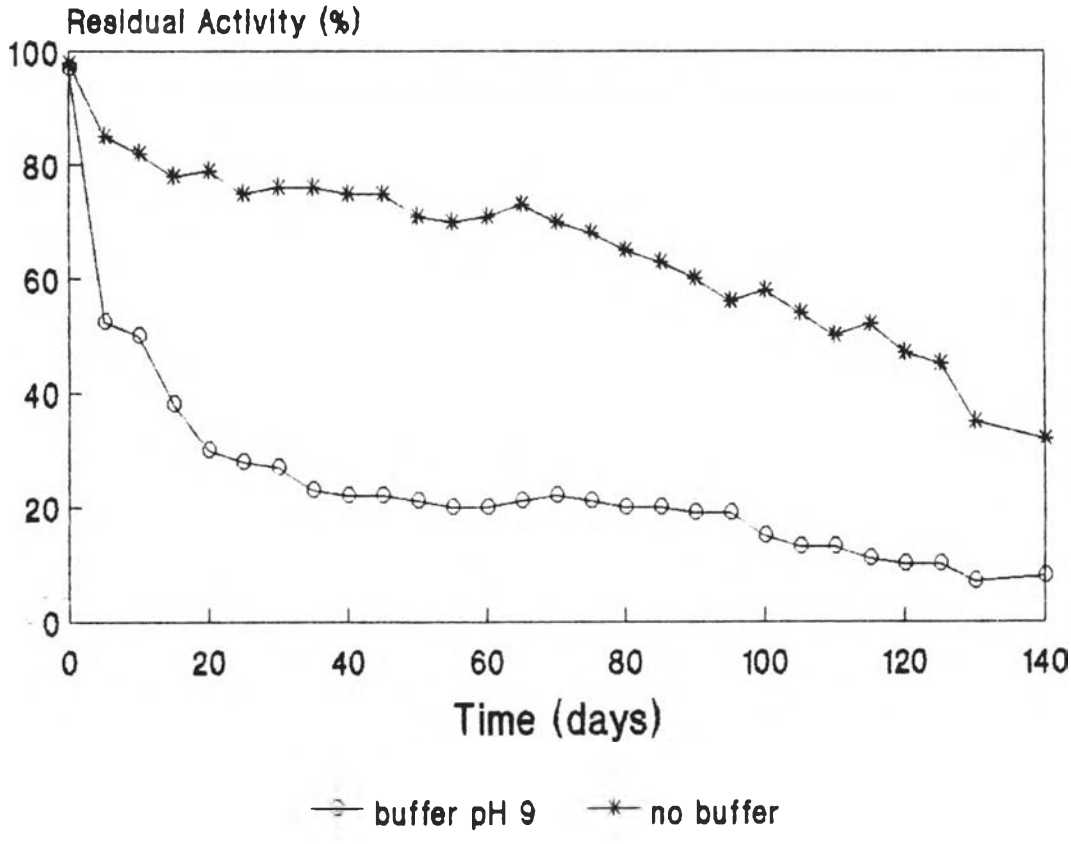
K_m = 4.319 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

6.6 ผลการศึกษาความเสถียรต่ออายุการเก็บของปาเปนตริงรูป นำปาเปนตริงรูปมาเก็บรักษาในภาวะที่แตกต่างกัน 2 ภาวะ คือ 1. เก็บรักษาปาเปนตริงรูปในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2. เก็บรักษาปาเปนตริงรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยปราศจากสารละลายบัฟเฟอร์

ทำการเก็บตัวอย่างของปาเปนตริงรูปที่เก็บรักษาทั้ง 2 ภาวะ มาตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลือ เป็นระยะเวลา 140 วัน พบว่าปาเปนตริงรูปที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปราศจากสารละลายบัฟเฟอร์ มีอัตราการสูญเสียแอคติวิตีน้อยกว่าปาเปนตริงรูปที่ถูกเก็บรักษาในสารละลายบัฟเฟอร์ (รูปที่ 4.12)

6.7 ผลการศึกษาความเสถียรต่อการย่อยสลายเคซีนของคอลัมน์ปาเปนตริงรูปแบบต่อเนื่อง เพื่อศึกษาอายุการใช้งานของคอลัมน์เอนไซม์ปาเปนที่ถูกตริงบนทรายด้วยพันธะโคเวเลนซ์ ว่าจะสามารถนำมาใช้ย่อยสลายเคซีนได้เป็นระยะเวลานานกี่วัน เตรียมคอลัมน์ปาเปนตริงรูป โดยมีการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้คงที่ที่ 40 องศาเซลเซียส ป้อนเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 อย่างต่อเนื่อง ให้อัตราการป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง นำสารละลายในแต่ละแฟรคชั่นไปตกตะกอนเคซีนด้วย 30 เปอร์เซ็นต์ กรดไตรคลอโรแอซีติก อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร หาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น ผลการทดลองพบว่าคอลัมน์ของปาเปนตริงรูปสามารถย่อยสลายเคซีนได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน 7 วัน โดยที่แอคติวิตียังคงที่ (รูปที่ 4.13)

6.8 ผลการศึกษาความเสถียรต่อการย่อยสลายเคซีนของปาเปนตริงรูปในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง ข้อได้เปรียบที่สำคัญอีกประการหนึ่งของเอนไซม์ตริงรูปคือ การที่สามารถนำเอนไซม์ตริงรูปกลับมาใช้งานได้อีก ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเสถียรของการใช้งานของปาเปนตริงรูปเมื่อนำมาย่อยสลายเคซีนซ้ำหลายๆ ครั้ง

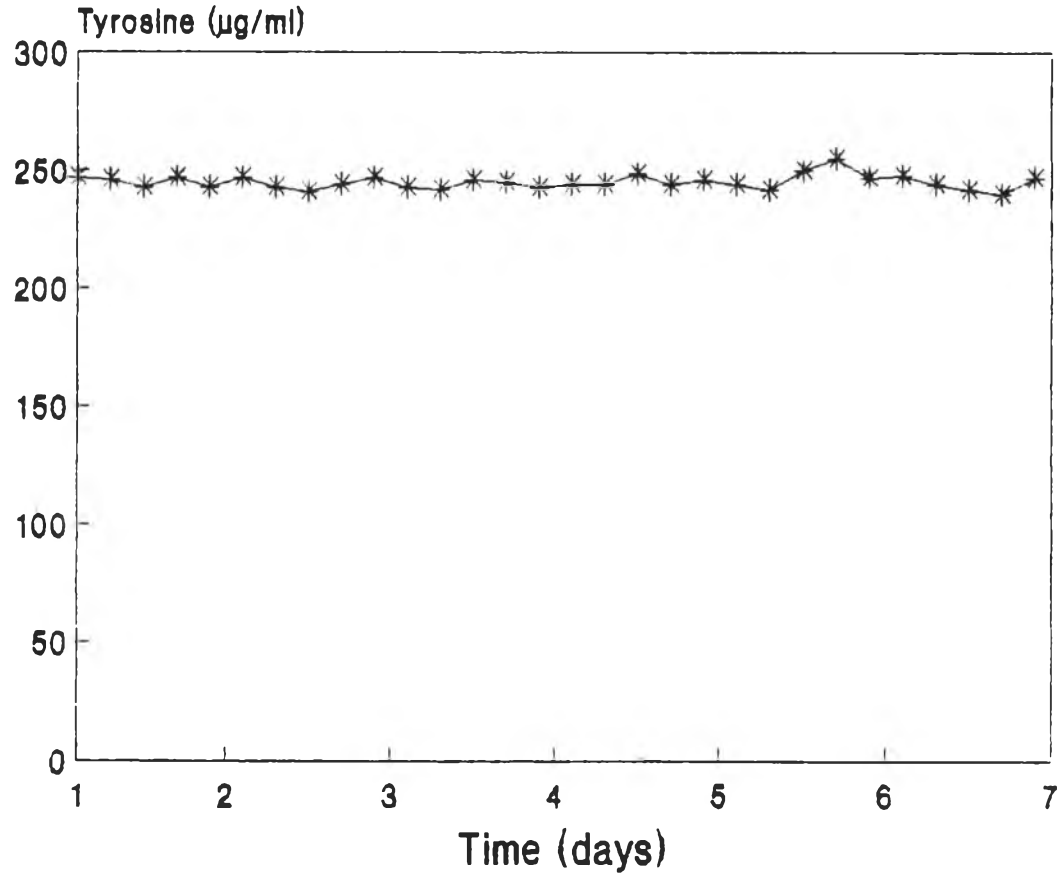


รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบความเสถียรของปาเปนตริงรูปที่เก็บในภาวะต่างๆ

เก็บรักษาปาเปนตริงรูปในภาวะที่แตกต่างกัน 2 ภาวะ คือ

1. เก็บรักษาในสารละลาย 0.05 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 9 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปราศจากสารละลายบัฟเฟอร์



รูปที่ 4.13 ความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนของปาเปนตริงรูปในลักษณะแบบต่อเนื่อง

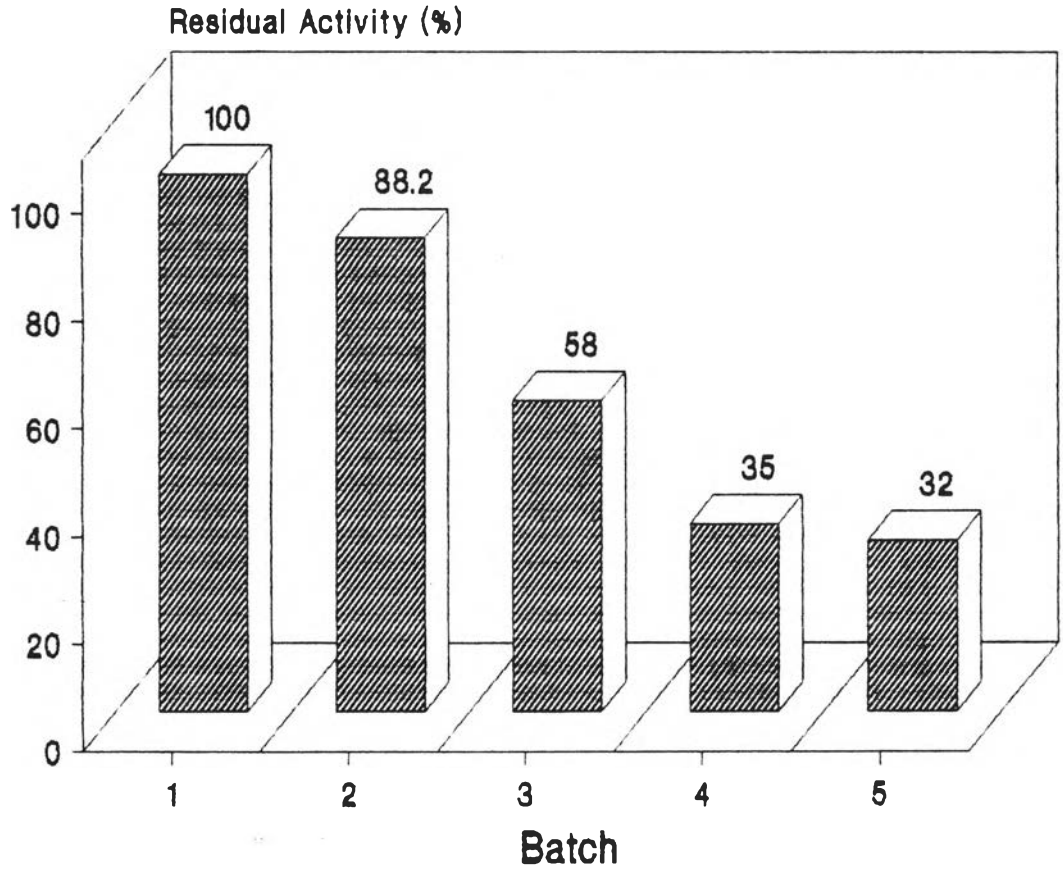
บรรจุปาเปนตริงรูปหนัก 40 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ลงในคอลัมน์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.6 เซนติเมตร ความยาว 35 เซนติเมตร ป้อนซับสเทรตเคซีน (ใน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7) ด้วยอัตราการป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตร/ชั่วโมง โดยมีการควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ให้คงที่ที่ 40 องศาเซลเซียส

เมื่อทดสอบความเสถียรของปาเปนคริงรูปในระบบใช้ซ้ำทีละงวดไม่ต่อเนื่อง (batch system) โดยใช้ปาเปนคริงรูปเติมลงในสารละลายเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ (5 มล.) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทาการตรวจสอบแอคติวิตีของปาเปนคริงรูป จากนั้นนาปาเปนคริงรูปกลับมาใช้ย่อยสลายสารละลายเคซีนซ้ำอีก 4 ครั้ง พบว่า หลังการใช้งานครั้งที่ 2 แอคติวิตีของปาเปนคริงรูปลดลงเหลือ 88.2 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น) และเหลือ 35-32 เปอร์เซ็นต์ หลังการใช้งานครั้งที่ 4 และ 5 ตามลาดับ (รูปที่ 4.14) แสดงให้เห็นว่าปาเปนคริงรูปบนทรายสามารถนากลับมาใช้ย่อยสลายเคซีนในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่องได้ประมาณ 2 ครั้ง

<u>การลดโปรตีนในน้ำยางสดด้วยปาเปนคริงรูปบนทราย</u>

น้ำยางสดที่ใช้ในงานวิจัย เป็นน้ำยางที่ได้จากยางพันธุ์ RRIM 600 รักษาสภาพน้ำยางภายหลังการกรีด โดยเติมแอมโมเนีย 0.3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และ Triton X-100 1.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) เก็บน้ำยางไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ก่อนนาน้ำยางมาใช้จะต้องเจือจางด้วยน้ากลั่นเพื่อให้น้ำยางที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง (DRC) เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ ทุกครั้ง

การนาปาเปนคริงรูปบนทรายมาใช้กับน้ำยางสด ระบบที่คิดว่าเหมาะสมที่สุดที่ใช้ในงานวิจัยก็คือ ระบบใช้ซ้ำทีละงวดไม่ต่อเนื่อง (batch system) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ปาเปนคริงรูปในระบบต่อเนื่องแบบคอลัมน์ อนุภาคยางที่แขวนลอยอยู่ในชั้นน้าเกิดการจับตัวทาให้คอลัมน์อุดตันได้ง่าย การวัดแอคติวิตีของปาเปนในการลดปริมาณโปรตีนทำโดยทำให้ยางจับตัวโดยการอบไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นรีดเป็นแผ่นบาง ล้างน้ำและอบให้แห้ง และหาปริมาณโปรตีนในรูปของไนโตรเจนทั้งหมดในยางแห้ง (ปริมาณโปรตีน% = 6.25xปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด) เปรียบ



รูปที่ 4.14 ความเสถียรของการย่อยสลายเคซีนของปาเปนตริงรูปในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง

นำปาเปนตริงรูปมาย่อยสลายสารละลายเคซีน 0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แยกปาเปนตริงรูปออก แล้วนำกลับมาย่อยสลายเคซีนซ้ำอีก 4 ครั้ง

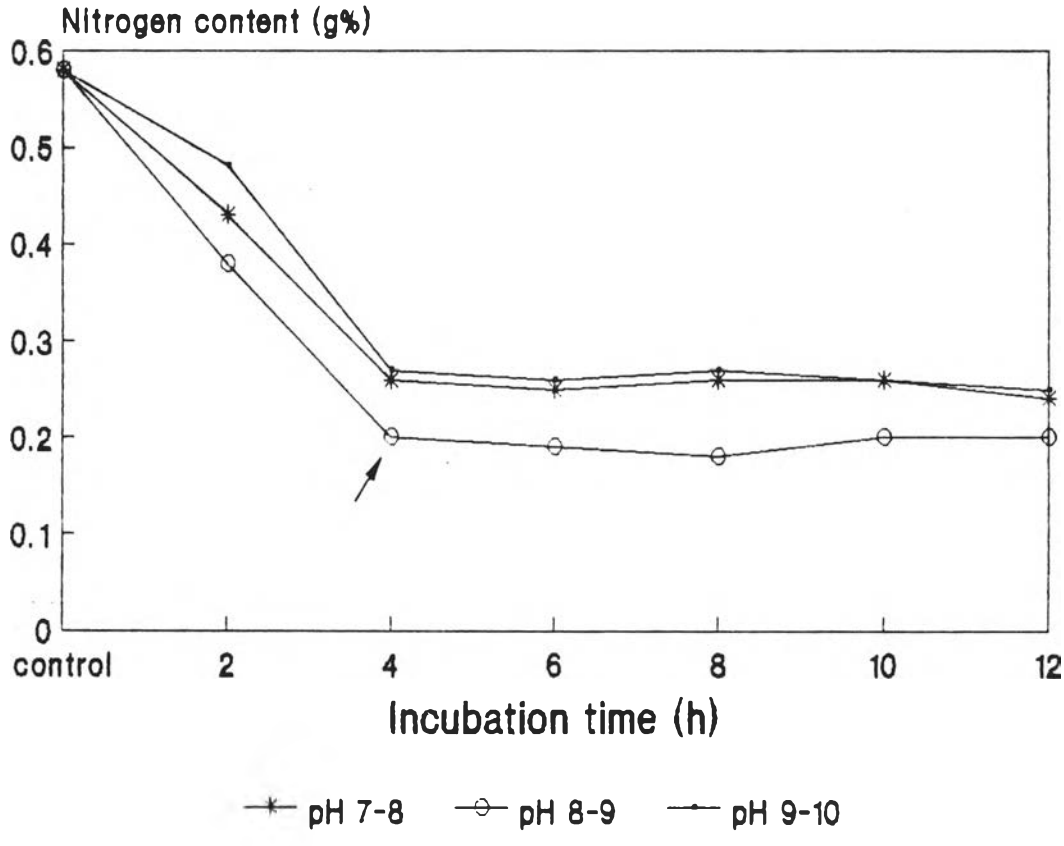
เทียบกับยางควบคุมที่เตรียมจากน้ำยางงวดเดียวกัน ภาวะที่ใช้ในการทดลองเหมือนกัน แต่ปราศจากปาเปนดริงรูป

1. ภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณโปรตีนของปาเปนดริงรูป

การตรวจสอบแอคติวิตีของปาเปนดริงรูปจากการทดลองที่ผ่านมาใช้สารละลายเคซีนเป็นซับสเตรท ภาวะที่ใช้จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมกับสารละลายเคซีน แต่เนื่องจากน้ำยางสดมีองค์ประกอบของยางและสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนอยู่ด้วย ดังนั้นจึงศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางสด โดยแปรผันปัจจัยต่างๆ ได้แก่ pH อุณหภูมิ เวลา และปริมาณเอนไซม์ โดยใช้น้ำยางที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับปาเปนดริงรูปในช่วง 1-7 กรัม ทราย ด้วย magnetic stirrer โดยเทียบปริมาณปาเปนดริงรูปบนทรายในหน่วย CDU (casein digestion unit) พิจารณาอิทธิพลของปัจจัยแต่ละตัวจากปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในยางแห้ง (ปริมาณโปรตีน % = 6.25 x ปริมาณไนโตรเจรทั้งหมด) ตัวควบคุมคือน้ำยางที่มีภาวะเช่นเดียวกับการทดลองแต่ปราศจากปาเปนดริงรูป ผลการทดลองพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการลดไนโตรเจนด้วยปาเปนดริงรูป คือ ใช้น้ำยางสดที่มี pH ประมาณ 8-9 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4.15 4.16 และ 4.17) ส่วนปริมาณปาเปนดริงรูปที่ใช้ พบว่าการที่จะสามารถลดปริมาณโปรตีนให้เหลือน้อยที่สุดต้องใช้ปาเปนดริงรูป อย่างน้อย 200 CDU ขึ้นไป ในภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นปาเปนดริงรูปสามารถลดปริมาณไนโตรเจนในยางแห้งให้เหลือ 0.37 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น 0.67 เปอร์เซ็นต์ หรือ 45 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงจากปริมาณดั้งเดิม (100%) (รูปที่ 4.18)

2. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดโปรตีนของปาเปนดริงรูปกับปาเปนอิสระ

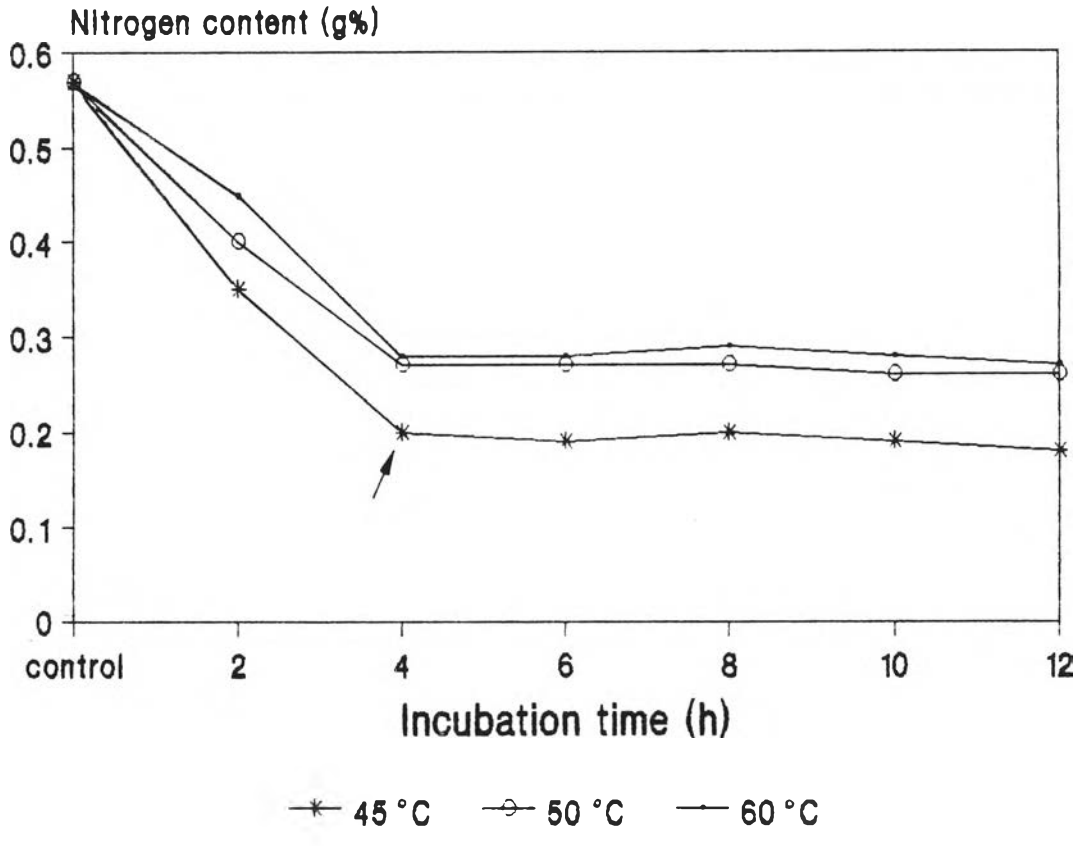
เตรียมยางโปรตีนต่ำ จากน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ปาเปนดริงรูปและปาเปนอิสระ กำหนดให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีปริมาณ



รูปที่ 4.15 แสดงสภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำยางสดที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนด้วยปาเปนตริงรูป

เริ่มต้นจากน้ำยางสด 20 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยเติมแอมโมเนีย 25% หรือระเหยแอมโมเนียออก ปรับให้อุณหภูมิคงที่ 45 องศาเซลเซียส แล้วเติมปาเปนตริงรูป 200 CDU (4 กรัม ทราย) นำน้ำยางไปจับตัวด้วยไอน้ำ รีด อบแห้ง และหาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ เทียบกับยางควบคุม

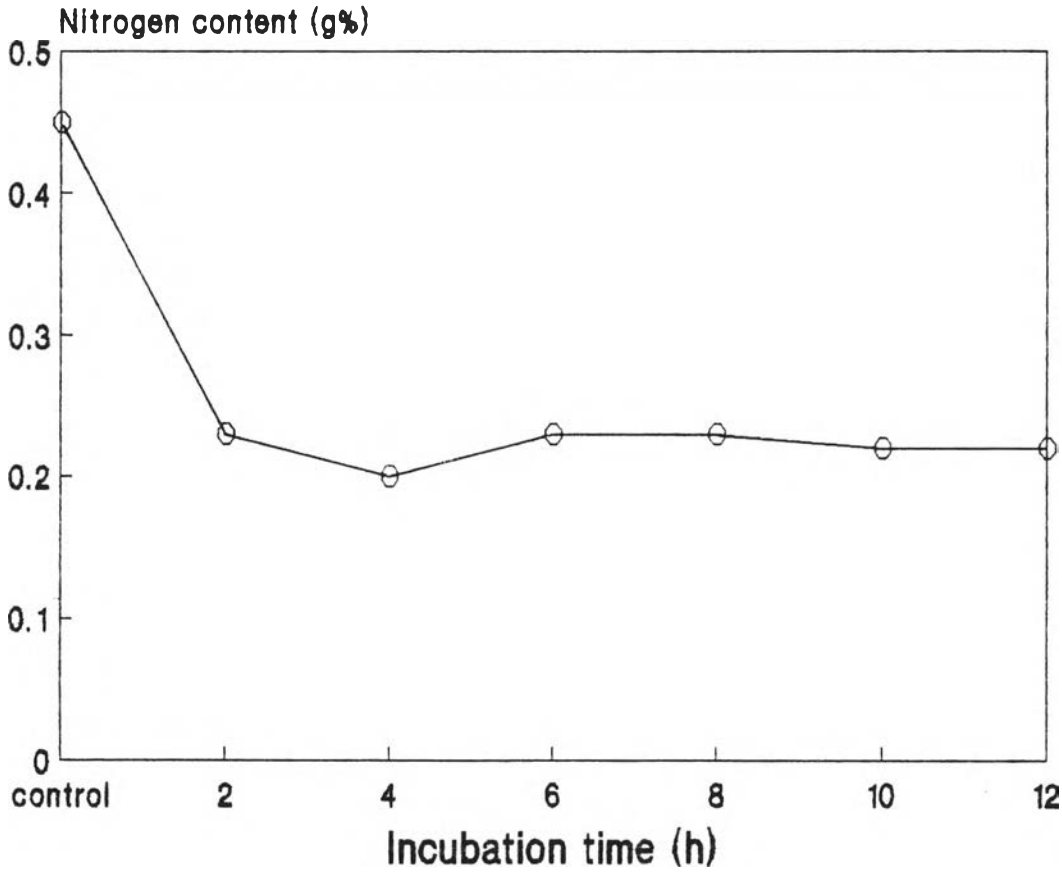
control = ยางควบคุมที่ไม่มีการเติมปาเปนตริงรูป



รูปที่ 4.16 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนด้วยปาเปนดริงรูป

เริ่มต้นจากน้ำยางสด 20 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.5 ด้วยแอมโมเนีย 25% ปรับอุณหภูมิเป็น 45 50 หรือ 60 องศาเซลเซียส เติมปาเปนดริงรูป 200 CDU กวนที่อุณหภูมิที่กำหนด นำน้ำยางไปจับตัวด้วยไอน้ำ รีด อบแห้ง และหาปริมาณไนโตรเจนที่เหลือ เทียบกับยางควบคุม

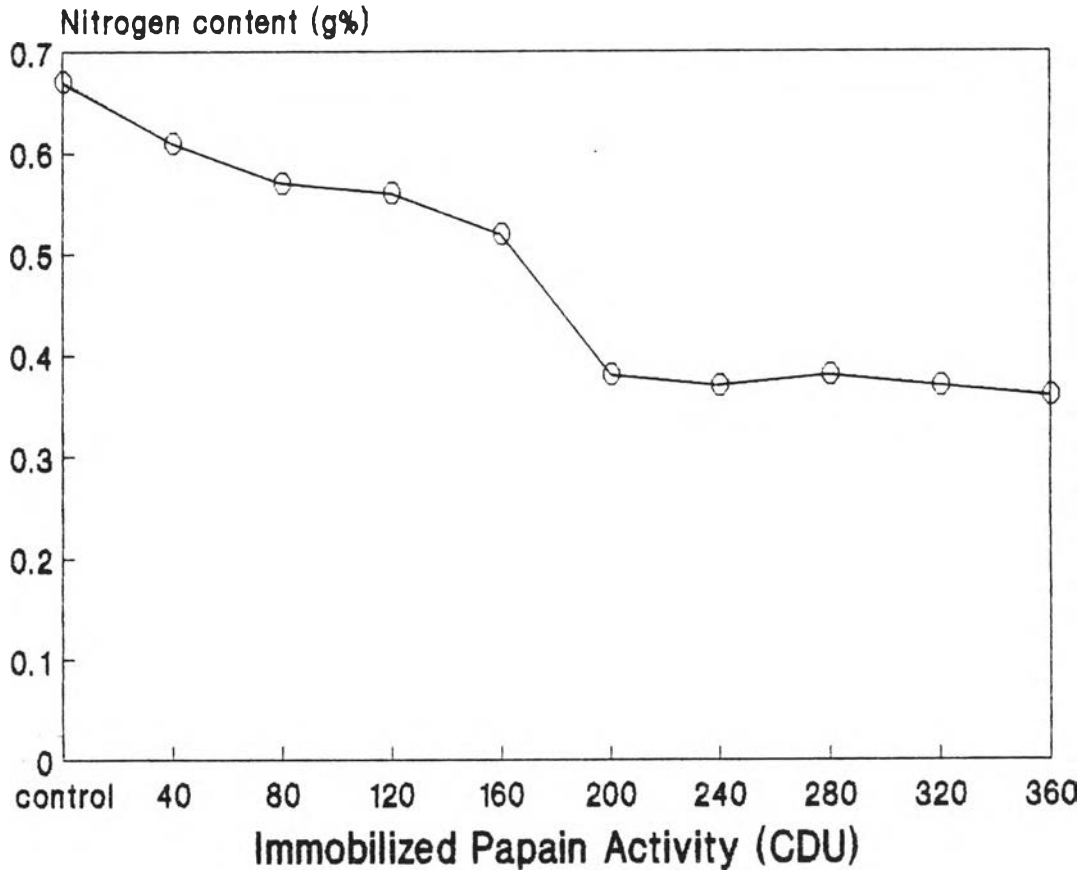
control = ยางควบคุมที่ไม่มีการเติมปาเปนดริงรูป



รูปที่ 4.17 แสดงเวลาที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนด้วยปาเปนตริงรูป

เริ่มต้นจากน้ำยางสดที่มีค่า pH 8.5 ปรับอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียส เติมปาเปนตริงรูป 200 CDU แปรผันเวลาที่ใช้ในการกวนน้ำยางกับปาเปนตริงรูป ตั้งแต่ 2-12 ชั่วโมง

control = ยางควบคุมที่ไม่มีการเติมปาเปนตริงรูป



รูปที่ 4.18 แสดงปริมาณปาเปนตริงรูปที่เหมาะสมต่อการลดปริมาณไนโตรเจนในน้ำยางสด

ใช้น้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25% pH 8.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แปรผันปริมาณปาเปนตริงรูปที่ใช้ ตั้งแต่ 40-360 CDU หรือ 0.8-7.2 กรัม ทราย กวนน้ำยางกับปาเปนตริงรูปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

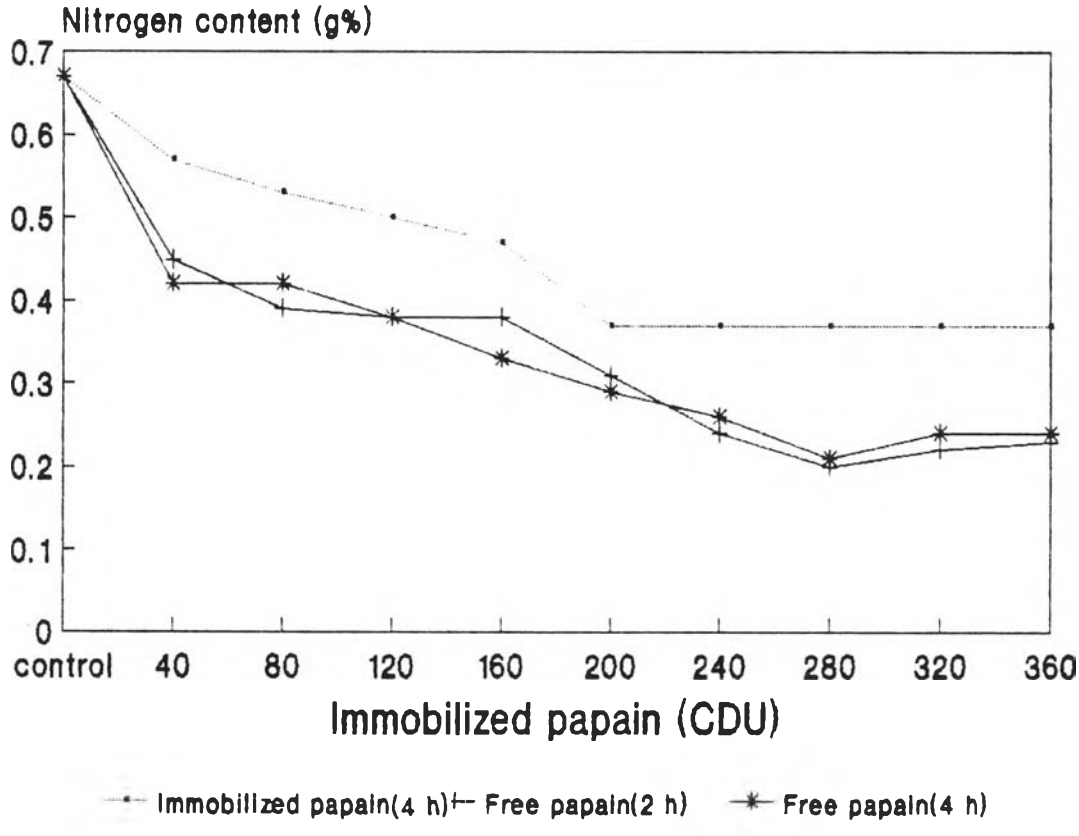
control = ยางควบคุมที่ไม่มีการเติมปาเปนตริงรูป

ตั้งแต่ 40-360 CDU (ปาเปนอิสระเตรียมในรูปของสารละลาย) ภาวะที่ใช้คือ ที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พิจารณาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้จากปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงในยางแห้ง (ปริมาณโปรตีน % = 6.25 x ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด) เมื่อใช้ยางแห้งที่เตรียมได้จากน้ำยาง pH 8.5 เป็นตัวควบคุม ภายใต้ภาวะเดียวกับการทดลองแต่ปราศจากเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า ที่ปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่เท่ากัน ปาเปนอิสระมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไนโตรเจนได้ดีกว่าปาเปนตริงรูป เพราะสามารถลดปริมาณไนโตรเจนลงเหลือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.19)

3. <u>ผลการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้ปาเปนตริงรูปกับปาเปนอิสระ</u>

ในอุตสาหกรรมการผลิตยางดิบหรือยางธรรมชาติที่ไม่ได้ผ่านการวัลคาไนซ์จะมีวิธีการและข้อกำหนดในการตรวจสอบคุณภาพของผลผลิตยางดิบที่ได้ โดยวัดปริมาณสิ่งเจือปนที่ไม่ใช่ยาง ได้แก่ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ปริมาณผง (Dirt) ปริมาณเถ้า (Ash) ปริมาณสิ่งระเหย (Volatile Matter) ดัชนีสี (color) และสมบัติการยืดหยุ่นของยาง ได้แก่ ค่าความอ่อนตัวเริ่มแรก (P_o) และดัชนีความอ่อนตัวของยาง (PRI-Plasticity Retention Index)

สมบัติทางกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้ปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ทั้งสองเท่ากับ 200 CDU เท่ากันในภาวะการทดลองเหมือนกัน คือ ที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยทำให้ยางจับตัวด้วยไอน้ำ จากนั้นนำยางไปทดสอบสมบัติทางกายภาพของยางดิบ เปรียบเทียบกับยางควบคุม ที่เตรียมโดยใช้ภาวะดังกล่าวข้างต้น แต่เติมน้ำกลั่นแทนการเติมสารละลายเอนไซม์ ตารางที่ 4.3 แสดงผลการทดลอง 2 ครั้งๆ ละ 3 ซ้ำ พบว่า ยางโปรตีนต่ำที่ผลิตได้จากปาเปนอิสระมีปริมาณไนโตรเจนคงเหลืออยู่ในยางแห้งน้อยที่สุด 0.12-0.15 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าการใช้ปาเปนตริงรูป 200 CDU เท่ากัน ยางโปรตีนต่ำจากปาเปนตริงรูปมีปริมาณ



รูปที่ 4.19 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนในน้ำยางสดระหว่างปาเปนตริงรูปกับปาเปนอิสระ

เตรียมยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ ที่มีปริมาณตั้งแต่ 40-360 CDU ปาเปนตริงรูปใช้เวลาในการกวนกับน้ำยาง 4 ชั่วโมง ส่วนปาเปนอิสระใช้เวลาในการกวนกับน้ำยาง 2 และ 4 ชั่วโมง

control = ยางควบคุมที่ไม่มีการเติมปาเปนตริงรูปและปาเปนอิสระ

ตารางที่ 4.3 สมบัติทางกายภาพของยางดิบโปรตีนต่ำที่เตรียมได้จากปาเปนดริงรูปและปาเปนอิสระ

สมบัติยางดิบ	Exp. 1			Exp. 2		
	ยางดิบควบคุม	DPNR ปาเปนอิสระ*	DPNR ปาเปนดริงรูป*	ยางดิบควบคุม	DPNR ปาเปนอิสระ*	DPNR ปาเปนดริงรูป*
Nitrogen(g%)	0.54±0.014	0.12±0.025	0.28±0.020	0.57±0.025	0.15±1.070	0.30±0.230
Ash(g%)	0.21±0.148	0.37±0.660	0.30±0.120	0.29±0.012	0.32±0.088	0.34±0.012
Dirt(g%)	0.005±0.001	0.022±0.002	0.045±0.002	0.004±0.001	0.012±0.003	0.038±0.001
Volatile matter(g%)	0.31±0.103	0.28±0.097	0.27±0.010	0.25±0.033	0.22±0.049	0.25±0.047
P_o	40±1.5	42±0.60	40±0.50	34±1.4	26.2±5.4	33.6±2.1
PRI	85.9±3.8	73.5±4.5	82.6±7.0	95.6±3.7	85.7±7.0	87.3±3.5
Color index	6	6-7	6	6	7	5-6

* มีปริมาณเท่ากับ 200 CDU (n=3)

ยางควบคุม = น้ำยางที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ มีปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 25%

ไนโตรเจนเหลืออยู่ 0.28-0.37 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าปริมาณไนโตรเจนลดลงจากยางควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณสิ่งเจือปนที่ไม่ใช่ยาง ได้แก่ ปริมาณเถ้าและปริมาณผงยังคงสูงกว่ายางควบคุม ดัชนีสีคงที่ ส่วน P_o และ PRI แปรปรวนมาก จึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการโดยการเพิ่มขั้นตอนการแยกโปรตีนบางส่วนออกจากน้ำยาง ก่อนที่จะนำไปผลิตยางโปรตีนต่ำ

การแยกโปรตีนบางส่วนออกจากน้ำยางสด ใช้ 2 วิธี คือ 1. โดยการปั่นแยกน้ำยาง (centrifugation) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแยกส่วนที่เป็นน้ำยางออกจากส่วนประกอบอื่นๆ ได้ 2. โดยการเจือจางน้ำยาง (dilution) เป็นวิธีการลดปริมาณเนื้อยางแห้งให้น้อยลง มีผลให้ปริมาณโปรตีนน้อยลงด้วย

4. <u>ผลการศึกษาการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยน้ำยางสดที่ผ่านการแยกโปรตีนออกบางส่วน</u>

ปั่นแยกน้ำยางสดในเครื่องเซ็นติฟิวจ์ (Beckman) ที่ความเร็ว 10,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกเฉพาะชั้นอนุภาคยางส่วนที่เป็นชั้นบนสุดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ค่าปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 34 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูป เปรียบเทียบกับยางโปรตีนต่ำที่ได้จากน้ำยางที่ไม่ได้ผ่านการปั่นแยก แต่เจือจางโดยเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากัน ผลการทดลองพบว่า เมื่อเจือจางปริมาณเนื้อยางแห้งให้น้อยลงปริมาณไนโตรเจนของยางโปรตีนต่ำจะลดลงด้วย แต่วิธีการปั่นแยกน้ำยางจะให้ประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนได้ดีกว่า คือทำให้ปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่ในยางแห้งประมาณ 0.15-0.18 เปอร์เซ็นต์ หรือลดไนโตรเจนลงได้ 73-78 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น ในขณะที่วิธีเจือจาง ลดปริมาณไนโตรเจนได้เพียง 55 เปอร์เซ็นต์ ที่ปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูประหว่าง วิธีการปั่นแยกน้ำยางกับการเจือจางน้ำยาง

DRC (%)	DPNR จากการปั่นแยกน้ำยาง		DPNR จากการเจือจางน้ำยาง	
	Nitrogen (g%)	Nitrogen reduction (%)	Nitrogen (g%)	Nitrogen reduction (%)
34	0.23	66	0.67	0
25	0.18	73	0.46	31
20	0.18	73	0.44	34
10	0.15	78	0.30	55
Latex (control)	0.67	-	0.67	-

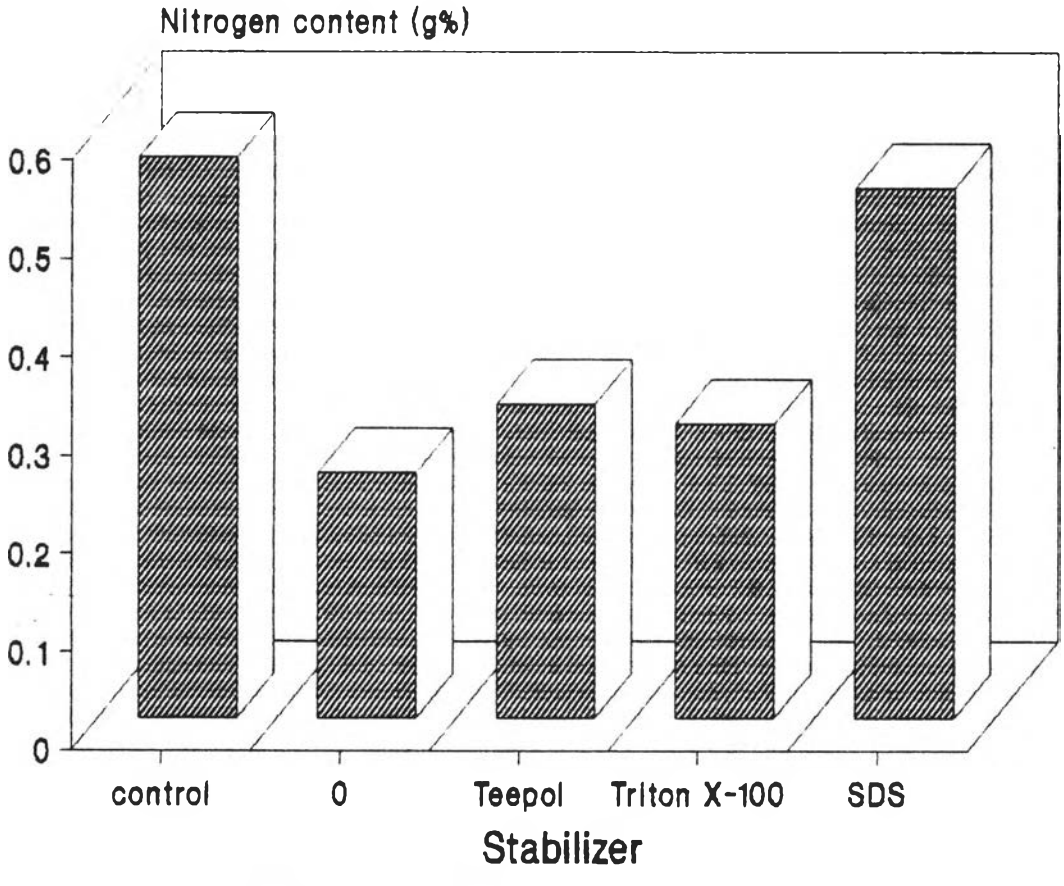
control = น้ำยางสดที่ไม่ได้เติมปาเปนตริงรูป ไม่ได้ผ่านการปั่นแยก และมีปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 34%

5. ผลการศึกษาการใช้สาร stabilizer บางชนิดในการเตรียมยางโปรตีนต่ำ

ปัญหาหนึ่งของการผลิตยางโปรตีนต่ำจากน้ำยาง ก็คือ ในบางขณะยางจะเกิดการจับตัวเป็นก้อนในขณะที่ทำการทดลอง ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองไม่เพียงพอตามที่ต้องการ และเมื่อยางจับตัวเป็นก้อนอย่างสมบูรณ์แล้ว จะไม่สามารถแยกปาเปนตริงรูปออกจากก้อนยางได้เลย เพื่อป้องกันการจับตัวกันของยางจึงต้องมีการเติมสารบางชนิดที่ช่วยให้ยางคงสภาพในลักษณะแขวนลอยในน้ำได้เป็นเวลานานขึ้น สาร stabilizer ที่เลือกใช้มีอยู่ 3 ชนิด คือ Triton X -100 Teepol และ SDS (sodium dodecyl sulphate) ซึ่งสารเคมีเหล่านี้เป็นสารพวกดีเทอร์เจนต์(detergent) ที่มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิว นอกจากจะช่วยรักษาสภาพน้ำยางแล้วยังช่วยทำให้โปรตีนบางส่วนหลุดออกจากผิวอนุภาคยางอีกด้วย (John และคณะ, 1977)

เตรียมยางโปรตีนต่ำ จากน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้ง 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณปาเปนตริงรูป เท่ากับ 200 CDU แปรผันชนิดของ stabilizer กำหนดปริมาณที่ใช้เท่ากับ 0.4 p.h.r. หาค่าไนโตรเจนที่เหลือในยางแห้ง ผลการทดลองพบว่า Triton X-100 เป็นสาร stabilizer ที่ดีกว่า Teepol เล็กน้อยเพราะทำให้ปาเปนตริงรูปมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไนโตรเจนใกล้เคียงกับปาเปนตริงรูปอย่างเดียว แต่ SDS เป็นสาร stabilizer ที่มีผลยับยั้งการทำงานของปาเปนตริงรูปอย่างมาก (รูปที่ 4.20)

ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Triton X-100 เป็นสาร stabilizer ในน้ำยาง เนื่องจากมีผลต่อปาเปนตริงรูปน้อยที่สุด จากนั้นทดลองแปรผันปริมาณ Triton X-100 ที่เหมาะสมในช่วง 0.2-1.0 p.h.r. พิจารณาจากปริมาณที่สามารถจะทำให้น้ำยางคงสภาพอยู่ได้โดยไม่จับตัวเป็นก้อนภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมงที่ทำการทดลองและต้องเป็นปริมาณที่ทำให้ปาเปนตริงรูปมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไนโตรเจนได้ดีที่สุด ตารางที่ 4.5 แสดงว่าปริมาณของ Triton X-100 ที่เหมาะสม คือ 0.4 p.h.r.



รูปที่ 4.20 เปรียบเทียบผลการใช้สาร stabilizer 3 ชนิดที่ปริมาณ 0.4 p.h.r. ต่อประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนด้วยปาเปนตริงรูป

เตรียมยางโปรตีนต่ำ แปรผันชนิดของสาร stabilizer ที่เติมลงในน้ำยาง หาค่าไนโตรเจนที่เหลือในยางเทียบกับยางโปรตีนต่ำที่ไม่มีการเติมสาร stabilizer

control = ยางดิบที่ไม่เติมปาเปนตริงรูป ; 0 = ยางโปรตีนต่ำที่ไม่ได้เติมสาร stabilizer; Teepol, Triton X-100, SDS = ยางโปรตีนต่ำที่เติมปาเปนตริงรูป 200 CDU และ 0.4 p.h.r. ของสารแต่ละชนิด

ตารางที่ 4.5 ปริมาณ Triton X-100 ที่เหมาะสมต่อการผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูป

ปริมาณ Triton X-100 (p.h.r.)	การจับตัวเป็นก้อนของยางในขณะกวนกับปาเปนตริงรูป	Nitrogen (g%)	Nitrogen reduction(%)
0	+	0.27	49
0.2	+	0.32	40
0.4	-	0.30	43
0.6	-	0.35	34
0.7	-	0.40	25
0.8	-	0.41	23
0.9	-	0.39	26
1.0	-	0.44	17

+ = ยางจับตัวเป็นก้อน - = ยางไม่จับตัวเป็นก้อน

6. การศึกษาผลของ hydroxylamine hydrochloride และ sodium metabisulfite ต่อแอคติวิตีของปาเปนตริงรูป

สมบัติทางกายภาพของยางดิบจะแปรปรวน คุณภาพไม่คงที่ขึ้นกับแหล่งผลิตและวิธีการผลิต ในอุตสาหกรรมใช้ Hydroxylamine hydrochoride (HH) เติมก่อนยางจับตัวเพื่อให้ยางมีค่าความหนืดคงที่ (constant viscosity rubber) และเติม sodium metabisulfite (SMS) เพื่อให้สีของยางขาวขึ้น ส่วน EDTA และ ซีสเตอีน มีผลในการเพิ่มแอคติวิตีของปาเปน ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของสารเคมี 4 ชนิดต่อการทำงานของปาเปนตริงรูป

เตรียมยางโปรตีนต่ำ จากน้ำยางสดที่มีปริมาณเนื้อยางแห้งเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ แปรผันสารเคมีชนิดต่างๆ เติมลงในน้ำยาง โดยมีปริมาณดังต่อไปนี้ คือ Triton X-100 0.4 p.h.r. SMS 0.05 p.h.r. HH 0.15 p.h.r. EDTA และ ซีสเตอีน 0.05 p.h.r. หาค่าไนโตรเจนในเนื้อยางแห้ง เปรียบเทียบกับยางควบคุมที่เติมปาเปนตริงรูป (IP) และไม่เติม ผลการทดลองแสดงว่า สารเคมีแต่ละชนิดจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของปาเปนตริงรูปแตกต่างกันคือ Triton X-100 HH และ EDTA ที่ใส่ร่วมกับซีสเตอีน เป็นสารเคมีที่ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของปาเปนตริงรูปลดลง ส่วน SMS เป็นสารเคมีที่ให้ผลในทางตรงกันข้าม คือจะช่วยให้ประสิทธิภาพการทำงานของปาเปนตริงรูปดีขึ้น (ตารางที่ 4.6)

7. ผลการศึกษาความเสถียรต่อการทำงานของปาเปนตริงรูปในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่องเมื่อนำมาใช้กับน้ำยางสด

ผลิตยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูป หาค่าปริมาณไนโตรเจนที่ลดลงในยางแห้ง จากนั้นนำปาเปนตริงรูปกลับมาใช้ผลิตยางโปรตีนต่ำซ้ำอีก 4 ครั้ง โดยกำหนดให้ประสิทธิภาพในการลดไนโตรเจนของปาเปนตริงรูปในครั้งแรกมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงว่า ในการใช้งานแต่ละครั้งประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนของปาเปนตริงรูปลดลง

ตารางที่ 4.6 ผลของสารเคมีบางชนิดที่มีต่อประสิทธิภาพการลดไนโตรเจนด้วยปาเปนตรึงรูป

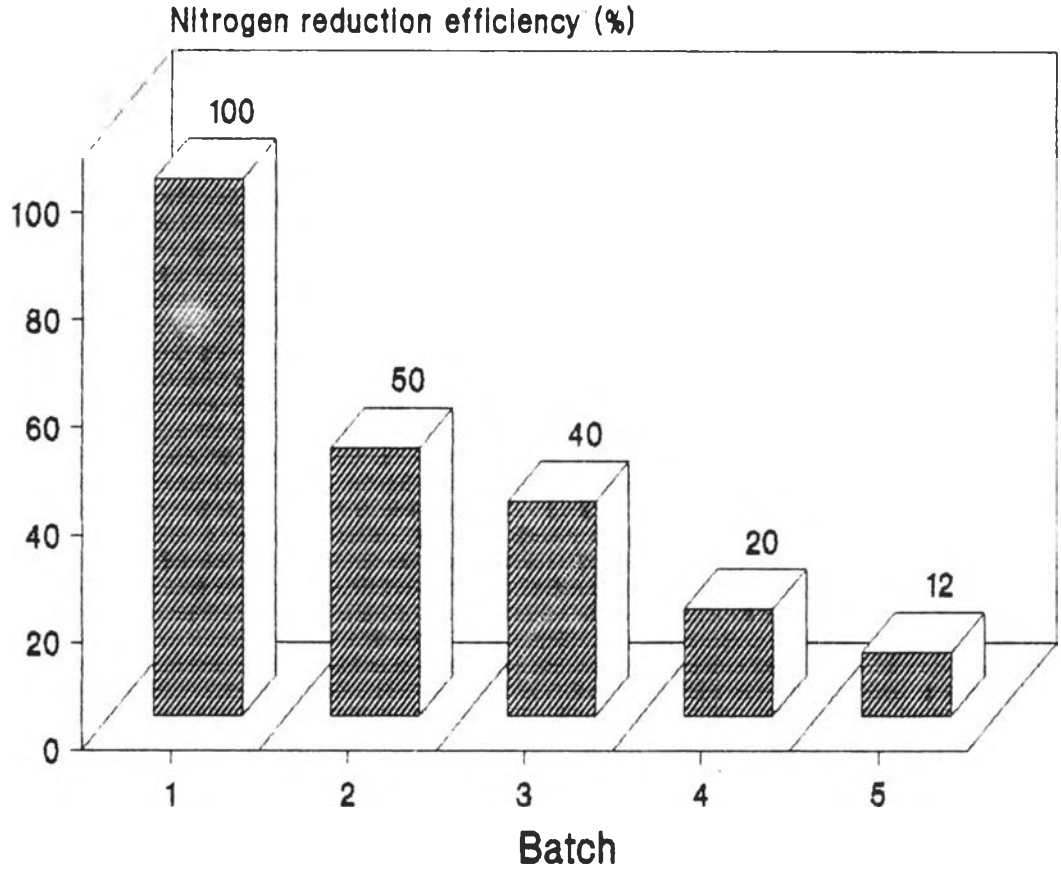
Treatment	Nitrogen (g%)	Nitrogen reduction (%)
Latex (control)	0.47	-
Latex + IP	0.23	51
Latex + IP + Triton X-100	0.28	40
Latex + IP + HH	0.26	45
Latex + IP + SMS	0.19	60
Latex+IP+Triton X-100+HH+SMS	0.29	38
Latex + IP + EDTA + cystein	0.28	40

IP : Immobilized papain (200 CDU)

HH : hydroxylamine hydrochoride (0.15 p.h.r.)

SMS : sodiummetabisulfite (0.05 p.h.r.)

เรื่อยๆ โดยหลังการใช้งานครั้งที่ 2 ประสิทธิภาพของปาเปนคริงรูปเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ การใช้งานครั้งที่ 4 และ 5 เหลือเพียง 20 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.21)



รูปที่ 4.21 ความเสถียรต่อการลดไนโตรเจนในน้ำยางสดด้วยปาเปนตริงรูป เมื่อนำมาใช้งานในลักษณะแบบไม่ต่อเนื่อง

เตรียมยางโปรตีนต่ำด้วยปาเปนตริงรูป จากนั้นนำปาเปนตริงรูปกลับมาใช้งานซ้ำอีก 4 ครั้ง เมื่อให้แอคติวิตีของปาเปนตริงรูปในการใช้งานครั้งแรก = 100%