



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การลดปริมาณโปรตีนระหว่างการแข็งตัวของยางก้อนถ้วยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส
Deproteinization of Rubber Cup Lump Maturation Using
Proteolytic Enzyme

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ
พ.ศ. 2558

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การลดปริมาณโปรตีนระหว่างการแข็งตัวของยางก้อนถ้วยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส
Deproteinization of Rubber Cup Lump Maturation Using
Proteolytic Enzyme

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ
พ.ศ. 2558

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b00268513

ชื่อโครงการ การลดปริมาณโปรตีนระหว่างการแข่งขันตัวของยางก้อนถ้วยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส
 แหล่งเงิน ทุนอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้
 ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50000 บาท
 ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2557 ถึง 30 กันยายน 2558
 ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
 นาย ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
 คุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตยางพาราเป็นอันดับหนึ่งของโลก นับว่าเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศได้มากชนิดหนึ่ง เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกทำ ยางก้อนถ้วยป้อนสู่โรงงานเนื่องจากมีขั้นตอนการผลิตที่ง่าย ประหยัดค่าใช้จ่าย เวลาและแรงงาน ผลผลิตกัมภ์จากยางพาราเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดการแพ้ต่อผู้คนที่ใช้ได้ ในการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการลดปริมาณโปรตีนด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยทำการทดสอบแอกทิวิตี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ปาเปน พบว่าเอนไซม์ปาเปนสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกันพบว่า ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปน 1071.43 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณโปรตีนได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณโปรตีนคงเหลืออยู่ที่ 62.55 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกรัมยาง คิดเป็น 39.48% เทียบจากชุดควบคุม จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี one way anova พบว่าปริมาณโปรตีนในชุดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

คำสำคัญ : การลดปริมาณโปรตีนในยางพารา, โปรตีนในน้ำยางพารา, ยางก้อนถ้วย, เอนไซม์ปาเปน

Research Title: Deproteinization of Rubber Cup Lump Maturation Using Proteolytic Enzyme...
Researcher: Dr. Tipachai Vatanavicharn.....
Faculty: Science..... **Department:** Biology.....

ABSTRACT

Today, Thailand is the world's number one rubber producer. It is an important economic crop that bring a lot of income into the country. Most farmers choose Rubber Cup method to fed to the factory because it has easy production process, save cost Time and labor. These rubber products can cause allergic reactions to people. In this study, the protein in latex was reduced by papain. The enzyme activity assay of papain were performed to determine the optimum conditions. The enzyme showed the best activity at pH 5.0 at 40°C. When using different enzyme concentrations, it was found that the concentration of papain 1071.43 units per milliliter can reduce protein content to 62.55 milligram protein per gram of rubber or 39.48%, compared with control. A one-way anova analysis showed that the concentration of protein in each sample was significantly different at the 95% confidence level.

Keywords : Deproteinization, natural rubber latex protein, Cup Lump, papain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภท เงินอุดหนุนทั่วไป/เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

นายธิปชัย วัฒนวิจารณ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	1
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	1
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
3.1 การ pH และ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ปาเปน.....	3
3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำยาง.....	3
3.3 การเตรียมน้ำยาง.....	3
3.4 การลดปริมาณโปรตีนโดยใช้เอนไซม์.....	3
3.5 การหาปริมาณโปรตีนในยางโดยวิธีของ Bradford.....	3
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	5
4.1 pH และความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ปาเปน.....	5
4.2 ผลการลดปริมาณโปรตีนในยาง.....	6
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	8
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย.....	9
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง.....	10
ภาคผนวก.....	13
ภาคผนวก//ก.....	13
ภาคผนวก//ข.....	14
ประวัตินักวิจัย.....	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 ตัวอย่างการวัดขนาดวงใสของเอนไซม์ปาเปน.....	5
4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA).....	6
4.3 กราฟแท่งแสดงการลดปริมาณโปรตีนในยางพาราก่อนถั่ว.....	7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีการผลิตยางพาราในรูปแบบต่างๆเช่น ยางแผ่นรมควัน ยางแท่ง และน้ำยางข้น เป็นต้น นอกจากนี้ยางก้อนถ้วยเป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่เกษตรกรนิยมผลิต เนื่องจากผลิตง่าย ใช้เวลาและแรงงานน้อย และประหยัดค่าใช้จ่าย แต่ยางก้อนถ้วยมีข้อเสียที่สำคัญคือ การจับตัวของยางเกิดขึ้นโดยการใช้กรดฟอร์มิกส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนร่วมกับยาง แบคทีเรียที่อยู่ในยางนำเอาโปรตีนที่มีไปใช้ในการเจริญเติบโตก่อให้เกิดการหมัก ยางก้อนถ้วยจึงมีกลิ่นเหม็นส่งผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้อยู่อาศัยรอบๆบริเวณที่ใช้ในการตากหรือเก็บกักยาง นอกจากนี้โปรตีนในยางยังส่งผลให้ผู้ใช้เกิดอาการแพ้ได้อีกด้วย โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ใช้เอนไซม์โปรตีเอสย่อยโปรตีนในยางแต่ยังไม่มีมีการนำไปประยุกต์ใช้กับวิธีการผลิตยางก้อนถ้วย ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการลดปริมาณโปรตีนในยางก้อนถ้วยโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสย่อยสลายโปรตีนในน้ำยางระหว่างการตกตะกอนยาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาวิธีลดปริมาณโปรตีนในยางก้อนถ้วยระหว่างการแข็งตัวด้วยเอนไซม์โปรตีเอส

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ใช้เอนไซม์โปรตีเอสลดปริมาณโปรตีนในยางก้อนถ้วยระหว่างการแข็งตัว

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ค้นหาเอนไซม์โปรตีเอสที่หาได้ง่าย ราคาถูกและเหมาะสมต่อการนำมาใช้ย่อยโปรตีนระหว่างที่ยางตกตะกอน

1.4.2 การหา pH และ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ปาเปน

1.4.3 การเก็บตัวอย่างน้ำยาง

1.4.4 การเตรียมน้ำยาง

1.4.5 การลดปริมาณโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

1.4.5 การหาปริมาณโปรตีนในยางโดยวิธีของ Bradford

1.4.6 สรุปและวิเคราะห์ผลการทดลอง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ยางก้อนถ้วยที่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าวิธีมาตรฐาน

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในน้ำยางธรรมชาตินอกจากจะมีเนื้อยางที่เป็นสารไฮโดรคาร์บอน cis-1,4 polyisoprene เป็นองค์ประกอบหลักแล้ว ยังมีสารจำพวกไขมัน และโปรตีนอยู่อีกด้วย โดยทั่วไปในขั้นตอนการเติมแอมโมเนียลงในน้ำยางเพื่อป้องกันการแข็งตัวของน้ำยาง โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจะสามารถถูกย่อยสลายได้ ปริมาณโปรตีนในน้ำยางธรรมชาตินอกจากจะมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพของยางแล้ว [1] โปรตีนบางส่วนที่เหลือจากการสลายยังก่อให้เกิดอาการแพ้ในผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ยางได้อีกด้วย [2]

การกำจัดโปรตีนในน้ำยางเพื่อให้ได้ยางที่มีปริมาณโปรตีนต่ำสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้ การกำจัดด้วยวิธีเชิงกลเช่น การปั่นเหวี่ยง หรือการแยกด้วยเมมเบรน การกำจัดด้วยวิธีเชิงเคมีเช่น การใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมกับการปั่นเหวี่ยง [3] การใส่อะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์และซิลิกาไดออกไซด์ก่อนกระบวนการวัลคาไนเซชันซึ่งสามารถลดปริมาณโปรตีนให้เหลือน้อยกว่า 0.2 กรัมต่อหนึ่งกรัมของยางได้ [4] หรือการใช้ยูเรียในการลดปริมาณโปรตีนในยาง โดยนำยูเรียไปผสมกับน้ำยางชั้นที่มีแอมโมเนียสูงแล้วทำการปั่นตกตะกอนยาง ผลที่ได้พบว่าปริมาณโปรตีนในยางลดลงจาก 0.38% เป็น 0.02% [5] เป็นต้น

นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่ใช้เอนไซม์โปรตีเอสกำจัดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติหรือผิวหน้าของยางเช่น การใช้เอนไซม์ปาเปนที่พบในยางมะละกอมาใช้ในการลดปริมาณโปรตีนในยางโดยนำเอนไซม์ผสมกับน้ำยาง ผลที่ได้สามารถลดปริมาณโปรตีนลงได้ถึง 70-80% [6] หรือการตรึงเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลงบนเม็ดปิดที่มีเซลลูโลสและไคโตซานเป็นองค์ประกอบแล้วนำไปผสมกับสารละลายยางผง ผลที่ได้พบว่าปริมาณโปรตีนในยางลดลงจาก 0.3% เป็น 0.012% [7] นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เอนไซม์โปรตีเอสร่วมกับการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวสามารถเตรียมน้ำยางธรรมชาติที่มีความบริสุทธิ์สูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ [8]

แต่ในการทำยางก้อนด้วยวิธีเชิงกลไม่สามารถทำได้เพราะเกษตรกรจะให้น้ำยางแข็งตัวในถ้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้เอนไซม์โปรตีเอสในการกำจัดโปรตีนในขั้นตอนของการแข็งตัวของยางก้อนด้วย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การ pH และ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ปาเปน

เตรียมสารละลายเอนไซม์ปาเปนที่ pH ต่างๆ โดยชั่งเอนไซม์ปาเปนมา 1 mg (30000 unit/mg) ละลายใน 50 mM อะซิเตทหรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0, 6.5 และ 7.5 ปริมาตร 1 mL นำสารละลายปาเปนแต่ละ pH มาเจือจางให้มีเป็นความเข้มข้น 0.1 mg/mL ทำเพลทหุลุม casein agar โดยมีหนึ่งหุลุมเป็นหุลุมควบคุม (ใส่แต่บัฟเฟอร์ไม่มีเอนไซม์) และหุลุมสำหรับเอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 1 mg/mL และ ความเข้มข้น 0.1 mg/mL อย่างละหุลุม รองพื้นกันหุลุมด้วยอาหาร casein รอให้แข็งตัว เปิดอะซิเตทหรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เอนไซม์ปาเปนความเข้มข้น 1 mg/mL และ ความเข้มข้น 0.1 mg/mL จำนวน 50 μ L ลงไปอย่างละหุลุม แล้วนำไปบ่มไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 40°C ย้อมสีเพลทด้วย Coomassie blue R-250 (stain solution) เทใส่เพลททิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีย้อมด้วย destain solution จนกว่าจะเห็นวงใสชัดเจน

3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำยาง

เพื่อควบคุมปัจจัยต่างๆ โครงการงานนี้จึงทำการทดลองในห้องแล็บ ดังนั้นจึงต้องทำการเก็บตัวอย่างน้ำยางจากสวนยางมายังห้องแล็บ น้ำยางสดจากสวนยางจึงต้องมีการเติมสารเคมีรักษาสภาพน้ำยางป้องกันน้ำยางจับตัว โดยใช้แอมโมเนียความเข้มข้น 2% จำนวน 70 mL ต่อน้ำยางสด 1 L เพื่อเก็บรักษาน้ำยางในระยะเวลาสั้น

3.3 การเตรียมน้ำยาง

กำจัดแอมโมเนียออกจากน้ำยางพาราโดยการปั่นกวนน้ำยางที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าความเป็นต่างของน้ำยางจะต่ำกว่า pH10

3.4 การลดปริมาณโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

เทน้ำยางที่ผ่านการปั่นกวนไล่แอมโมเนียแล้วลงในถ้วยถ้วยละ 15 mL เติม กรดฟอร์มิกความเข้มข้น 3% ลงในถ้วยน้ำยางในอัตรา 1.2 mL ต่อน้ำยาง 15 mL กวนให้เข้ากันไม่ต้องปิดฟองอากาศออก น้ำยางจะจับเป็นก้อน จากนั้นเติมเอนไซม์ปาเปน 1 mg/mL ลงไป 150, 300 และ 600 μ L สำหรับชุดตัวอย่าง และใส่เฉพาะบัฟเฟอร์เป็นชุดควบคุม โดยทำชุดตัวอย่าง และ ชุดควบคุมจำนวน 5 ซ้ำบ่มที่อุณหภูมิ 40°C บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน (16 ชั่วโมง)

3.5 การหาปริมาณโปรตีนในยางโดยวิธีของ Bradford

3.5.1 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin เข้มข้น 1,000 μ g/mL (stock solution) เจือจางสารละลาย stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 μ g/mL ปีเปตสารละลายที่ได้มา 0.1 mL ลงในสารละลายเบรดฟอร์ด (Bio-Rad) 5 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ Bovine serum albumin

3.5.2 การสกัดและวัดปริมาณโปรตีนจากยางก้อนถ้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดชิ้นยางพาราให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 g (จุดบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 mL แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายที่ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 0.9% โซเดียมคลอไรด์ ลงไป 25 mL นำไปโฮโมจีไนซ์ในน้ำแข็งนาน 1 นาที (ระวังอย่าให้เกิดความร้อน) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยปิเปตสารละลายใส่ที่ได้มา 0.1 mL ลงในสารละลายแบรดฟอร์ด 5 mL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟของสารละลายมาตรฐานของ Bovine serum albumin

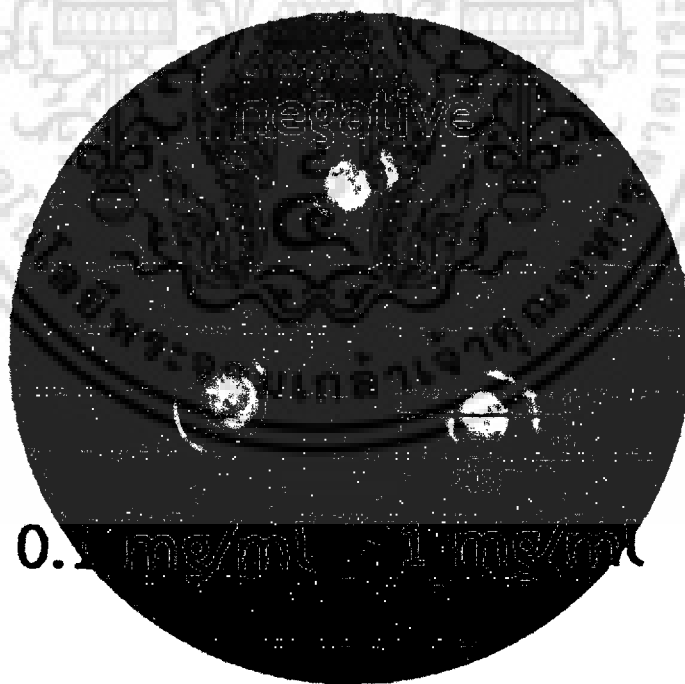


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 pH และความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ปาเปน

เบื้องต้นได้ทำการทดสอบแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ปาเปนเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ปาเปนที่จะนำไปลดปริมาณโปรตีน จากข้อมูลพื้นฐานคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ปาเปนให้ผลทดสอบที่ดีในอาหาร casein อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และค่า pH 5.0 – 9.0 จึงได้ทำการศึกษาแอกทิวิตี้ของเอนไซม์ปาเปนที่สภาวะพีเอชต่างๆ คือ pH5.0, pH6.5 และ pH7.5 ที่อุณหภูมิ 40 °C และวัดผลการทดสอบจากขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นดังตัวอย่างในภาพที่ 4.1 โดยขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นจะบ่งบอกถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ปาเปน จากการทดสอบพบว่าสารละลายปาเปนความเข้มข้น 0.1 mg/mL ไม่พบวงใสทุกค่า pH ในขณะที่ความเข้มข้น 1 mg/mL pH5.0, pH 6.5, pH 7.5 วงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.13, 1.17 และ 2.00 cm. ตามลำดับ โดยที่พีเอช 5 มีขนาดวงใสใหญ่ที่สุดแสดงว่าเอนไซม์ปาเปนสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาวะ pH5 มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาของซบสเตรทเปลี่ยนแปลงไปในระยะเวลาที่กำหนดรวดเร็วที่สุด ซึ่งเป็นไปตามที่มีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษา เช่น Hoover และ Kokes ได้ทำการศึกษาว่า ที่ pH5 อาหาร casein และซบสเตรทสังเคราะห์อีก 3 ชนิดเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีคือมีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระและการแตกของพันธะเพปไทด์ออกมา มากกว่า pH อื่นๆที่ทำการศึกษา จึงได้ทำการศึกษาการลดปริมาณโปรตีนโดยเอนไซม์ปาเปนเฉพาะสภาวะ pH 5 ที่อุณหภูมิ 40 °C



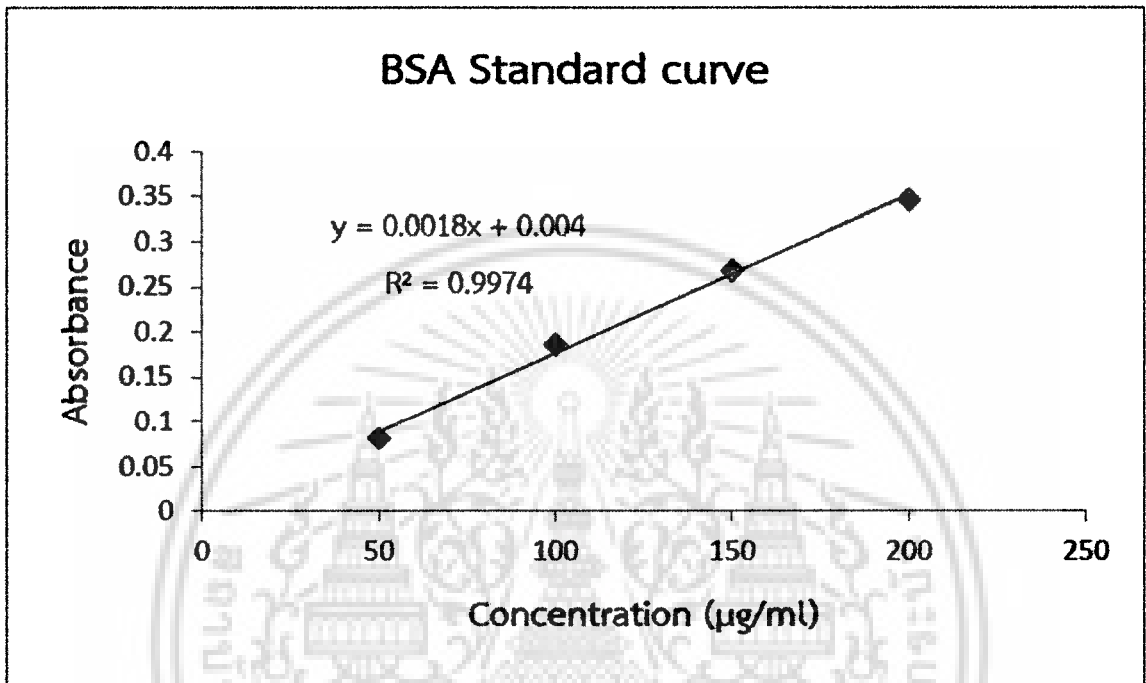
ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างการวัดขนาดวงใสของเอนไซม์ปาเปน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการลดปริมาณโปรตีนในยาง

4.2.1 ผลการศึกษากราฟมาตรฐาน

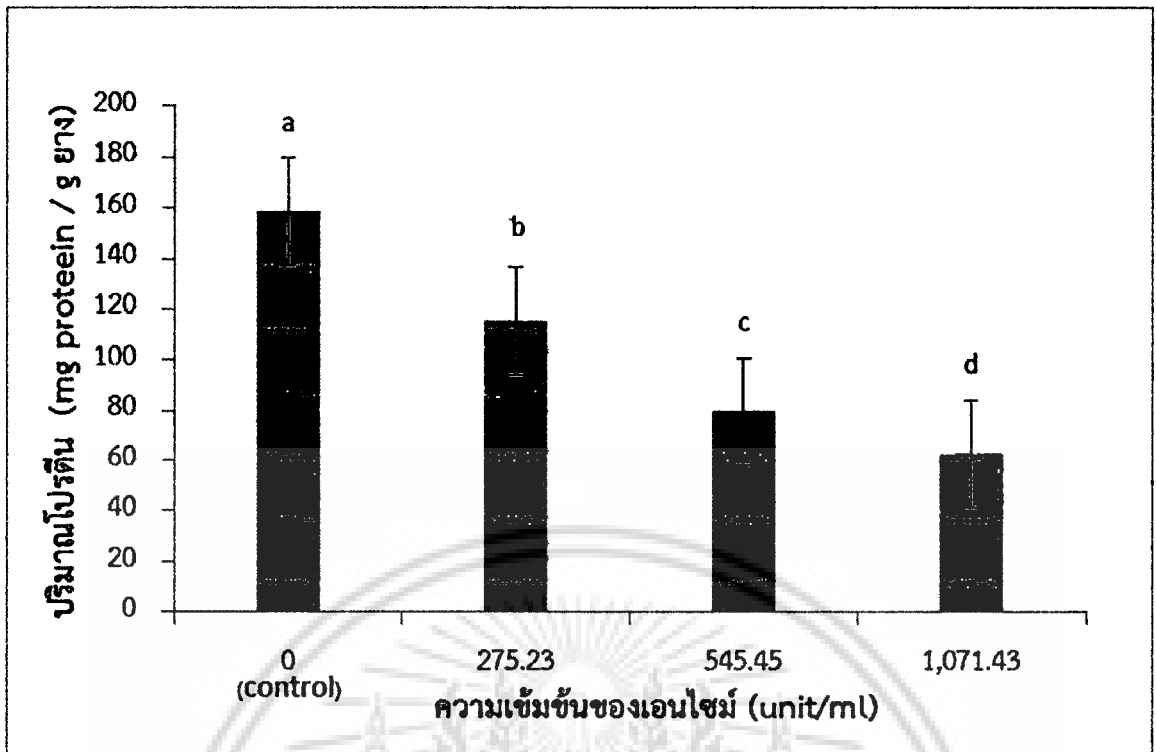
เมื่อวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA โดยวิธี Bradford แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 nm ได้กราฟมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 150–200 µg/ml ค่าสมการเส้นตรงที่ได้ $y = 0.0018x + 0.004$ และ R^2 มีค่าเท่ากับ 0.9974 ดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 กราฟมาตรฐานของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA)

4.2.2 ผลการศึกษาในตัวอย่างยาง

ในการศึกษาการลดปริมาณโปรตีนในยางพารา ก่อนถวัลยนี้ ได้ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนที่แตกต่างกันคือ 0, 275.23, 545.45, 1071.43 unit/mL ต่อปริมาตรน้ำยาง 15 mL วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ด้วยวิธี Bradford ได้ 158.442, 115.556, 79.66 และ 62.55 mg protein/g ยาง ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างยางลดลงเมื่อมีการเติมเอนไซม์ปาเปนลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ปาเปนลงไป โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนมากที่สุดคือ 1071.43 unit/mL ปริมาณของโปรตีนลดลงมากที่สุด เนื่องจากแอกทิวิตีในการทำงานของเอนไซม์ปาเปนเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ โดยวิธี one way anova พบว่าปริมาณโปรตีนในชุดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างกับชุดควบคุม และที่ความเข้มข้นต่างกันปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 กราฟแท่งแสดงการลดปริมาณโปรตีนในยางพาราก่อนถวัลยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองลดปริมาณโปรตีนในยางพาราก่อนถั่วด้วยเอนไซม์โปรติเอส โดยทำการทดสอบ กิจกรรมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์ปาเปนที่จะนำไปใช้ลดปริมาณโปรตีนในยางพาราก่อนถั่ว ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ปาเปนสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดเบส 5.0 และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกันคือ 0 (ชุดควบคุม), 275.23, 545.45, 1071.43 unit/mL ปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้คือ 158.442, 115.556, 79.66 และ 62.55 mg protein/g ยาง ตามลำดับ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สามารถลดปริมาณโปรตีนในยางพาราก่อนถั่วได้ดีที่สุดคือ 1071.43 unit/ml จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี one way anova พบว่าปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ปาเปนสามารถลดปริมาณโปรตีนได้ และปริมาณโปรตีนจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5 สรุปผลผลิตงานวิจัย

ได้วิธีการผลิตยางก้อนถ้วยที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง

- ชูดา จันทรข้างแรม. 2013. โปรีตีนในน้ำยารักษา. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.resjournal.kku.ac.th/abstract/18_6_10.pdf (สืบค้นเมื่อวันที่ 19 มีนาคม 2559).
- ดร.พงษ์ธร แซ่ฮ้อย. 2014. ชนิดของยางและการใช้งาน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.rubbercenter.org/files/technologys.pdf> (สืบค้นเมื่อวันที่ 19 มีนาคม 2559).
- ชญาภา นิมสุวรรณ. 2007. การแปรรูปโปรตีนในน้ำยารักษาธรรมชาติ วิธีการตรวจสอบและเทคโนโลยีการแก้ไข. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก:http://www.thaifita.com/trade/study/imtgt_chap5-1.pdf (สืบค้นเมื่อวันที่ 19 มีนาคม 2559).
- นวลศรี โชตินันท์. 2014. ยางก้อนถ้วย. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.technologychaoban.com/news_detail.php?tnid=1261 (สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2559).
- กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2010. โปรีตีนในน้ำยารักษาธรรมชาติ. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://siweb.dss.go.th/repack/fulltext/IR3.pdf> (สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2559).
- นางสาวนิตยา ตันติวา และ ผศ.ดร.นพพล เล็กสวัสดิ์ . 2008. การศึกษาจลนพลศาสตร์ของ เอนไซม์โปรติเอส จาก *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.agro.cmu.ac.th/absc/data/57/57-003.pdf> (สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2559).
- Merckmillipore. 2001. Papain. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://www.merckmillipore.com/TH/en/product/Papain,MDA_CHEM-107144#anchor_Description (สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2559).
- JAMEA B. SUMNER and G. FRED SOMERS. Chemistry and methods of Enzymes. 1953. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : https://books.google.co.th/books?id=N02eBQAAQBAJ&pg=PA181&lpg=PA181&dq=%E0%B9%89hippuryl+amide&source=bl&ots=FRnv5_fYKh&sig=5BAhOz1pnUgMuG4wEGexhUB9rKc&hl=th&sa=X&ved=0ahUKEwjn9ljf4dTMAhUJtY8KHdLC4UQ6AEIGzAA#v=onepage&q&f=false (สืบค้นเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2559).
- เข็มทอง อ่องทิพย์ อธิวัฒน์ ชาญฤทธิเสน พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง และนิอร โฉมศรี. 2554. ผลของ โบรมิเลนจากสับปะรดในการย่อยถั่วเหลืองต่อปริมาณ free α -amino Nitrogen ในเครื่องดื่ม. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.lartc.rmutl.ac.th/atri2/gs/%E0%B8%A7%E0%B8%B4%E0%B8%97%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%B4%E0%B8%9E%E0%B8%99%E0%B8%98%E0%B9%8C/%E0%B8%99%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A7%E0%B9%80%E0%B8%82%E0%B9%87%E0%B8%A1%E0%B8%97%E0%B8%AD%E0%B8%87%20%E0%B8%AD%E0%B9%8B%E0%B8%AD%E0%B8%87%E0%B8%97%E0%B8%B4%E0%B8>

%9E%0%B8%A2%0%B9%8C/%0%B8%A0%0%B8%B2%0%B8%84%0%B8%9C%0%B8%99%0%B8%A7%0%B8%81.pdf (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 เมษายน 2559).

คลังข้อมูลสารสนเทศระดับภูมิภาค (ภาคใต้) โดย สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. 2557. ยางพารา. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก :

<http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/para/history/index.php> (วันที่สืบค้น 3/5/2016).

SAM R. HOOVER AND ELSIE L. C. KOKES. 1946. EFFECT OF pH UPON PROTEOLYSIS BY PAPAINE. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.jbc.org/content/167/1/199.full.pdf> (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 เมษายน 2559).

วิภาวี พัฒนกุล. 2554. ยางธรรมชาติและยางสังเคราะห์. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.rubberthai.com/book/file/98.pdf> (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 เมษายน 2559).

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2550. น้ำยางธรรมชาติ. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2010/8758/6/Chapter2.pdf> (สืบค้นเมื่อวันที่ 4 เมษายน 2559).

44

นงลักษณ์และปรีชา. 2552. เอนไซม์โปรติเอส. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.lartc.rmutl.ac.th/atri2/gs/%0%B8%A7%0%B8%B4%0%B8%97%0%B8%A2%0%B8%B2%0%B8%99%0%B8%B4%0%B8%9E%0%B8%99%0%B8%98%0%B9%8C/%0%B8%99%0%B8%B2%0%B8%87%0%B8%AA%0%B8%B2%0%B8%A7%0%B9%80%0%B8%82%0%B9%87%0%B8%A1%0%B8%97%0%B8%AD%0%B8%87%20%0%B8%AD%0%B9%8B%0%B8%AD%0%B8%87%0%B8%97%0%B8%B4%0%B8%9E%0%B8%A2%0%B9%8C/%0%B8%9A%0%B8%97%0%B8%97%0%B8%B5%0%B9%88%20%20%20%20%0%B8%95%0%B8%A3%0%B8%A7%0%B8%88%0%B9%80%0%B8%AD%0%B8%81%0%B8%AA%0%B8%B2%0%B8%A3.pdf> (สืบค้นเมื่อวันที่ 27 เมษายน 2559).

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2550. เอนไซม์โปรติเอส. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://kb.psu.ac.th/psukb/bitstream/2553/2957/8/242641_ch1.pdf (สืบค้นเมื่อวันที่ 27 เมษายน 2559).

ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมวงศ์. 2556. ปาเปน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1081/papain%0%B8%9B%0%B8%B2%0%B9%80%0%B8%9B%0%B8%9> (สืบค้นเมื่อวันที่ 27 เมษายน 2559).

Pierce Chemical Technical Library. 2550. Coomassie Dye Binding Method. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/PIERCE_Coomasie.pdf (สืบค้นเมื่อวันที่ 27 เมษายน 2559).

Frank W. Perrella. 2001. ENZYME TREATED NATURAL RUBBER LATEX. [ออนไลน์].

สืบค้นจาก :

[https://books.google.co.th/books?id=w5BC3bm9YFsC&pg=PA137&lpg=PA137&dq=Enzyme Treated+Natural+Rubber+Latex&source=bl&ots=wvxgJRWKsg&sig=KF5M1bGB69ATCoDol18lXnhvrLc&hl=th&sa=X&ved=0ahUKEwjD95ndjdrMAhXDtY8KHb-VCE0Q6AEINzAC#v=onepage&q=EnzymeTreated%20Natural%20Rubber%20Latex&f=false](https://books.google.co.th/books?id=w5BC3bm9YFsC&pg=PA137&lpg=PA137&dq=Enzyme+Treated+Natural+Rubber+Latex&source=bl&ots=wvxgJRWKsg&sig=KF5M1bGB69ATCoDol18lXnhvrLc&hl=th&sa=X&ved=0ahUKEwjD95ndjdrMAhXDtY8KHb-VCE0Q6AEINzAC#v=onepage&q=EnzymeTreated%20Natural%20Rubber%20Latex&f=false) (สืบค้นเมื่อวันที่ 27 เมษายน 2559).

Frank W. Perrella, Joseph K. Pieroni, Thomas N. Tillotson. 2002.

Enzyme, stabilizer and antioxidant treated natural rubber latex product and method of processing same. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.google.com/patents/US6380283> (สืบค้นเมื่อวันที่ 27 เมษายน 2559).

สมคิด. 2557. การจับตัวเป็นก้อนของน้ำยางพารา. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก :

<http://rubberdigest.com/?p=110> (สืบค้นเมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม 2559).



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ผลการทดสอบแอกติวิตี้ของเอนไซม์ปาเปน

พีเอช	ขนาดวงใส
<p>pH 5.0</p> 	<p>วงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.30 cm, 2.10 cm และ 2.00 cm วงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.13 cm. sd. = 0.15</p>
<p>pH 6.5</p> 	<p>วงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.00 cm, 1.30 cm และ 1.20 cm วงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.17 cm. sd. = 0.15</p>
<p>pH 7.5</p> 	<p>วงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.90 cm, 2.00 cm และ 2.10 cm วงใสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.00 cm. sd. = 0.10</p>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

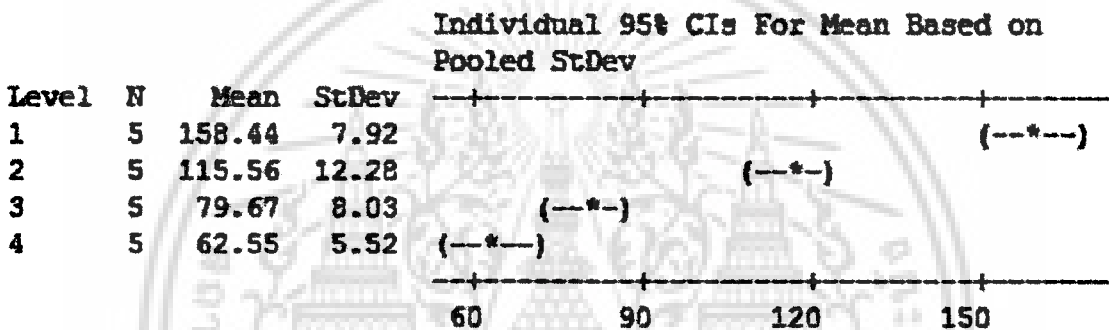
ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี one way anova

One-way ANOVA: ความเข้มข้น versus เอนไซม์

Source	DF	SS	MS	F	P
เอนไซม์	3	27036.9	9012.3	116.89	0.000
Error	16	1233.6	77.1		
Total	19	28270.5			

S = 8.781 R-Sq = 95.64% R-Sq(adj) = 94.82%



Pooled StDev = 8.78

Grouping Information Using Fisher Method

เอนไซม์	N	Mean	Grouping
1	5	158.44	A
2	5	115.56	B
3	5	79.67	C
4	5	62.55	D

Means that do not share a letter are significantly different.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล..... นายจิปชัย วัฒนวิจารณ์.....

ตำแหน่งปัจจุบัน..... อาจารย์.....

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546
วท.ด.	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2552

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)..... การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน..... การศึกษา
ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ.....

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2547	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก	สกว.
2557	ทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่	สกว.

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ).....

1. Vatanavicham T., Prapavorarat A., Jaree P., Somboonwivat K., Tassanakajon A. (2014). PmVRP15, a Novel Viral Responsive Protein from the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*, Promoted White Spot Syndrome Virus Replication. *PLoS ONE*. 9(3): e91930 [Impact Factor: 3.73]
2. Vatanavicham T., Pongsomboon S., Tassanakajon A. (2012). Two plasmolipins from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* and their response to virus pathogens. *Dev Comp Immunol*. Oct;38(2):389-94 [Impact Factor: 3.238]
3. Prapavorarat, A., Vatanavicham, T., Soderhall, K., Tassanakajon, A. (2010). A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Biological Chemistry*. 285: 21467-21477 [Impact Factor: 5.328]
4. Vatanavicham, T., Supungul, P., Puanglarp, N., Yingvilasprasert, W., Tassanakajon, A. (2009). Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustinPm5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 153: 244-252. [Impact Factor: 1.607]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้