



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตเอโนไซม์โปรติเอสเพื่อการใช้งานในอุตสาหกรรม

แปรรูปยางพารา

โดย นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และคณะ

กันยายน 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตเอโนไซม์โปรติเอสเพื่อการใช้งานในอุตสาหกรรม  
แปรรูปยางพารา

คณะผู้วิจัย

- |                            |                      |
|----------------------------|----------------------|
| 1. นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน | มหาวิทยาลัยแม่โจ้    |
| 2. นายชาติชาย โชนงนุช      | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |
| 3. นางสาวฉันทนา สุโพ       | มหาวิทยาลัยแม่โจ้    |
| 4. นายกวีวัฒน์ บุญคาน      | มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ |

ชุดโครงการยางพารา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

แผนงานวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อการใช้งานในอุตสาหกรรมแปรรูป

ยางพารา

Development of protease production for applying in

Para rubber processing industry

## บทสรุปรายงานสำหรับผู้บริหาร

### ชื่อแผนงานวิจัย

การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเพื่อการใช้งานในอุตสาหกรรมแปรรูปยางพารา  
Development of protease production for applying in Para rubber processing industry

### ชื่อโครงการย่อย

#### โครงการย่อยที่ 1

การขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ในการเตรียมน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้

Semi-pilot up-scaling process of protease production for applying in allergic protein-free rubber latex preparation

#### โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา

Characterization of *Bacillus subtilis* MR10 proteases for utilizing process development in industrial scale production of this enzyme

### ชื่อหัวหน้าแผนงานวิจัย หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล           ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน  
หน่วยงาน           สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
ที่อยู่                63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290  
โทรศัพท์           053-873540   โทรสาร                053-878225  
E-mail                [pairote@mju.ac.th](mailto:pairote@mju.ac.th)

### ชื่อหัวหน้าโครงการย่อยที่ 1 หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล           ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน  
หน่วยงาน           สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
ที่อยู่                63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290  
โทรศัพท์           053-873540   โทรสาร                053-878225  
E-mail                [pairote@mju.ac.th](mailto:pairote@mju.ac.th)

### ชื่อหัวหน้าโครงการย่อยที่ 2 หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาติชาย โชนงนุช  
 หน่วยงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร  
 คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 ที่อยู่ 155 หมู่ 2 ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100  
 โทรศัพท์ 053-948261 โทรสาร 053-948206  
 E-mail [chartchai.k@cmu.ac.th](mailto:chartchai.k@cmu.ac.th)

### ชื่อนักศึกษาผู้ช่วยวิจัย หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

#### โครงการย่อยที่ 1

ชื่อ-สกุล นางสาวฉันทนา สุโพ  
 หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
 ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290  
 โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225

#### โครงการย่อยที่ 2

ชื่อ-สกุล นายกวีวัฒน์ บุญคาน  
 หน่วยงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร  
 คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 ที่อยู่ 155 หมู่ 2 ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100  
 โทรศัพท์ 053-948261 โทรสาร 053-948206  
 E-mail [kaweewat\\_plug@hotmail.com](mailto:kaweewat_plug@hotmail.com)

งบประมาณทั้งโครงการ		จำนวน 1,157,200 บาท
แบ่งเป็น	บริหารโดยแผนงานวิจัย	จำนวน 72,600 บาท
	บริหารโดยโครงการย่อยที่ 1	จำนวน 609,400 บาท
	บริหารโดยโครงการย่อยที่ 2	จำนวน 475,200 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2557 ถึง 30 พฤศจิกายน 2558

## หลักการและเหตุผล

ตลาดผลิตภัณฑ์สุขภาพและอุปกรณ์เสริมทางการแพทย์ของไทยมีมูลค่าสูงขึ้นทุกปี ยกตัวอย่าง เช่น ถุงมือผ่าตัด ถุงยางอนามัย สายฉีดน้ำเกลือ สายให้อาหาร ท่อสวนปัสสาวะ อุปกรณ์อนามัยในช่องปาก แผ่นปิดแผล และแผ่นมาร์สหน้า เป็นต้น แต่ส่วนใหญ่จะมีการนำเข้าสินค้าเหล่านี้จากต่างประเทศทั้งสิ้น เช่น จากเยอรมัน ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตามมักมีผู้โจมตีว่าน้ำยาธรรมชาติมีโปรตีน ภูมิแพ้ (Allergenic proteins) เป็นองค์ประกอบอยู่ อันจะเกิดผลเสียต่อผู้ป่วยหรือผู้ใช้งานได้ เช่น เกิดอาการคันจนกระทั่งอาการรุนแรงขึ้นดังที่เรียกว่า Anaphylaxis สิ่งนี้เป็นอุปสรรคที่กระทบต่อความเชื่อมั่นของผู้ใช้งานผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์จากยางพารา ดังนั้นเพื่อเป็นการคลายความกังวลในประเด็นนี้ให้กับผู้ใช้งาน คณะผู้วิจัยซึ่งเคยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในปี 2552-2555 (RDG5250027, RDG5350029, RDG5450045, RDG5550059) จึงได้พัฒนากระบวนการทางชีวภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้จากน้ำยางพาราโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้รับการรับรองว่าปลอดภัย ทดแทนการใช้สารเคมีในการกำจัดโปรตีนแบบดั้งเดิม นอกจากนี้แบคทีเรียยังเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตโปรตีนเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b1 (Rubber elongation factor) Hev b3 (Small rubber particle protein) และ Hev b 5 (Acidic protein) ซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญในยางพาราได้ โดยโปรตีนสองชนิดแรกนี้ พบในส่วนของเนื้อยางพารา ดังนั้นจึงมักตกค้างในผลิตภัณฑ์ ส่วนโปรตีนชนิดที่สามแม้จะพบในส่วนของชั้นซีรัมที่สามารถกำจัดทิ้งไปได้ด้วยการปั่นเหวี่ยง แต่ก็มีสมบัติทนต่อความร้อนได้ดี งานวิจัยเหล่านี้สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้เกิดแก่ผู้ใช้งานอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่มียางธรรมชาติเป็นส่วนประกอบได้ ว่าปลอดภัยจากโปรตีนภูมิแพ้

เอนไซม์โปรติเอสนับเป็นหัวใจสำคัญของกระบวนการทางชีวภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งการผลิตโปรติเอสเพื่อป้อนสู่การใช้งานในระดับอุตสาหกรรมนั้น มีหลายประเด็นที่จำเป็นต้องศึกษา โดยเบื้องต้น ในปีงบประมาณ 2556 ที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสรวมถึงกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรติเอสออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (RDG5650081) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ซึ่งประเด็นดังกล่าวช่วยให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะนำโปรติเอสมาใช้งานจริงในเชิงการค้า อย่างไรก็ตาม ประเด็นสำคัญอื่นๆ ที่จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อสามารถผลิตโปรติเอสสำหรับใช้งานจริงระดับอุตสาหกรรมก็คือ การพัฒนากระบวนการผลิตในปริมาณสูง (Large scale production) เพื่อให้เกิดความคุ้มค่าของกระบวนการผลิต และการศึกษาสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์โปรติเอส (Enzyme characterization) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบกรรมวิธีการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ รวมถึงใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ยางพาราที่เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ประเด็นหัวข้อวิจัยที่กล่าวถึงนี้ จะช่วยให้กระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติ

เอสสำหรับใช้งานในระดับอุตสาหกรรมมีความเป็นไปได้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เป็นประโยชน์ต่อภาคการผลิตผลิตภัณฑ์จากยางพาราสำหรับงานทางการแพทย์ของประเทศได้

### วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย

- (1) เพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 สำหรับใช้งานในอุตสาหกรรมการผลิตถุงมือทางการแพทย์ที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้
- (2) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของกระบวนการขึ้นรูปถุงมือยางทางการแพทย์จากน้ำยางที่กำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย

### ผลการดำเนินงาน

การดำเนินงานที่รับผิดชอบโดยแผนงานวิจัย กิจกรรมหลักประกอบไปด้วยกิจกรรม ติดตามความก้าวหน้าของโครงการและส่งเสริมความรู้และวิสัยทัศน์เกี่ยวกับห่วงโซ่ของการผลิตและแปรรูปยางพารา เช่นการศึกษาดูงานโรงงานผลิตน้ำยางพาราชั้น ณ บริษัทไทยรับเบอร์ลาเท็กซ์คอร์เปอร์เรชั่น (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี และดูงานสวนยางพาราและการทำยางแผ่นของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา กิจกรรมที่จัดขึ้นเหล่านี้สามารถเสริมสร้างความรู้ความเข้าใจในห่วงโซ่การแปรรูปยางพาราเป็นอย่างมากให้กับนักวิจัยผู้ซึ่งไม่ได้มีประสบการณ์การวิจัยเกี่ยวกับยางพารามาก่อน ส่งผลให้นักวิจัยสามารถผนวกและเชื่อมโยงศาสตร์ที่ตนเองเชี่ยวชาญเข้ากับงานวิจัยที่ดำเนินการอยู่ครั้งนี้

ในส่วนของกิจกรรมภายใต้โครงการย่อยที่ 1 โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและรูปแบบของการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักในถังหมักขนาด 20 ลิตร อีกทั้งเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในการผลิตถุงมือยางที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ภายใต้สภาวะการผลิตของโรงงาน โดยในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ออกแบบระบบถังหมักขนาด 20 ลิตร ที่มีการจ่ายอากาศผ่านปั๊มอากาศ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประกอบไปด้วย กากถั่วเหลือง (100 กรัม/ลิตร)  $K_2HPO_4$  (0.7 กรัม/ลิตร)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.7 กรัม/ลิตร) กลูโคส (1.1 กรัม/ลิตร)  $(NH_4)_2SO_4$  (0.275 กรัม/ลิตร) และ  $NH_4Cl$  (0.275 กรัม/ลิตร) ปรับ pH เริ่มต้นที่ 6.0 ซึ่งเป็นสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่ได้จากงานวิจัย RDG5650081 จากนั้นทำการทดลองโดยเริ่มต้นจากการหมักแบบกะ (batch fermentation) ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 28-55 °C อัตราการให้อากาศตั้งแต่ 0.5-2 kg/cm<sup>2</sup> และอัตราการกวนตั้งแต่ 50-150 rpm แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการหมักในค่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ (unit/ml) การผลิตโปรติเอสต่อหน่วยเวลา (Productivity;

unit/ml-hr) Product yield coefficient ( $Y_{p/x}$ ) การเจริญของเซลล์ (log cfu/ml) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; per hr) โดยเน้นพิจารณาที่ค่า productivity ของการผลิตเอนไซม์เป็นสำคัญ ผลการทดลองพบว่า การหมักที่อุณหภูมิห้อง (28-30 °C) ในห้องอากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm<sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 150 rpm เหมาะสมที่สุด โดยให้ค่า productivity สูงสุดเท่ากับ 1.21 unit/ml-hr เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ต่อมาได้มีการศึกษาถึงรูปแบบการหมักที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเอสให้ค่า productivity สูงสุด ซึ่งได้ทดสอบหมักอีกสองรูปแบบคือ แบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) และต่อเนื่อง (continuous fermentation) แต่พบว่าการหมักแบบต่อเนื่องนั้นไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากกากถั่วเหลืองที่เป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอนุภาคค่อนข้างใหญ่ จึงทำให้อุดตันในท่อจ่ายอาหารเหลว ดังนั้นจึงมุ่งทำการศึกษารูปแบบการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งทดสอบเติมอาหาร 3 ระดับ คือ 500 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตรในทุกๆ 12 ชั่วโมงหลังจากการหมักแบบกะเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว ผลการทดลองพบว่า การเติมอาหาร 1,000 มิลลิลิตรให้ประสิทธิภาพในการหมักในรูปค่า productivity ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.55 unit/ml-hr เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่านี้สูงกว่าที่ได้จากการหมักแบบกะประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และสุดท้ายก็ได้ทดสอบการหมักแบบกะในถังหมักชนิด stirred tank reactor (STR) ขนาด 50 ลิตร โดยใช้สภาวะที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ผลการทดลองพบว่า มีประสิทธิภาพของการหมักที่สูงมาก โดยให้ค่า productivity เท่ากับ 13.47 unit/ml-hr ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจนกระทั่งอยู่ในรูปแบบพร้อมใช้งานแล้ว (\*ไม่นำต้นทุนราคากากหมักมาคำนวณรวมด้วย) สามารถสรุปได้ว่าการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตรมีต้นทุนที่ถูกที่สุด (0.0014 บาทต่อยูนิต) รองลงมาคือการหมักแบบกึ่งกะ (0.0053 บาทต่อยูนิต) และแบบกะในถังหมักขนาด 20 ลิตร (0.0137 บาทต่อยูนิต) แต่การหมักแบบกะในถังหมัก 20 ลิตรกลับใช้เวลาการผลิตเอนไซม์สั้นที่สุด (50 ชั่วโมง) ตามด้วยการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตร (60 ชั่วโมง) และการหมักแบบกึ่งกะในถังหมัก 20 ลิตร (74 ชั่วโมง) ตามลำดับ การทดลองสุดท้ายที่ได้ศึกษาคือ การทดลองนำเอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตได้นี้มาใช้งานจริงในการทำถุงมือยางทางการแพทย์ที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ โดยการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์สารเคมี สูตร อุปกรณ์และเทคนิคการทำถุงมือยางจากบริษัทผู้ผลิตถุงมือยางแห่งหนึ่งในจังหวัดสงขลา ทำการผลิตทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่ สูตรมาตรฐานของโรงงาน สูตรเติมเอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้า (สูตร 6L) และสูตรเติมเอนไซม์โปรตีนเอสจากงานวิจัย (สูตร MR10) ผลการทดลองพบว่า ถุงมือสูตร MR10 มีลักษณะปรากฏที่ใกล้เคียงกับสูตรมาตรฐานของโรงงานทั้งในด้านความหนา สี และผิวสัมผัส ในขณะที่สูตร 6L ที่เติมเอนไซม์ทางการค้านั้นมีลักษณะแตกต่าง โดยมีผิวที่บางกว่าและขาดง่าย อีกทั้งพื้นผิวของถุงมือค่อนข้างเหนียว ทำให้ต้องใช้แปรงในปริมาณมากเพื่อลดการเกาะตัวของถุงมือ ผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของถุงมือตามมาตรฐาน มอก.538-2548 (ถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว) ซึ่งทดสอบตามมาตรฐาน ISO พบว่าความหนาของทุกสูตรผ่านมาตรฐานที่ซึ่งกำหนดไว้ที่ 0.1 มม. ความยืดเมื่อขาดก็เช่นกันที่ผ่านมาตรฐานทุกสูตร แต่ประเด็นอื่นๆ ได้แก่ แรงดึงเมื่อขาดและความเค้นดึงเมื่อมีการยืดร้อยละ 300 ไม่ผ่านมาตรฐานทั้งสามสูตร ทั้งนี้สูตรไม่เติมเอนไซม์มีค่าสูงที่สุด

ตามมาด้วยสูตรที่เติมเอนไซม์จากเชื้อ MR10 ส่วนสูตรที่เติมเอนไซม์ทางการค้าให้ค่าทดสอบที่ต่ำที่สุด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดสอบสมบัติของถุงมือตามมาตรฐาน ASTM ทั้งก่อนและหลังการบ่มเร่ง พบว่าถุงมือที่เติมเอนไซม์โปรติเอสทั้งสองสูตรมีความแข็งแรงในรูปของค่าแรงดึงและ stress at 500% ที่ต่ำกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตร 6L มีเพียงค่าความยืดเมื่อขาด (elongation at break) เท่านั้นที่มีค่าสูงกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน และเมื่อเปรียบเทียบสมบัติของถุงมือที่ผลิตครั้งนี้กับข้อกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ Rubber examination glove (ASTM D3578-05) type II แล้ว พบว่าความหนาของถุงมือทุกสูตรผ่านมาตรฐาน ส่วนค่าแรงดึงนั้นพบว่าสูตรของโรงงานผ่านมาตรฐาน แต่สูตรที่เติมเอนไซม์ไม่ผ่านมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากการบ่มเร่งแล้วพบว่าสูตร MR10 มีค่าสูงขึ้นและผ่านมาตรฐานได้ ในขณะที่ค่า Stress at 500% elongation ก็พบว่ามีเพียงสูตรของโรงงานเท่านั้นที่ผ่านมาตรฐาน คาดว่าเอนไซม์โปรติเอสน่าจะส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือจึงต่ำกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

ส่วนผลการดำเนินงานของโครงการย่อยที่ 2 นั้น นักวิจัยสามารถทำเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนเอนไซม์โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแบบลำดับส่วน (salt fractionation) พบกิจกรรมของเอนไซม์ปริมาณมากกว่า 70% สามารถตกตะกอนในช่วง 40-80% เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-Sephadex C-50) และเจลฟิลเตรชัน (Sephacryl S-100) ตามลำดับ สามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ได้สำเร็จตามเป้าหมาย ซึ่งยืนยันได้จากผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดย SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรติเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรติเอส 2 (P2) เอนไซม์บริสุทธิ์ P1 และ P2 มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3950 และ 3238 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 26.6 และ 21.8 เท่าตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โปรติเอส P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์โปรติเอส P1 และ P2 มีความเสถียรในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรติเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของโลหะ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ของเอนไซม์บริสุทธิ์โปรติเอส P1 และ P2 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เช่นเดียวกับโปรติเอสหยาบที่ผลิตจาก *B. subtilis* MR10 ข้อมูลเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการใช้ประโยชน์จาก

เอนไซม์โปรติเอสเพื่อผลิตน้ำยาล้างพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ โดยเพื่อประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดของเอนไซม์นั้น กระบวนการผลิตจำเป็นต้องถูกกำหนดไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์และหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น

แผนงานวิจัยนี้สามารถบรรลุวัตถุประสงค์ที่วางไว้ ซึ่งสามารถขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร โดยทำการหมักภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำให้เพิ่มค่า productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก 0.4 unit/ml-hr (ผลจากการศึกษาในโครงการ RDG5650081 ซึ่งศึกษาในถังหมักขนาด 20 ลิตร) มาเป็น 1.21-1.55 unit/ml-hr (ถังหมักขนาด 20 ลิตร ชนิดเดียวกับที่ใช้ในโครงการ RDG5650081) นอกจากนี้ ผลจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 นี้ ยังทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมที่เอนไซม์โปรติเอสทำงานได้สูงสุด เพื่อการประยุกต์ใช้งานผลิตน้ำยาล้างพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ และสุดท้าย เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้นี้ มีความเป็นไปได้ที่นำไปใช้ร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือทางการแพทย์ของโรงงานได้ แต่จำเป็นต้องปรับปรุงสภาวะการผลิตบางขั้นตอนเพื่อให้ได้ถุงมือที่มีคุณภาพเทียบเท่าถุงมือของโรงงาน ดังที่กล่าวไว้แล้วก่อนหน้านี้

### สรุปผลการดำเนินงาน

จากผลการวิจัยทั้งสองโครงการภายใต้แผนงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่าสามารถขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตรได้ โดยมีค่าผลได้ (productivity) ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาจากโครงการ RDG5650081 ประมาณ 3-3.8 เท่า (ขึ้นกับรูปแบบการหมัก) โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 28-30 °C ให้อากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm<sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 150 rpm การหมักรูปแบบกึ่งกะให้ค่า productivity สูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 20% ต้นทุนการผลิตเอนไซม์จากการหมักแบบกึ่งกะต่ำกว่าการหมักแบบกะประมาณ 3 เท่า การนำเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ควรปรับสภาวะของกระบวนการผลิตนั้นๆ ให้ใกล้เคียงกับสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ อันได้แก่ อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง 8.0-9.0 และไม่เกิน 10.0 กระบวนการผลิตปราศจากสารเคมีกลุ่ม Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, EDTA และ SDS

การเติมเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้ร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน พบว่าส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือ ได้แก่ ค่าแรงดึงและค่า stress at 500% จึงไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

## ข้อเสนอแนะที่คาดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

ผู้วิจัยได้วางแผนต่อยอดที่จะนำเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้นี้ไปทดสอบใช้จริงในกระบวนการผลิตของโรงงานผลิตน้ำยางข้น จากนั้นประเมินความเป็นไปได้ทั้งด้านคุณภาพและต้นทุนการผลิต แต่ในส่วนของการต่อยอดนำน้ำยางพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ (ด้วยการเติมโปรตีเอส) มาผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ นั้น ก็มีแผนทดลองขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเน้นที่ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ เช่น แผ่นปิดแผล แผ่นยางใช้งานทันตกรรม เป็นต้น ทั้งนี้ จากเดิมที่ได้มีการศึกษาการขึ้นรูปเป็นถุงมือทางการแพทย์นั้น ก็พบว่ายังต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับสูตรการขึ้นรูปหรือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัลคาไนซ์ยางเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความแข็งแรง โดยอย่างน้อยต้องผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05

## ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิชาการเรื่อง “Mechanical and biological properties of allergic protein- free rubber examination glove”

บทความวิชาการเรื่อง “Capability of purified protease from *Bacillus subtilis* MR10 in rubber allergic protein degradation”

## บทคัดย่อ

งานวิจัยชุดนี้ประกอบด้วยโครงการย่อยจำนวน 2 โครงการ ได้แก่ โครงการการขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ในการเตรียมน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ และโครงการการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม และทดสอบการใช้เอนไซม์โปรติเอสร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือทางการแพทย์ ผลการศึกษาพบว่าสามารถขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตรได้ โดยมีค่าผลได้ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาจากโครงการ RDG5650081 ประมาณ 3-3.8 เท่า โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 28-30 °C ให้อากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm<sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 150 rpm การหมักรูปแบบกึ่งกะให้ค่าผลได้สูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 20% ต้นทุนการผลิตเอนไซม์จากการหมักแบบกึ่งกะต่ำกว่าการหมักแบบกะประมาณ 3 เท่า จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรติเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรติเอส 2 (P2) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เอนไซม์ P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ P1 และ P2 ยังมีเสถียรภาพได้ที่ช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรติเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน การนำเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ควรปรับสภาวะของกระบวนการผลิตนั้นๆ ให้ใกล้เคียงกับสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ เพื่อให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุด อันได้แก่ อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง 8.0-9.0 และไม่เกิน 10.0 กระบวนการผลิตต้องปราศจากสารเคมีกลุ่ม  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , EDTA และ SDS ผลจากการศึกษา ยังพบอีกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดนี้มี 2 กลุ่ม ซึ่งให้ชื่อว่า P1 และ P2 นอกจากนี้ ยังพบว่าการเติมเอนไซม์โปรติเอสร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน ส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง โดยค่าแรงดึงและค่า stress at 300% ไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์ยาง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

## Abstract

This research program composes of 2 research projects, including the semi-pilot up-scaling process of protease production for applying in allergic protein-free rubber latex preparation and the characterization of *Bacillus subtilis* MR10 proteases for utilizing process development in industrial scale production of this enzyme. The main objectives of this program involve the development of protease enzyme production from bacterial *Bacillus subtilis* MR10 in the semi-pilot scale and to test for the application of protease in the manufacturing of medical glove. The results from these research found that the the production of protease from *B. subtilis* MR10 could be up-scaled in 20L fermenter. Approximately 3.0-3.38 times of protease productivity comparing to that from the project RDG5650081 was obtained. The optimal conditions for protease production were under the temperature at 28-30 °C, aeration at 1.0 kg/cm<sup>2</sup>, agitation at 150 rpm. The productivity obtained from semi-batch fermentation was about 20% higher than batch fermentation. The production cost of semi-batch fermentation was also lower than batch fermentation about 3 times. According to our study, it was also found that crude protease consisted of two proteases, Protease 1 (P1) and Protease 2 (P2). The molecular weights of P1 and P2 were approximately 45 and 30 kDa. The optimal pH for the P1 and P2 activity was 9.0 and 8.0 while the optimal temperatures were 45-55 and 45-50°C, respectively. P1 and P2 were stable at pH range of 5.0-10.0 and 7.0-10.0, respectively. Kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of P1 were 8.0 mg·ml<sup>-1</sup> and 3840 µg·ml<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> respectively, while those of P2 were 13.8 mg·ml<sup>-1</sup> and 5302 µg·ml<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. The use of this protease in any manufacturing should be under the optimal conditions of protease to maximize the enzyme efficiency, i.e. temperature at 45-55°C, pH 8.0-9.0 and not higher than 10.0 and free from Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, EDTA and SDS. Moreover, the application of protease in the manufacturing of medical glove negatively effected on the rubber vulcanization. The tensile and stress at 500% did not meet to the standard of ISO and ASTM D3578-05 (Rubber examination glove). Thus the glove formula and vulcanization conditions must be optimized when this protease is applied, to obtain the higher quality product.

## บทนำ

แม้ประเทศไทยจะเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำยางพาราที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่งของโลก (ข้อมูลจากปี 2550-2554 ของศูนย์วิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมยางไทย; <http://www.rubbercenter.org/index.php/worldrubberindustry>) แต่กลับพบว่ามูลค่าตลาดสินค้ายางพาราลดต่ำกว่าประเทศเพื่อนบ้านบางประเทศ ทั้งนี้อาจเนื่องจากประเทศเหล่านี้ได้เน้นส่งเสริมการผลิตผลิตภัณฑ์แปรรูปจากน้ำยางพาราซึ่งมีมูลค่าสูงกว่าน้ำยางพารามาก ไม่เพียงเท่านั้น ปัจจุบันพบว่าเกษตรกรไทยยังต้องพบกับปัญหาโรคยางที่ตกต่ำ อันเนื่องมาจากปริมาณน้ำยางพาราที่มากเกินไปเกินปริมาณการใช้ ดังนั้นควรถึงเวลาที่ไทยต้องยกระดับสินค้ายางพาราให้มีมูลค่าสูงขึ้น โดยเน้นการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ และเมื่อวิเคราะห์กลุ่มผลิตภัณฑ์จากยางพาราที่มีการเติบโตอย่างต่อเนื่องแล้วก็จะพบว่าตลาดผลิตภัณฑ์สุขภาพและอุปกรณ์เสริมทางการแพทย์ของไทยมีมูลค่าสูงขึ้นทุกปี ยกตัวอย่างเช่น ถุงมือผ่าตัด ถุงยางอนามัย สายฉีดน้ำเกลือ สายให้อาหาร ท่อสวนปัสสาวะ อุปกรณ์อนามัยในช่องปาก แผ่นปิดแผล และแผ่นมาส์คหน้า เป็นต้น แต่ส่วนใหญ่จะมีการนำเข้าสินค้าเหล่านี้จากต่างประเทศทั้งสิ้น เช่น จากเยอรมัน ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตามมักมีผู้โจมตีว่าน้ำยางธรรมชาติมีโปรตีนภูมิแพ้ (Allergenic proteins) เป็นองค์ประกอบอยู่ อันจะเกิดผลเสียต่อผู้ป่วยหรือผู้ใช้งานได้ เช่น เกิดอาการคันจนกระทั่งอาการรุนแรงขึ้นดังที่เรียกว่า Anaphylaxis สิ่งนี้เป็นอุปสรรคที่กระทบต่อความเชื่อมั่นของผู้ใช้งานผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์จากยางพารา ดังนั้นเพื่อเป็นการคลายความกังวลในประเด็นนี้ให้กับผู้ใช้งาน คณะผู้วิจัยซึ่งเคยได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในปี 2552-2555 (RDG5250027, RDG5350029, RDG5450045, RDG5550059) จึงได้พัฒนากระบวนการทางชีวภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้จากน้ำยางพาราโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้รับการรับรองว่าปลอดภัย ทดแทนการใช้สารเคมีในการกำจัดโปรตีนแบบดั้งเดิม นอกจากนี้แบคทีเรียยังเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตโปรตีนเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b1 (Rubber elongation factor) Hev b3 (Small rubber particle protein) และ Hev b 5 (Acidic protein) ซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้ที่สำคัญในยางพาราได้ โดยโปรตีนสองชนิดแรกนี้ พบในส่วนของเนื้อยางพาราดังนั้นจึงมักตกค้างในผลิตภัณฑ์ ส่วนโปรตีนชนิดที่สามแม้จะพบในส่วนของชั้นซีรัมที่สามารถกำจัดทิ้งไปได้ด้วยการปั่นเหวี่ยง แต่ก็มีสมบัติทนต่อความร้อนได้ดี งานวิจัยเหล่านี้สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้เกิดแก่ผู้ใช้งานอุปกรณ์ทางการแพทย์ที่มียางธรรมชาติเป็นส่วนประกอบได้ ว่าปลอดภัยจากโปรตีนภูมิแพ้

เอนไซม์โปรติเอสนับเป็นหัวใจสำคัญของกระบวนการทางชีวภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งการผลิตโปรติเอสเพื่อป้อนสู่การใช้งานในระดับอุตสาหกรรมนั้น มีหลายประเด็นที่จำเป็นต้องศึกษา โดยเบื้องต้น ในปีงบประมาณ 2556 ที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสรวมถึงกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรติเอสออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (RDG5650081) เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ซึ่งประเด็นดังกล่าว

ช่วยให้มีความเป็นไปได้สูงขึ้นไปที่จะนำโปรตีนเอนไซม์ไปใช้งานจริงในเชิงการค้า อย่างไรก็ตาม ประเด็นสำคัญอื่นๆ ที่จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อสามารถผลิตโปรตีนเอนไซม์สำหรับใช้งานจริงระดับอุตสาหกรรมก็คือ การพัฒนากระบวนการผลิตในปริมาณสูง (Large scale production) เพื่อให้เกิดความคุ้มค่าของกระบวนการผลิต และการศึกษาสมบัติเฉพาะตัวของเอนไซม์โปรตีน (Enzyme characterization) จากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบกรรมวิธีการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ รวมถึงใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ พาราที่เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ประเด็นหัวข้อวิจัยที่กล่าวถึงนี้ จะช่วยให้กระบวนการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอนไซม์สำหรับใช้งานในระดับอุตสาหกรรมมีความเป็นไปได้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เป็นประโยชน์ต่อภาคการผลิตผลิตภัณฑ์จากยารักษาสำหรับงานทางการแพทย์ของประเทศได้

### วัตถุประสงค์ของแผนงานวิจัย

- (1) เพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอนไซม์ในระดับกึ่งอุตสาหกรรมจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 สำหรับใช้งานในอุตสาหกรรมการผลิตถุงมือทางการแพทย์ที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้
- (2) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของกระบวนการขึ้นรูปถุงมือทางการแพทย์จากน้ำยางที่กำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรตีนเอนไซม์จากงานวิจัย

### ผลการดำเนินงาน

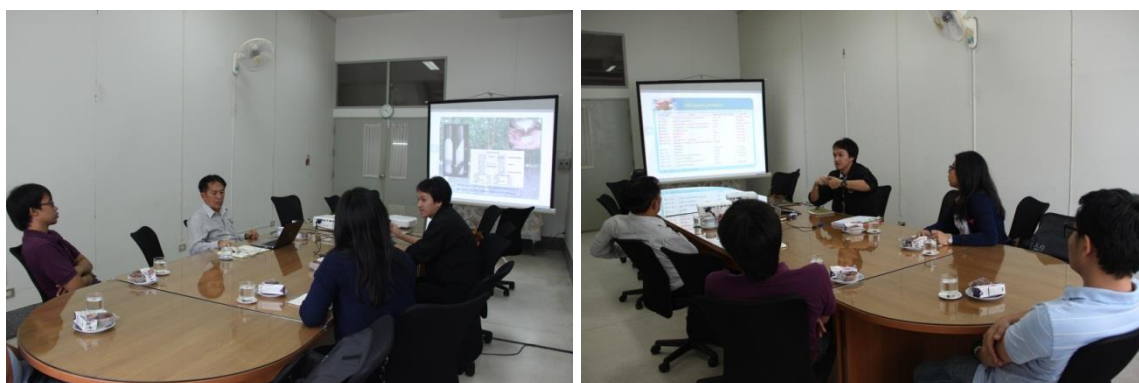
#### 1. การดำเนินงานส่วนที่บริหารโดยแผนงานวิจัย

เนื่องจากบุคลากรบางส่วนยังขาดประสบการณ์เกี่ยวกับศาสตร์ของยารักษา ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคสำคัญในการเชื่อมโยงศาสตร์ที่ตนเชี่ยวชาญให้เข้ากับเป้าหมายหลักของชุดโครงการ ซึ่งก็คือ อุตสาหกรรมการแปรรูปยารักษา ดังนั้นหัวหน้าแผนงานวิจัยจึงดำเนินการพัฒนาบุคลากรทุกฝ่ายให้พร้อมสำหรับการทำงานเพื่อเป้าหมายนี้ โดยได้มีการจัดกิจกรรมต่างๆ เพื่อลดจุดด้อยดังที่กล่าวไว้แล้วได้แก่

#### 1.1 กิจกรรมประชุมซักซ้อมความเข้าใจ และการจัดการความรู้ (Knowledge management)

กิจกรรมจัดขึ้นในวันที่ 10 พฤศจิกายน 2557 ณ ห้องประชุม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยมีการแลกเปลี่ยนเรียนรู้กันในหัวข้อ “โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราและเทคโนโลยีการกำจัด” ผู้ร่วมกิจกรรมประกอบไปด้วย อ.ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน (หัวหน้าชุดโครงการ

และหัวหน้าโครงการย่อยที่ 1) ผศ.ดร.ชาติชาย โจนงนุช (หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2) นักศึกษาผู้ช่วยวิจัย 2 คน นักวิจัยภายนอกที่สนใจ 1 คน เนื้อหาจากกิจกรรมนี้เป็นจุดเริ่มต้นที่ชี้ให้เห็นถึงที่มาและความสำคัญของงานวิจัย และเป้าหมายที่ชุดโครงการจะต้องไปให้ถึง เมื่อเสร็จสิ้นกิจกรรมนี้แล้ว พบว่าทุกคนมีความเข้าใจมากยิ่งขึ้นถึงความจำเป็นในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในภาคอุตสาหกรรมอันเนื่องมาจากโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา ตลอดจนบทบาทของตนเองในงานวิจัยชุดนี้ อย่างไรก็ตาม การที่นักวิจัยทุกระดับของโครงการชุดนี้จะได้มีโอกาสศึกษาและเรียนรู้ห่วงโซ่การผลิตของอุตสาหกรรมยางพาราตั้งแต่ต้นน้ำจนถึงปลายน้ำนั้นนับว่ามีความสำคัญมาก จึงเป็นที่มาของกิจกรรมดูงานนอกสถานที่



ภาพที่ 1 กิจกรรมแลกเปลี่ยนเรียนรู้กันในหัวข้อ “โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราและเทคโนโลยีการกำจัด” ในวันที่ 10 พฤศจิกายน 2557

## 1.2 กิจกรรมดูงานโรงงานผลิตน้ำยางพาราชั้น

อ.ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และ ผศ.ดร.ชาติชาย โจนงนุช ได้เดินทางเข้าศึกษาดูงานกระบวนการผลิตน้ำยางชั้น ณ บริษัทไทยรับเบอร์ลาเท็กซ์คอร์เปอร์เรชั่น (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี ในวันที่ 3 ธันวาคม 2557 ในครั้งนั้นได้รับการต้อนรับจากผู้จัดการโรงงานและผู้จัดการฝ่ายวิจัยและพัฒนา จากนั้นเจ้าหน้าที่จึงนำเยี่ยมชมกระบวนการผลิตพร้อมทั้งบรรยายประกอบ จุดเยี่ยมชมหลัก ได้แก่ จุดรับน้ำยางพาราสด เครื่องปั่นเหวี่ยงน้ำยางพารา จุดรวมหางน้ำยาง (ซีรัม) จุดผลิตยางเต่าหัว บ่อน้ำเสีย และโกดังเก็บยางเครป นอกจากนี้ทางโรงงานยังสาธิตการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ในระดับห้องปฏิบัติการให้ชมอีกด้วย ซึ่งผู้วิจัยได้ความรู้เป็นอย่างมากสำหรับการทดลองขึ้นรูปถุงมือยางที่จะได้ดำเนินการในครึ่งปีหลังของโครงการ นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักวิจัย

ผลจากการเข้าศึกษาดูงานกระบวนการผลิตฯ ครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่จะผลิตขึ้นมาสำหรับกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ หากจะนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์แล้ว ควรใช้เติมในขั้นตอนการรวบรวมน้ำยางก่อนการปั่นเหวี่ยงจึงจะเหมาะสม เนื่องจากมีความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ต่ำ ไม่ส่งผลเสียต่อการทำงานย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรติเอส แต่อย่างไรก็ตาม ก็พบอีก

หนึ่งประเด็นที่นักวิจัยต้องการคำตอบ คือยี่ห้อที่ทางโรงงานแจกให้เกษตรกรเติมในน้ำยางพาราเพื่อป้องกันการเสียดสีสภาพในระหว่างการขนส่งนั้น ส่งผลเสียต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสหรือไม่



ภาพที่ 2 กิจกรรมการศึกษาดูงานกระบวนการผลิตน้ำยางข้น ณ บริษัทไทยรับเบอร์ลาเท็กซ์คอร์เปอร์เรชั่น (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี

### 1.3 กิจกรรมดูงานสวนยางพาราและการทำยางแผ่นของเกษตรกร

ในช่วงเช้าของวันที่ 10 ธันวาคม 2558 นักวิจัยทั้งหัวหน้าโครงการและผู้ช่วยวิจัยได้เดินทางไปยังสวนยางพาราในพื้นที่อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดพะเยา เพื่อศึกษาดูงานการปลูกและการกรีดยางพารา ซึ่งเป็นต้นทางของกระบวนการแปรรูปยางพาราในระดับอุตสาหกรรม นักวิจัยได้รับฟังการบรรยายและสาธิตการกรีดยางโดยเกษตรกรเจ้าของสวน และรับทราบข้อมูลว่า เดิมจะมีพ่อค้าคนกลางมารับซื้อน้ำยางพาราสดตั้งนั้นจึงมีการเพิ่มสารรักษาคุณภาพชนิดต่างๆ ลงไปเพื่อป้องกันการจับตัวของน้ำยาง แต่เนื่องจากในเขตภาคเหนือตอนบนยังไม่มีโรงงานผลิตน้ำยางพาราชั้น ปัจจุบันจึงไม่มีการซื้อ-ขายน้ำยางพาราสดแล้ว ดังนั้นเกษตรกรจึงหันมาแปรรูปน้ำยางเป็นยางก้อนถ้วยและยางแผ่นเพื่อส่งขายแทน นอกจากนี้ที่มวิจัยยังได้มีโอกาสเรียนรู้วิธีการทำยางแผ่นจากเกษตรกรด้วย ทำให้เข้าใจห่วงโซ่ของการแปรรูปยางพารามากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 3 การศึกษาดูงานสวนยางพาราและการทำยางแผ่น เมื่อวันที่ 10 ธันวาคม 2557 ณ อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดพะเยา

#### 1.4 การประชุมติดตามความก้าวหน้าของโครงการ

เพื่อเป็นการติดตามความก้าวหน้าของโครงการแต่ละโครงการย่อย จึงได้จัดให้มีการประชุม รายงานความก้าวหน้าขึ้น แต่เนื่องด้วยเวลาที่ไม่ลงตัวของแต่ละฝ่าย จึงสามารถจัดการประชุมอย่างเป็นทางการเพียงหนึ่งครั้ง ณ ห้องประชุมห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในวันที่ 4 มีนาคม 2558 แต่อย่างไรก็ตาม ทางทีมวิจัยก็ได้มีการ แลกเปลี่ยน บริक्षा และประสานงานอยู่เป็นประจำ ผ่านการสื่อสารรูปแบบต่างๆ เช่น โทรศัพท์ จดหมายอิเล็กทรอนิกส์ และสื่อออนไลน์

#### 2. กิจกรรมภายใต้โครงการย่อยที่ 1 และ 2

รายละเอียดได้ถูกรายงานในส่วนถัดไปของรายงาน

#### สรุปผลการดำเนินงาน

จากผลการวิจัยทั้งสองโครงการภายใต้แผนงานวิจัยนี้ สรุปได้ว่าสามารถขยายกำลังการผลิต เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตรได้ โดยมีค่าผลได้ (productivity) ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาจากโครงการ RDG5650081 ประมาณ 3-3.8 เท่า (ขึ้นกับรูปแบบการหมัก) โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 28-30 °C ให้อากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm<sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 150 rpm การหมักรูปแบบกึ่งกะให้ค่า productivity สูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 20% ต้นทุนการผลิตเอนไซม์จากการหมักแบบกึ่งกะต่ำกว่าการหมักแบบกะประมาณ 3 เท่า การนำเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ควรปรับ สภาวะของกระบวนการผลิตนั้นๆ ให้ใกล้เคียงกับสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ อันได้แก่ อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง 8.0-9.0 และไม่เกิน 10.0 กระบวนการผลิต ปราศจากสารเคมีกลุ่ม Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, EDTA และ SDS

การเติมเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้ร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือทางการแพทย์ด้วย สูตรมาตรฐานของโรงงาน พบว่าส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือ ได้แก่ ค่าแรงดึง และค่า stress at 500% จึงไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีน ภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

### โครงการย่อยที่ 1

การขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ในการเตรียมน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้

Semi-pilot up-scaling process of protease production for applying in allergic protein-free rubber latex preparation

## บทสรุปรายงานสำหรับผู้บริหาร

**ชื่อโครงการ** การขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ในการเตรียมน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้  
Semi-pilot up-scaling process of protease production for applying in allergic protein-free rubber latex preparation

### ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล	ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน		
หน่วยงาน	สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้		
ที่อยู่	63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290		
โทรศัพท์	053-873540	โทรสาร	053-878225
E-mail	<a href="mailto:pairote@mju.ac.th">pairote@mju.ac.th</a>		

### นักศึกษา/ ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวฉันทนา สุโพ		
หน่วยงาน	สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้		
ที่อยู่	63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290		
โทรศัพท์	053-873540	โทรสาร	053-878225

งบประมาณทั้งโครงการ 609,400 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2557 ถึง 30 พฤศจิกายน 2558

## หลักการและเหตุผล

ภายหลังจากศึกษาการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสผงจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อใช้ย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยารักษา ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนภายใต้โครงการ “การคัดเลือกโปรติเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยาดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027)” และ “การเตรียมโปรติเอสในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยารักษา (สัญญาเลขที่ RDG5350029)” พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์โปรติเอสในรูปแบบผงที่สะดวกต่อการเก็บรักษาและใช้งานได้ ทั้งยังพบว่าโปรติเอสดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในน้ำยารักษาได้ ดังผลการศึกษาจากโครงการ “การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045)” แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยตระหนักดีว่ากระบวนการเตรียมโปรติเอสผงดังกล่าวนี้ ใช้ต้นทุนค่อนข้างสูง จึงได้พัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์ด้วยต้นทุนที่ต่ำลง โดยเน้นปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและกระบวนการตกตะกอนโปรตีนที่มีค่าใช้จ่ายลดลง ซึ่งเป็นสิ่งที่กำลังดำเนินการศึกษาในโครงการวิจัยหัวข้อ “การพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำสำหรับผลิตน้ำยารักษาจากโปรตีนภูมิแพ้” (สัญญาเลขที่ RDG5650081) อย่างไรก็ตาม ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้เพียงพอต่อการใช้งานระดับอุตสาหกรรมนั้น จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้น โดยอย่างน้อยต้องมากกว่าระดับกึ่งอุตสาหกรรม (Semi pilot scale) (มากกว่า 20 ลิตร) แต่การเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป ไม่ว่าจะเป็นการถ่ายเทออกซิเจน สารอาหาร และความร้อนที่ลดลง และแรงดันภายในถังหมักที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร ซึ่งก็คาดว่าจะทำให้อัตราการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้ออยู่ในระดับเป็นที่น่าพอใจได้ นอกจากนี้ ปัจจัยเรื่องระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ก็เป็นหนึ่งในต้นทุนของการผลิตเช่นกัน โดยกระบวนการหมักแต่ละรูปแบบจะส่งผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อเมื่อเทียบกับต่อหน่วยผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาเปรียบเทียบและคัดเลือกรูปแบบของกระบวนการหมักที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 20 ลิตร ขึ้นไป เพื่อให้ได้ค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 สูงเป็นที่น่าพอใจก็จะได้ทำการศึกษาดูด้วยเช่นกัน

ผู้วิจัยคาดว่า ด้วยการศึกษและพัฒนาดังรายละเอียดที่เสนอมารั้งนี้ จะช่วยให้เกิดความเป็นไปได้ที่สูงขึ้นในการนำเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 มาใช้งานจริงในภาคอุตสาหกรรม

## วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร
- (2) เพื่อศึกษารูปแบบการหมักที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 20 ลิตร เพื่อเพิ่มค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอส
- (3) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของกระบวนการขึ้นรูปถุงมืออย่างทางการแพทย์จากน้ำยางที่กำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย รวมถึงการศึกษาสมบัติของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐาน ISO

## ผลการดำเนินงาน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและรูปแบบของการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักในถังหมักขนาด 20 ลิตร อีกทั้งเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในการผลิตถุงมืออย่างที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ภายใต้สภาวะการผลิตของโรงงาน โดยในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ออกแบบระบบถังหมักขนาด 20 ลิตร ที่มีการจ่ายอากาศผ่านปั๊มอากาศ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ประกอบไปด้วย กากถั่วเหลือง (100 กรัม/ลิตร)  $K_2HPO_4$  (0.7 กรัม/ลิตร)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.7 กรัม/ลิตร) กลูโคส (1.1 กรัม/ลิตร)  $(NH_4)_2SO_4$  (0.275 กรัม/ลิตร) และ  $NH_4Cl$  (0.275 กรัม/ลิตร) ปรับ pH เริ่มต้นที่ 6.0 ซึ่งเป็นสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่ได้จากงานวิจัย RDG5650081 จากนั้นทำการทดลองโดยเริ่มต้นจากการหมักแบบกะ (batch fermentation) ที่ระดับอุณหภูมิตั้งแต่ 28-55 °C อัตราการให้อากาศตั้งแต่ 0.5-2 kg/cm<sup>2</sup> และอัตราการกวนตั้งแต่ 50-150 rpm แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการหมักในค่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ (unit/ml) การผลิตโปรติเอสต่อหน่วยเวลา (Productivity; unit/ml-hr) Product yield coefficient ( $Y_{p/x}$ ) การเจริญของเซลล์ (log cfu/ml) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; per hr) โดยเน้นพิจารณาที่ค่า productivity ของการผลิตเอนไซม์เป็นสำคัญ ผลการทดลองพบว่า การหมักที่อุณหภูมิห้อง (28-30 °C) ให้อากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm<sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 150 rpm เหมาะสมที่สุด โดยให้ค่า productivity สูงสุดเท่ากับ 1.21 unit/ml-hr เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ต่อมาได้มีการศึกษาถึงรูปแบบการหมักที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสให้ได้ค่า productivity สูงสุด ซึ่งได้ทดสอบหมักอีกสองรูปแบบคือ แบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) และต่อเนื่อง (continuous fermentation) แต่พบว่าการหมักแบบต่อเนื่องนั้นไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากกากถั่วเหลืองที่เป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอนุภาคค่อนข้างใหญ่ จึงทำให้อุดตันในท่อจ่ายอาหารเหลว ดังนั้นจึงมุ่งทำการศึกษารูปแบบการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งทดสอบเติมอาหาร 3 ระดับ คือ 500 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตรในทุกๆ 12 ชั่วโมงหลังจากการหมักแบบกะเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว

ผลการทดลองพบว่าการเติมอาหาร 1,000 มิลลิลิตรให้ประสิทธิภาพในการหมักในรูปค่า productivity ดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.55 unit/ml-hr เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ค่านี้สูงกว่าที่ได้จากการหมักแบบกะประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และสุดท้ายก็ได้ทดสอบการหมักแบบกะในถังหมักชนิด stirred tank reactor (STR) ขนาด 50 ลิตร โดยใช้สภาวะที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ผลการทดลองพบว่ามีประสิทธิภาพของการหมักที่สูงมาก โดยให้ค่า productivity เท่ากับ 13.47 unit/ml-hr ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจนกระทั่งอยู่ในรูปแบบพร้อมใช้งานแล้ว สามารถสรุปได้ว่าการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตรมีต้นทุนที่ถูกที่สุด (0.0014 บาทต่อยูนิต) รองลงมาคือ การหมักแบบกึ่งกะ (0.0053 บาทต่อยูนิต) และแบบกะในถังหมักขนาด 20 ลิตร (0.0137 บาทต่อยูนิต) แต่การหมักแบบกะในถังหมัก 20 ลิตรกลับใช้เวลาการผลิตเอนไซม์สั้นที่สุด (50 ชั่วโมง) ตามด้วยการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตร (60 ชั่วโมง) และการหมักแบบกึ่งกะในถังหมัก 20 ลิตร (74 ชั่วโมง) ตามลำดับ การทดลองสุดท้ายที่ได้ศึกษาคือ การทดลองนำเอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตได้นี้มาใช้งานจริงในการทำถุงมือยางทางการแพทย์ที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ โดยการทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์ สารเคมี สูตร อุปกรณ์และเทคนิคการทำถุงมือยางจากบริษัทผู้ผลิตถุงมือยางแห่งหนึ่งในจังหวัดสงขลา ทำการผลิตทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่ สูตรมาตรฐานของโรงงาน สูตรเติมเอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้า (สูตร 6L) และสูตรเติมเอนไซม์โปรตีนเอสจากงานวิจัย (สูตร MR10) ผลการทดลองพบว่าถุงมือสูตร MR10 มีลักษณะปรากฏที่ใกล้เคียงกับสูตรมาตรฐานของโรงงานทั้งในด้านความหนา สี และผิวสัมผัส ในขณะที่สูตร 6L ที่เติมเอนไซม์ทางการค้านั้นมีลักษณะแตกต่าง โดยมีผิวที่บางกว่าและขาดง่าย อีกทั้งพื้นผิวของถุงมือค่อนข้างเหนียว ทำให้ต้องใช้แปรงในปริมาณมากเพื่อลดการเกาะตัวของถุงมือ ผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของถุงมือตามมาตรฐาน มอก.538-2548 (ถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว) ซึ่งทดสอบตามมาตรฐาน ISO ผลการทดลองพบว่าความหนาของทุกสูตรผ่านมาตรฐานที่ซึ่งกำหนดไว้ที่ 0.1 มม. ความยืดเมื่อขาดก็เช่นกันที่ผ่านมาตรฐานทุกสูตร แต่ประเด็นอื่นๆ ได้แก่ แรงดึงเมื่อขาดและความเค้นดึงเมื่อมีการยืดร้อยละ 300 ไม่ผ่านมาตรฐานทั้งสามสูตร ทั้งนี้สูตรไม่เติมเอนไซม์มีค่าสูงที่สุด ตามมาด้วยสูตรที่เติมเอนไซม์จากเชื้อ MR10 ส่วนสูตรที่เติมเอนไซม์ทางการค้าให้ค่าทดสอบที่ต่ำที่สุด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดสอบสมบัติของถุงมือตามมาตรฐาน ASTM ทั้งก่อนและหลังการบ่มแรง พบว่าถุงมือที่เติมเอนไซม์โปรตีนเอสทั้งสองสูตรมีความแข็งแรงในรูปของค่า Tensile และ stress at 500% ที่ต่ำกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตร 6L มีเพียงค่าความยืดเมื่อขาด (elongation at break) เท่านั้นที่มีค่าสูงกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน และเมื่อเปรียบเทียบสมบัติของถุงมือยางที่ผลิตครั้งนี้กับข้อกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ Rubber examination glove (ASTM D3578-05) type II แล้ว พบว่าความหนาของถุงมือทุกสูตรผ่านมาตรฐาน ส่วนค่า Tensile นั้นพบว่าสูตรของโรงงานผ่านมาตรฐาน แต่สูตรที่เติมเอนไซม์ไม่ผ่านมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากการบ่มแรงแล้วพบว่าสูตร MR10 มีค่าสูงขึ้นและผ่านมาตรฐานได้ในขณะที่ค่า Stress at 500% ก็พบว่า มีเพียงสูตรของโรงงานเท่านั้นที่ผ่านมาตรฐาน คาดว่าเอนไซม์โปรตีนเอสน่าจะส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือจึงต่ำกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน

ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

### สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยที่ได้รับในครั้งนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ด้วยอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักในถังหมักขนาด 20 ลิตร คือการหมักที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ  $1.0 \text{ kg/cm}^2$  และมีการกวนด้วยใบพัดที่อัตราเร็ว 150 rpm ภายใต้สภาวะดังกล่าว และมีการหมักในรูปแบบกะ (batch fermentation) จะสามารถทำให้ได้ค่า productivity เท่ากับ  $1.21 \text{ unit/ml-hr}$  แต่ค่า productivity จะสามารถเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ หากทำการเพาะเลี้ยงในรูปแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่มีการเติมอาหารใหม่ 1 ลิตรในทุก 12 ชั่วโมง ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแบบกะไปแล้ว 24 ชั่วโมง และค่า productivity จะเพิ่มขึ้นกว่า 10 เท่าหากทำการหมักในถังหมักที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมของการหมักให้คงที่ ดังเช่นการใช้ถังหมัก STR ขนาด 50 ลิตร ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจนกระทั่งอยู่ในรูปแบบพร้อมใช้งานแล้ว สามารถสรุปได้ว่าการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตรมีต้นทุนที่ถูกที่สุด (0.0014 บาทต่อยูนิต) รองลงมาคือการหมักแบบกึ่งกะ (0.0053 บาทต่อยูนิต) และแบบกะในถังหมักขนาด 20 ลิตร (0.0014 บาทต่อยูนิต) แต่การหมักแบบกะในถังหมัก 20 ลิตรกลับใช้เวลาการผลิตเอนไซม์สั้นที่สุด (50 ชั่วโมง) ตามด้วยการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตร (60 ชั่วโมง) และการหมักแบบกึ่งกะในถังหมัก 20 ลิตร (74 ชั่วโมง) ตามลำดับ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ครั้งนี้ เมื่อนำมากำจัดโปรตีนในน้ำยางข้นแล้ว นำไปผลิตเป็นถุงมือทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน พบว่าส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือ ได้แก่ ค่าแรงดึงและค่า stress at 500% จึงไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

### ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

มีข้อเสนอแนะหากต้องนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ในการผลิตถุงมือของโรงงาน ที่จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับสูตรการขึ้นรูปหรือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัลคาไนซ์ยางเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความแข็งแรง อย่างน้อยต้องผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05

## ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิชาการเรื่อง “Mechanical and biological properties of allergic protein- free rubber examination glove”

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและรูปแบบของการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักในถังหมักขนาด 20 ลิตร อีกทั้งเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในการผลิตถุงมือยางที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ภายใต้สภาวะการผลิตของโรงงาน ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตรคือการหมักที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ  $1.0 \text{ kg/cm}^2$  และมีการกวนด้วยใบพัดที่อัตราเร็ว 150 rpm ซึ่งเมื่อทำการหมักแบบกะ (batch fermentation) ทำให้ได้ค่า productivity เท่ากับ  $1.21 \text{ unit/ml-hr}$  แต่ค่า productivity จะสามารถเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ หากทำการเพาะเลี้ยงในรูปแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่มีการเติมอาหารใหม่ 1 ลิตรในทุก 12 ชั่วโมงภายหลังการเพาะเลี้ยงแบบกะไปแล้ว 24 ชั่วโมง และค่า productivity จะเพิ่มขึ้นกว่า 10 เท่าหากทำการหมักในถังหมักที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมของการหมักให้คงที่ เช่น การใช้ถังหมัก stirred tank reactor (STR) ขนาด 50 ลิตร ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจนกระทั่งอยู่ในรูปแบบพร้อมใช้งานแล้ว สามารถสรุปได้ว่าการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตรมีต้นทุนที่ถูกที่สุด (0.0014 บาทต่อยูนิต) รองลงมาคือการหมักแบบกึ่งกะ (0.0053 บาทต่อยูนิต) และแบบกะในถังหมักขนาด 20 ลิตร (0.0137 บาทต่อยูนิต) แต่การหมักแบบกะในถังหมัก 20 ลิตรกลับใช้เวลาการผลิตเอนไซม์สั้นที่สุด (50 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตร (60 ชั่วโมง) และการหมักแบบกึ่งกะในถังหมัก 20 ลิตร (74 ชั่วโมง) เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ครั้งนี้ เมื่อนำมากำจัดโปรตีนในน้ำยางข้นแล้วนำไปผลิตเป็นถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน พบว่าส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือ ได้แก่ ค่าแรงดึงและค่า stress at 300% ไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

## ABSTRACT

This research aimed to investigate the optimal conditions and fermentation mode of 20 L fermenter for the production of protease enzyme from *Bacillus subtilis* MR10 cultured in low-cost liquid medium containing soybean meal as a main composition. Moreover, possibility in applying of protease in the manufacturing of rubber examination glove was investigated. It was found that the optimal conditions for protease production in 20 L fermenter are cultivation at 28-30 °C, aeration rate at 1.0 kg/cm<sup>2</sup> and agitation rate at 150 rpm. When batch fermentation mode was operated, the productivity of protease at 1.21 unit/ml-hr was obtained. The productivity was approximately 20% increased, when fed-batch fermentation was operated with the addition of 1 L of fresh liquid medium every 12 hr after 24 hr of batch fermentation mode. Ten times higher of productivity could also be obtained when the batch fermentation was conducted in 50 L stirred tank bioreactor (STR). The production cost of protease production and formulation was subsequently analyzed. The results showed that the lowest cost was a production by batch fermentation in 50 L STR (0.0014 Baht/unit), following by fed-batch (0.0053 Baht/unit) and batch fermentation (0.0137 Baht/ml) in 20 L fermenter. However, the later mode consumed the shortest production time (50 hr) comparing to batch mode in 50 L STR (60L) and fed-batch mode in 20 L fermenter (74 hr). The protease produced in this research was applied in the deprotenization of concentrated rubber latex and subjected to the manufacturing of rubber examination glove. It was found that enzyme might affect to the vulcanization of rubber. The physical properties; i.e. tensile and stress at 300% were then lower than those of the ISO and standard of rubber examination glove (ASTM D3578-05). Therefore, it was suggested that the formula development or optimization for vulcanization process need to be investigated, if protease will be applied in allergic protein-free glove manufacturing.

## บทนำ

ภายหลังจากศึกษาการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสผงจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อใช้ย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาราด ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนภายใต้โครงการ “การคัดเลือกโปรติเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยาดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027)” และ “การเตรียมโปรติเอสในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยาราด (สัญญาเลขที่ RDG5350029)” พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์โปรติเอสในรูปแบบผงที่สะดวกต่อการเก็บรักษาและใช้งานได้ ทั้งยังพบว่าโปรติเอสดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในน้ำยาราดได้ ดังผลการศึกษาจากโครงการ “การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาราดโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045)” แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยตระหนักดีว่ากระบวนการเตรียมโปรติเอสผงดังกล่าวนั้น ใช้ต้นทุนค่อนข้างสูง จึงได้พัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์ด้วยต้นทุนที่ต่ำลง โดยเน้นปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและกระบวนการตกตะกอนโปรตีนที่มีค่าใช้จ่ายลดลง ซึ่งเป็นสิ่งที่กำลังดำเนินการศึกษาในโครงการวิจัยหัวข้อ “การพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำสำหรับผลิตน้ำยาราดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้” (สัญญาเลขที่ RDG5650081) อย่างไรก็ตาม ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้เพียงพอต่อการใช้งานระดับอุตสาหกรรมนั้น จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้น โดยอย่างน้อยต้องมากกว่าระดับกึ่งอุตสาหกรรม (Semi pilot scale) (มากกว่า 20 ลิตร) แต่การเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป ไม่ว่าจะเป็นการถ่ายเทออกซิเจน สารอาหาร และความชื้นที่ลดลง และแรงดันภายในถังหมักที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร ซึ่งก็คาดว่าจะทำให้อัตราการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้ออยู่ในระดับเป็นที่น่าพอใจได้ นอกจากนี้ ปัจจัยเรื่องระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ก็เป็นหนึ่งในต้นทุนของการผลิตเช่นกัน โดยกระบวนการหมักแต่ละรูปแบบจะส่งผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อเมื่อเทียบกับต่อหน่วยผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาเปรียบเทียบและคัดเลือกรูปแบบของกระบวนการหมักที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 20 ลิตร ขึ้นไป เพื่อให้ได้ค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 สูงเป็นที่น่าพอใจก็จะได้ทำการศึกษาดูด้วยเช่นกัน

ผู้วิจัยคาดว่า ด้วยการศึกษาและพัฒนาดังรายละเอียดที่เสนอมารั้งนี้ จะช่วยให้เกิดความเป็นไปได้ที่สูงขึ้นในการนำเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 มาใช้งานจริงในภาคอุตสาหกรรม

## วัตถุประสงค์

- (1) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร
- (2) เพื่อศึกษารูปแบบการหมักที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 20 ลิตร เพื่อเพิ่มค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอส
- (3) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของกระบวนการขึ้นรูปถุงมือยางทางการแพทย์จากน้ำยางที่กำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย รวมถึงการศึกษาสมบัติของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐาน ISO

## การทบทวนเอกสาร

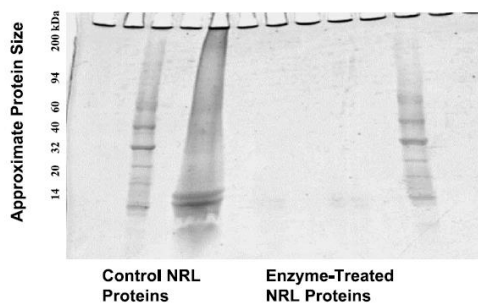
### 1. บทบาทของเอนไซม์โปรติเอสในกระบวนการกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสด

โปรตีนในน้ำยางพาราสดบางชนิดจัดเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergen) ดังแสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้ มีชนิดของโปรตีนประมาณ 25 เพอร์เซ็นต์จากทั้งหมดที่สามารถจับกับแอนติบอดีชนิด IgE ที่อยู่ในซีรัมของมนุษย์ และพบว่าอีกประมาณ 75 เพอร์เซ็นต์สามารถจับได้กับ IgG (Sussaman et al., 2002) โปรตีนก่อภูมิแพ้เหล่านี้จะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นในขั้นตอนการทำน้ำยางข้นสำหรับกระบวนการผลิตถุงมือยาง และโปรตีนก่อภูมิแพ้จะกระจายอยู่ทั่วไปบนพื้นผิวของถุงมือหลังจากกระบวนการทำแห้งและ heat vulcanization (นุชนาฏ และ วราภรณ์, 2539; Perraella and Gaspari, 2002) แม้จะใช้การล้างด้วยน้ำเปล่าแต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปได้หมดเสียทีเดียว แต่ก็มีรายงานว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำยางธรรมชาติสามารถถูกทำลายได้โดยการปรับสภาวะให้เป็นด่างแก่ เช่นการเติมแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำยางจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณสมบัติกายภาพของน้ำยางได้ (Moris and Lakin, 1995 อ้างโดย Perrella and Gaspari, 2002)

จากข้อมูลที่ว่าโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจะพบในส่วนของ serum phase 75 เพอร์เซ็นต์ และพบในส่วนของ rubber phase 25 เพอร์เซ็นต์ ซึ่งในส่วนนี้จะเกาะอยู่กับพื้นผิวของอนุภาคยาง (rubber particle) ดังนั้นแม้จะทำการเหวี่ยงเพื่อกำจัดโปรตีนออกไปแต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนส่วนที่เกาะกับอนุภาคยางออกไปได้ ซึ่งยังทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำยางข้นเพิ่มขึ้นจาก 25 เพอร์เซ็นต์เป็น 50 เพอร์เซ็นต์อีกด้วย (Perrella and Gaspari, 2002) จึงได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteases) เข้าช่วยในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางเนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งในส่วน serum และ rubber phase โดยโปรติเอสที่ได้รับความนิยมนำมาใช้นั้น ยกตัวอย่างเช่น ปาเปน (papain) จากมะละกอ โปรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด (พรรษา และ กฤษณา, 2543) โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR25 รวมทั้งการใช้โปรติเอสที่มีการผลิตในทางการค้าจากบริษัทต่างประเทศ

เช่น บริษัท KaO เป็นต้น (Klinklai et al., 2003; Sakaki et al., 1995 อ้างโดย ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์ , 2540) นอกจากนี้ทุกการทดลองจะพบว่ามีสารเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ร่วมลงไปด้วย ทั้งที่ SDS จัดว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ คาดว่าน่าจะเพื่อเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนด้วย เพราะ SDS มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) (นุชนาฏ และ วราภรณ์, 2539) บางรายงานก็พบว่าเป็นการเติมผงซักฟอกลงไป (พรรษา และ กฤษณา, 2543)

จากการวิจัยของ ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์ (2540) พบว่าหลังจากทำการเติมน้ำยาล้างธรรมชาติด้วย เอนไซม์ alcalase ซึ่งเป็นโปรติเอสชนิดหนึ่งร่วมกับการเติม SDS จากนั้นทำการเหวี่ยงด้วยความเร็ว รอบ 6,000-12,000 rpm 3 ครั้ง จะพบว่าสามารถลดสารประกอบ N (โปรตีน) ในน้ำยาล้างธรรมชาติลง ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Perrella และ Gaspari (2002) รายงานว่า น้ำยาล้างที่บ่มด้วยเอนไซม์ alkaline protease 1-2 วัน แล้วจากนั้นนำมาวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE จะพบว่าโปรตีนที่ปรกติมีอยู่ในน้ำยาล้างจะหายไป ดังแสดงในภาพที่ 1 ทำให้ลดสารก่อภูมิแพ้ในผลิตภัณฑ์ถุงมือยางได้ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าน้ำยาล้างธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์นี้มีความเหมาะสมที่จะใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยางที่สัมผัสกับผิวหนังมนุษย์ได้เป็นอย่างดี เช่นถุงมือทางการแพทย์ และถุงยางอนามัย เป็นต้น ส่วนอีกหนึ่งวิธีที่ช่วยลดปัญหาการแพ้ถุงมือยางได้แต่เป็นเพียงการแก้ที่ปลายเหตุคือ การใช้ผงแป้งเคลือบที่ผิวถุงมือยางก็จะช่วยลดอาการแพ้ของผู้ใช้อันเนื่องมาจากโปรตีนก่อภูมิแพ้และสารเคมีร่วมในการผลิต ทั้งยังป้องกันการติดกันของผิวถุงมือยางด้วย (Truscott, 2002) อย่างไรก็ตาม แม้จะสามารถกำจัดโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ได้แล้วนั้น คุณภาพของน้ำยาล้างการย่อยโปรตีนก็ควรให้ความสำคัญเช่นกัน เพราะคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ยางจะขึ้นกับองค์ประกอบในน้ำยาล้างด้วยดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว แต่ก็มีรายงานรับรองแล้วเช่นกันว่า ถุงมือยางที่ผลิตจากน้ำยาล้างที่ผ่านการย่อยโปรตีนหรือที่เรียกว่า deproteinized natural rubber (DPNR) ยังมีคุณสมบัติสูงกว่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์ยางที่กำหนดไว้ ทั้งในเรื่องของค่าความต้านทานต่อแรงดึงและการฉีกขาด (tensile strength and elongation at break) ความทนต่ออากาศร้อน (heat aging) และการเกิดรูรั่ว (Perrella and Gaspari, 2002)



ภาพที่ 4 โปรตีนที่พบในน้ำยาล้างที่ไม่ถูกย่อยโดยโปรติเอส (ซ้าย) และที่ถูกย่อยโดยโปรติเอส (ขวา) :  
หมายเหตุ-Lane ซ้ายและขวาสุดคือโปรตีนมาตรฐาน (protein marker)  
ที่มา: Perrella and Gaspari, 2002.

ตารางที่ 1 Latex allergens recognized by the International Union of Immunological Societies (IUIS)

IUIS code	ชื่อ	Molecular mass (kDa)	แหล่งที่พบ
Hev b 1	Rubber elongation factor (REF)	14.6, 58	อนุภาคยาง
Hev b 2	Beta-1,3-gluconase	34-36	B-serum
Hev b 3	Small rubber particle protein (SRPP)	22-23	อนุภาคยาง
Hev b 4	Microhelix, cyanogenic glucosidase	50-57	B-serum
Hev b 5	Acidic protein	16	C-serum
Hev b6.01	Prohevein	19-20	B-serum
Hev b 6.02	Hevein	4.7	B-serum
Hev b 6.03	Prohevein C terminus	14	B-serum
Hev b 7.01	Patatin homolog, rubber biosynthesis inhibitor	43-44	C-serum
Hev b 8	Profilin	10.2-15.7	C-serum
Hev b 9	Enolase	48-51	C-serum
Hev b 10	Mn-superoxide dismutase	23-45	B-serum
Hev b 11	Class I Chitinase	31.6	C-serum
Hev b 12	Lipid transfer protein (LTP)	9.3	
Hev b 13	Lipolytic Esterase	42-46	B-serum

ที่มา: Yeang *et al.*, 2002; Yeang, 2004.

ไพโรจน์ (2552) ทำการคัดเลือกเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของโปรติเอส โดยใช้โปรติเอสจากหอยเชอร์รี่ (*Pomacea canaliculata*) ผลมะเดื่อ (*Ficus racemosa* Linn.) น้ำสับปะรด ยางมะละกอ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (MR 10) เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ผงหมักเนื้อ 2 ยี่ห้อ และโปรติเอสบริสุทธิ์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ผลการทดลองพบว่า โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR 10 ซึ่งมีค่า Specific activity 193.07 unit/ mg protein สามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางดิบที่ดีที่สุด และจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบโดยใช้โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR 10 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ การใช้โปรติเอส 6 unit/ น้ำยาง 20 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางดิบได้ดีกว่าโปรติเอสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วยลดการใช้สาร SDS ลงได้ถึง 5 เท่า แต่อย่างไรก็ตามโปรติเอส

ที่ผลิตได้นี้มีอายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้น ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมในการผลิตเตรียมโปรตีนให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานขึ้นและใช้งานได้สะดวกในระดับอุตสาหกรรม

ไพโรจน์ (2553) ได้ทำการศึกษาการผลิตโปรตีนผงจากเชื้อชนิดนี้เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้งานระดับอุตสาหกรรม และสามารถเก็บรักษาโปรตีนได้นานขึ้น ผลการศึกษาพบว่าหลังกระบวนการเตรียมสารละลายเอนไซม์โปรตีนที่บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purified protease) โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (80% Saturation) และการกำจัดไอออนเกลือด้วยวิธีไดอะไลซิส (12 kDa cut off) สามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนได้ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่บริสุทธิ์บางส่วนนี้ไปผ่านกระบวนการทำแห้งซึ่งผลการศึกษาพบว่า การทำแห้งโปรตีนด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด โดยคงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจำเป็นต้องเติมสารสื่อ (Carrier) ลงไปในสารละลายเอนไซม์ด้วยเพื่อลดการเสียดสภาพของเอนไซม์ระหว่างการทำแห้ง และสารสื่อที่เหมาะสมที่สุดคือน้ำตาลแมนนิทอลในปริมาณ 1 % (w/v) โปรตีนผงมีกิจกรรมลดลงเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิตั้งแต่ -20°C ถึง 4°C และในขั้นตอนสุดท้าย ประสิทธิภาพของโปรตีนเอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ถูกทดสอบ ผลการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อที่ผ่านการเติมโปรตีนผงมีค่าต่ำกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่มีการเติมโปรตีนถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลใกล้เคียงกับการใช้โปรตีนผงยี่ห้อ Sigma<sup>TM</sup> นอกจากนี้จากการศึกษาโปรตีนในชั้นซีรัมด้วยวิธี SDS-PAGE ยังพบว่า โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 15, 50 และ 80 kDa ได้หายไปหลังจากที่เติมโปรตีนผงลงไป

ไพโรจน์ (2554) ได้ทำการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF) ด้วยเทคนิค Western blot เปรียบเทียบกับน้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่เตรียมด้วยโปรตีนทางการค้า 3 ชนิด ได้แก่ PROTEX 7L, ACITECH FG และปาเปน ผลการทดลองพบว่า การเติมโปรตีนทุกชนิดทำให้ปริมาณโปรตีนทั้งหมดและโปรตีนที่ละลายได้ในส่วนเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการไม่เติมโปรตีน แต่ทั้งพบว่าโปรตีนจากเชื้อ *B. subtilis* MR10, PROTEX 7L และปาเปน สามารถกำจัดโปรตีน REF ในน้ำยางพาราได้ งานวิจัยนี้สามารถยืนยันได้ว่าน้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยโปรตีนจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 นี้ ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF แม้ว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดของเนื้อเยื่อจะเพิ่มขึ้นก็ตาม

## 2. รูปแบบของกระบวนการหมัก

การหมักสามารถแบ่งได้ตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ โดยสมใจ (2550) ได้แบ่งการหมักออกเป็นทั้งสิ้น 3 รูปแบบ ได้แก่ การหมักแบบกะหรือแบบครั้งคราว (Batch fermentation) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) และการหมักแบบกึ่งครั้งคราว (Fed batch

fermentation) นอกจากรูปแบบการดำเนินการหมักจะแตกต่างกันแล้ว จลนพลศาสตร์ (Kinetics) ของการหมักก็จะแตกต่างกันด้วย ข้อดี-ข้อเสียของกระบวนการหมักแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบข้อดี-ข้อเสียของการหมักแต่ละรูปแบบ

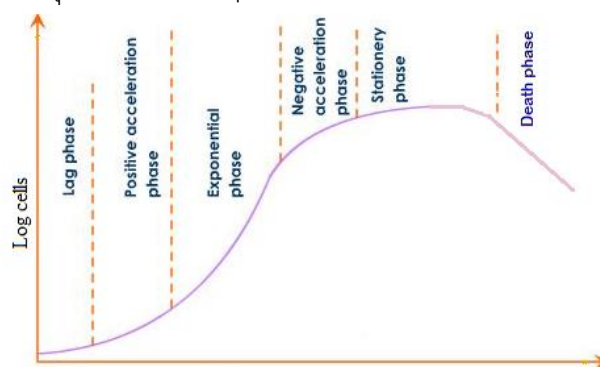
Fermentation mode	Advantages	Disadvantages
Batch fermentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple operation</li> <li>- High product concentration</li> <li>- Reduced risk of contamination</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low productivity</li> <li>- Substrate and/or end product inhibition</li> </ul>
Fed-batch fermentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Overcome substrate inhibition problem</li> <li>- High product concentration</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- End product inhibition</li> </ul>
Repeated fermentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Time-saving processes</li> <li>- Labor-saving</li> <li>- Omission of seed preparation time</li> <li>- High growth rates</li> <li>- Short main culture</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Requirement of special devices (e.g., hollow fiber-module) or special connection lines used for cell concentration</li> </ul>
Continuous fermentation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High productivity</li> <li>- Control growth rates</li> <li>- Less frequency shut down process</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incomplete utilization of the carbon source</li> </ul>

ที่มา: Abdel-Rahman et al., 2013.

## 2.1 การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักระบบปิด ที่มีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด ทำให้จุลินทรีย์มีรูปแบบการเจริญดังแสดงในภาพที่ 5 และเนื่องจากการหมักในระบบปิด ทำให้เกิดการสะสมของของเสียที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายของจุลินทรีย์ได้ (สาโรจน์ และคณะ, 2544) ในช่วงแรกของการหมักเรียกว่าระยะ lag phase จะเป็นระยะที่เชื้อมีการปรับตัว เซลล์จึงยังไม่มีเพิ่มจำนวน ต่อมาเชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว เรียกว่าระยะ log phase (exponential phase) จากนั้นเมื่ออาหารเริ่มหมด เชื้อจะเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งจำนวนเชื้อเริ่มจะคงที่และสุดท้ายจำนวนเชื้อจะลดลงในที่สุด ในระดับอุตสาหกรรมนั้น ต้องการให้ระยะ lag phase สั้นที่สุดเพื่อประหยัดต้นทุนการผลิต ดังนั้น อาจทำได้ด้วยการเพิ่มจำนวนหัวเชื้อให้มากขึ้น (สมใจ, 2550)

การหมักแบบกะนี้ เป็นกระบวนการที่ง่ายและมีการใช้งานในหลายอุตสาหกรรม ยกตัวอย่างเช่น การหมักเอทานอล (Jin et al., 2012) โปรตีนเซลล์เดี่ยว (Rajoka et al., 2006) เอนไซม์เซลลูเลส (Ma et al., 2013) และอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกมากมาย



ภาพที่ 5 แสดงรูปแบบการเจริญของเซลล์เมื่อทำการหมักแบบ batch fermentation

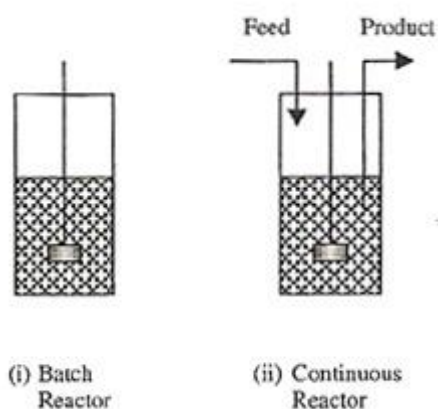
ที่มา: <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-sustainable-growth-and-use/continuous-agave-juice-fermentation-for-producing-bioethanol> (เข้าถึงวันที่ 24 มีนาคม 2557)

## 2.2 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

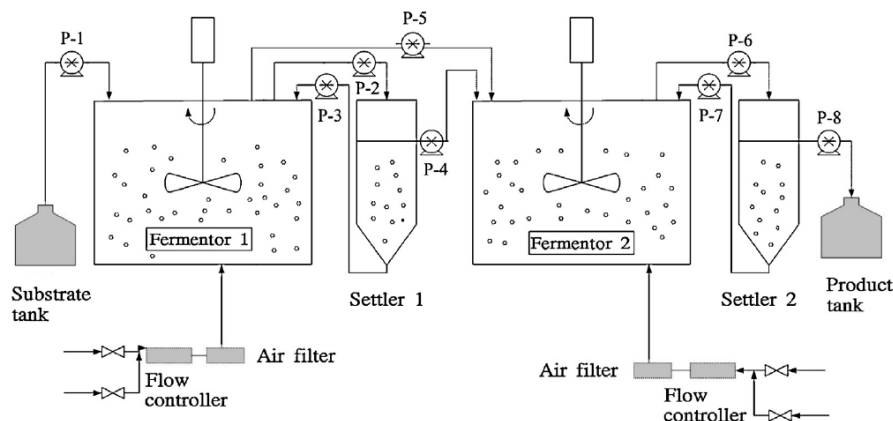
সাโรজনী และคณะ (2540) กล่าวว่า ระยะเวลาการเติบโตแบบ exponential ของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบกะนั้นสามารถดำเนินต่อไปได้อีก หากมีการเติมอาหารเหลวใหม่เข้าสู่ถังหมักอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติมอาหารเหลวใหม่ที่เหมาะสม สถานะคงตัว (Steady state) จะสามารถเกิดขึ้นได้ เมื่อปริมาณของเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่สมดุลกับปริมาณของเซลล์ที่ไหลออกจากถังหมัก ซึ่งจะเรียกรูปแบบการหมักแบบนี้ว่า การเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ดังแสดงรูปแบบดังภาพที่ 3-6 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ภาชนะกับปริมาตรของภาชนะเรียกว่า อัตราการเจือจาง (Dilution rate;  $D$ ) ซึ่งหาได้จากสมการ  $D = F/V$  เมื่อ  $F$  = อัตราการไหล  $V$  = ปริมาตร

สมใจ (2550) รายงานว่า การหมักแบบต่อเนื่องมีข้อดีกว่าแบบกะ ในแง่ของค่าผลผลิตต่อหน่วยเวลา (Productivity) มีความสม่ำเสมอในการดำเนินงาน ควบคุมโดยระบบอัตโนมัติได้ง่ายกว่า สามารถหมักได้เป็นเวลาหลายสัปดาห์ หรือหลายเดือน มีค่า non-productive period หรือช่วงเวลาที่ไม่สร้างผลิตภัณฑ์น้อยกว่ามาก แต่ก็มีข้อเสียคือ มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าการใช้หมักแบบกะ

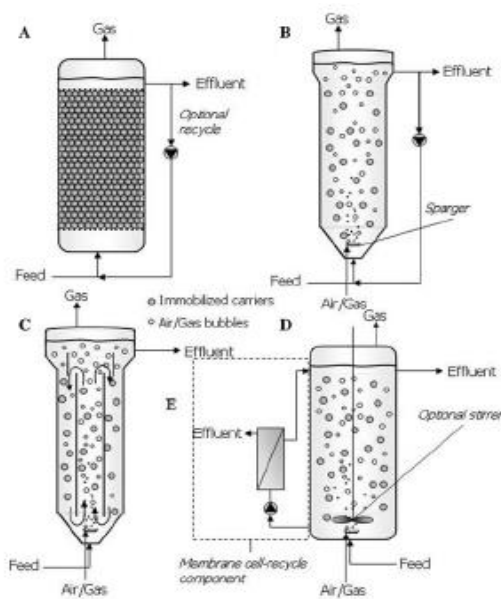
การหมักแบบต่อเนื่องนี้สามารถประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมมากมาย ไม่ว่าจะเป็นการผลิตมวลเซลล์ (สมใจ, 2550) เอทานอล (Wang et al., 2013) เบียร์ (Verbelen et al., 2006) กรดแลกติก (Abdel-Rahman et al., 2013)



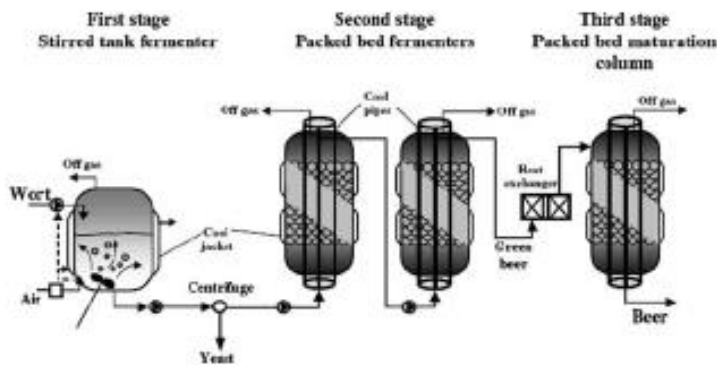
ภาพที่ 6 แสดงรูปแบบการหมักอย่างง่ายของการหมักแบบต่อเนื่องเปรียบเทียบกับหมักแบบกะ ที่มา: <http://www.responsiblebusiness.eu/display/rebwp7/Fermentation+technologies> (เข้าถึงวันที่ 24 มีนาคม 2557)



ภาพที่ 7 แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยการหมักแบบต่อเนื่องระบบสองถัง  
ที่มา: Wang et al., 2013.



ภาพที่ 8 แสดงแผนภาพกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบถังแบบ packed bed  
ที่มา: Verbelen et al., 2006.



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงระบบการหมักเพื่อผลิตเบียร์แบบต่อเนื่องด้วยระบบสามถัง  
ที่มา: Verbelen et al., 2006.

## 2.3 การหมักแบบ Fed batch

ในกรณีที่มีการเติมอาหารใหม่เข้าไปในกระบวนการหมักแบบกะอย่างต่อเนื่อง หรือเติมเป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเดิมออกเลย ซึ่งทำให้ปริมาณอาหารเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เราจะเรียกกระบวนการหมักแบบนี้ว่า Fed batch fermentation (สมใจ, 2550) สารโวจน์ และคณะ (2540) รายงานว่าการหมักแบบนี้เหมาะสำหรับใช้ในสภาพที่มีภาวะยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์จากอาหารที่มีความเข้มข้นสูง โดยการหมักแบบนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีคือ

- การควบคุมแบบย้อนกลับ (Feedback control) เป็นการควบคุมอัตราการเติมสับสเทรตด้วยระบบอัตโนมัติ ซึ่งอาจจะเป็นการควบคุมด้วยการวัดความเข้มข้นของสารอาหารโดยตรง หรือเป็นการควบคุมทางอ้อมโดยอาศัยพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและการใช้สารอาหาร เช่น DO, RQ, pH, pCO<sub>2</sub> เป็นต้น

- การควบคุมแบบธรรมดา (Without feedback control) ซึ่งอาจจะเป็นการเติมสารอาหารเป็นระยะ (Intermittent addition) หรือเป็นการควบคุมการเติมสับสเทรตด้วยอัตราคงที่ (Constant rate) หรือด้วยอัตราแบบ exponential rate เป็นต้น

การหมักแบบ Fed batch มีข้อดีเหนือกว่าการหมักแบบกะ เนื่องจากสามารถควบคุมปริมาณสารอาหารที่เหลือให้มีความเข้มข้นต่ำมากได้ ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญและใช้ออกซิเจนปริมาณไม่มากเกินไปความสามารถในการให้อากาศของถังหมัก ช่วยลด repressive effect ของแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ได้อย่างรวดเร็ว และลดความเป็นพิษของส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงได้ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมมากมาย เช่น การผลิตเซลล์ยีสต์ เพนนิซิลิน และเอนไซม์ เป็นต้น (สมใจ, 2550) ในกระบวนการผลิตเอทานอลจาก corn cob hydrolysate ด้วยกระบวนการ fed batch fermentation ก็ได้ถูกรายงานโดย Chang et al. (2012) ซึ่งทีมวิจัยได้อธิบายว่า การหมักแบบนี้มีข้อดีเหนือกว่าการหมักแบบกะเนื่องจากช่วยลดผลของการยับยั้งโดยสับสเทรตและผลิตภัณฑ์สุดท้ายของเชื้อ ทั้งยังทำให้ productivity และการละลายของออกซิเจนที่สูง

## วัสดุและอุปกรณ์

### 1. เชื้อจุลินทรีย์

*Bacillus subtilis* MR10

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient broth ยี่ห้อ Himedia®
- กากถั่วเหลือง

### 3. น้ำยารักษา

น้ำยารักษาชั้น 60% DRC ชนิด high ammonia

### 4. สารเคมี

	ยี่ห้อ
Casein from bovine milk	FLUKA
Albumin from chicken white egg	SIGMA
Tyrosine	MERCK
$K_2HPO_4$	MERCK
$KH_2PO_4$	SCHARLUA
Trichloroacetic acid ( $CCl_3COOH$ )	MERCK
Sodium carbonate ( $Na_2CO_3$ )	MERCK
Folin-ciocalteau reagent	MERCK
Sodium hydroxide (NaOH)	J.T BAKER
Copper sulphate ( $Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$ )	AJAX
Potassium sodium tartrate tetra hydrate ( $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ )	MERCK
Ammonium sulfate ( $(NH_4)_2SO_4$ )	MERCK
HCl	LAB SCAN

## ยี่ห้อ

Sodium Dodecyl Sulfate	BIO BASIC
Tris	Research Organics
Skim milk	MERCK
Aluminium sulphate octadecahydrate	Loba
Ethanol	Merck
Folin-ciocalteau's phenol	Merck
Glycerol	Carlo Erba
Hydrochloric acid	Carlo Erba
Methanol	Loba
Sodium hydroxide	Merck
Sodium carbonate	Merck
Sodium potassiumtartrate	Fisher
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck
GBX DEV/REPL	Kodax
GBX Fix/REPL	Kodax

## 5. อุปกรณ์

## ยี่ห้อ

เครื่องเขย่าชนิดแบบควบคุมอุณหภูมิได้	RATEK
ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar airflow)	FLUFRANCE
ตู้อบเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator)	MEMERT
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ	HETTICH ZENTRIFUGER
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	SPECTRONIC GENESYS 5
เครื่องกวนสารแบบใช้ความร้อน (Hot plate stirrer)	CLIFTON CERASTIR
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	BINDER
เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	VORTEX GENIC 2
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	MEMMERT
เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)	DURA-DRY $\mu$ P
เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator)	BU CHI

## ยี่ห้อ

Biofermentor 20 ลิตร	NALGENE
ถังหมัก stirred tank bioreactor ขนาด 50 ลิตร	Applicon
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml	PYREX
หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 ml	CORNING
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	PYREX
ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 500 ml, 1000 ml	DURAN
กระบอกตวง (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 ml, 500 ml, 1000 ml	PYREX
หลอดทดลอง (Test tube)	PYREX
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)	AMERSHAM
Amersham ECL Gel 12%	KODAK
X-ray film	

## วิธีการทดลอง

## 1. การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

หัวเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ถูกเตรียมขึ้นในอาหารเหลวสูตร Nutrient broth ปริมาตร 150 หรือ 450 มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการหมักด้วยถังหมักขนาด 20 และ 50 ลิตร ตามลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไปด้วยปริมาณที่น้อยที่สุด

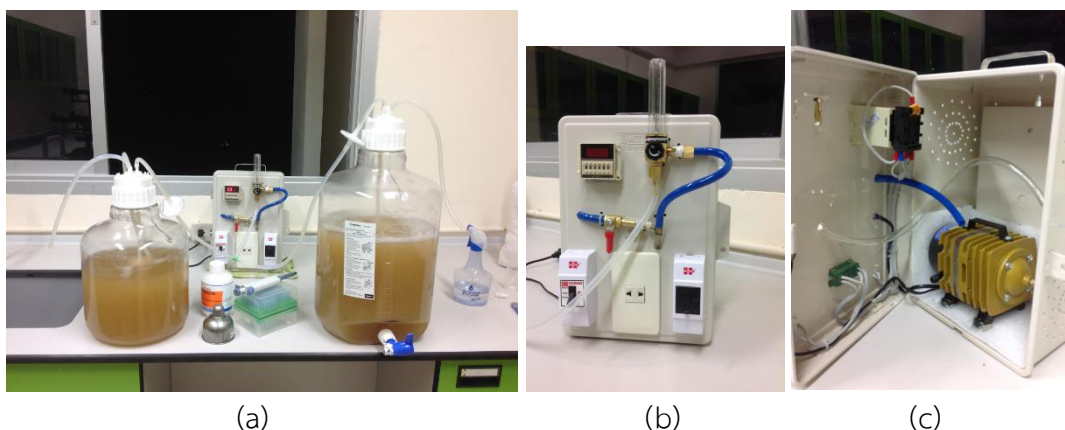
## 2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำปริมาณ 15 ลิตรลงในถังหมักขนาด 20 ลิตร (Nalgene®) ที่มีองค์ประกอบเป็น กากถั่วเหลือง (100 กรัม/ลิตร)  $K_2HPO_4$  (0.7 กรัม/ลิตร)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.7 กรัม/ลิตร) กลูโคส (1.1 กรัม/ลิตร)  $(NH_4)_2SO_4$  (0.275 กรัม/ลิตร) และ  $NH_4Cl$  (0.275 กรัม/ลิตร) ปรับ pH เริ่มต้นที่ 6.0 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงไป ในประกอบถังหมักเข้ากับอุปกรณ์จ่ายอากาศ ที่มีชุดแผ่นกรองอากาศขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และไบกวน ดังภาพที่ 10

ดำเนินการหมักเพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่ออัตราการเจริญและอัตราการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย ดังนี้

- อุณหภูมิ: ทดสอบการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส
- อัตราการให้อากาศ: ทดสอบการเพาะเลี้ยงเมื่อให้อากาศ 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 kg/cm<sup>2</sup>
- อัตราการกวน: ทดสอบการเพาะเลี้ยงเมื่อมีการกวนอาหารในอัตราเร็ว 50 100 และ 150 rpm

เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อทำการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค spread plate โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Nutrient agar และทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Wongputtisin et al. (2012) จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย ( $\mu$ ) ผลได้ ( $Y_{p/x}$ ) และ Productivity ของเอนไซม์โปรติเอส และคัดเลือกระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่อไป



ภาพที่ 10 (a) แสดงลักษณะถังหมักขนาด 10 ลิตร (ซ้าย) 20 ลิตร (ขวา) ที่ผลิตจากวัสดุ polypropylene ส่วน (b) (c) แสดงลักษณะของปั๊มอากาศ

### 3. การศึกษารูปแบบการหมักที่เหมาะสม

ดำเนินการหมัก 3 รูปแบบ ได้แก่ การหมักแบบกะ (Batch fermentation) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) และการหมักแบบ Fed-batch fermentation ในถังหมักขนาด 20 ลิตร (ปริมาณอาหารเหลวต้นทุนต่ำ 15 ลิตร) โดยใช้สภาวะการหมัก (อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวน) จากการศึกษาในหัวข้อก่อนหน้านี้ ในกรณีการหมักแบบ fed-batch ได้เลือกศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเติมอาหารที่ระดับ 500 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร/12 ชั่วโมง ส่วนการหมักแบบต่อเนื่อง ทำการศึกษาที่อัตราการจ่ายอาหารเข้า-ออกที่ระดับ 1.5 มิลลิลิตร/นาที ซึ่ง

ระหว่างดำเนินการหมัก ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ (Kinetics) ของการหมัก โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 หรือ 12 ชั่วโมงขึ้นกับรูปแบบการหมัก เพื่อวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค spread plate โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Nutrient agar และทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Wongputtisin et al. (2012) จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย ( $\mu$ ) ผลได้ ( $Y_{p/x}$ ) และ Productivity ของเอนไซม์โปรติเอส เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแล้วคัดเลือกรูปแบบการหมักที่ให้ค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ดีที่สุด

#### 4. การทดสอบขยายการผลิตในถังหมักขนาด 50 ลิตร

ทำการทดสอบการหมักในถังหมักสแตนเลสชนิด STR (stirred tank reactor) ขนาด 50 ลิตร (ปริมาตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำ 30 ลิตร) ยี่ห้อ Applikon® รุ่น NAT'L BD 828 ต่อกับระบบควบคุม BIOCONTROLLER ADI1030 (Applikon®) และอุปกรณ์ตรวจวัดอุณหภูมิและค่า pH นอกจากนี้ยังมีระบบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ TREVIL® ภายหลังการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ทำการเติมหัวเชื้อเชื้อปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ที่เตรียมในอาหารเหลว Nutrient broth ควบคุมอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนที่ระดับจากการศึกษาในการทดลองก่อนหน้านี้ และทำการหมักในรูปแบบกะ ดำเนินการหมักและทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ (Kinetics) ของการหมัก โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารวุ้นสูตร Nutrient agar และทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Wongputtisin et al. (2012) จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย ( $\mu$ ) ผลได้ ( $Y_{p/x}$ ) และ Productivity ของเอนไซม์โปรติเอส

#### 5. การทดสอบกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางข้น

ผสมน้ำยางข้นชนิด High ammonia, 60% DRC กับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากงานวิจัยครั้งนี้ ในอัตราส่วน 200-300 ยูนิต/น้ำยาง 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 30 นาที เก็บของเหลวส่วนซีรัมไว้สำหรับทดสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor (REF, HEV b1) ด้วยเทคนิค Dot blot รายละเอียดจะได้กล่าวถึงต่อไป

#### 6. การทดสอบผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยน้ำยางที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ทำการทดสอบผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ภายใต้สภาวะและสูตรการผลิตของโรงงานผลิตถุงมือยางพาราซึ่งมีสูตรโดยทั่วไปดังแสดงดังต่อไปนี้

องค์ประกอบ	phr
Latex	100
Stabilizer	1.2
Sulphur	1.0
Accelerator	1.2
Activator	0.5
Antioxidant	1.5
Pigment	0.4

\*หมายเหตุ: ชื่อบริษัทและรายละเอียดสารเคมีในแต่ละองค์ประกอบไม่ได้รับอนุญาตให้เปิดเผยและเผยแพร่

ขั้นตอนโดยย่อของการผลิตถุงมือยางในครั้งนี้นี้คือ บ่มน้ำยางชั้นชนิด high ammonia (กวนทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง) ที่มี DRC ประมาณ 60% ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในอัตราส่วน 200-300 ยูนิต/น้ำยาง 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ผสมส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำยาง ปรับให้ได้ค่า %TSC อยู่ที่ประมาณ 30% บ่มน้ำยางร่วมกับสารเคมีตามสูตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (มีการกวนตลอดเวลา) ในส่วนของแม่พิมพ์ (Former) นั้น ทำการล้างให้สะอาดแล้วอบให้แห้งและให้ได้อุณหภูมิพื้นผิวประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วจุ่มสารเร่งการจับตัวในกลุ่ม Ca-nitrate ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนแห้ง ก็จะพร้อมสำหรับการนำไปจุ่มน้ำยาง โดยจุ่มเป็นเวลา 15 วินาที ทิ้งไว้ให้แห้งสักเล็กน้อย แล้วแช่ในอ่างน้ำอุ่นประมาณ 40 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยการอบที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงนำมาแช่ในสารละลายคลอรีนและกรด สุดท้ายล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาดและอบให้แห้ง ก็จะได้ถุงมือยางทางการแพทย์ตามกระบวนการของโรงงาน

ทั้งนี้ ได้ทำการผลิตถุงมือทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย สูตรที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า และสูตรที่ไม่บ่มกับเอนไซม์ (สูตรทั่วไปของโรงงาน) ถุงมือที่ผลิตได้ครั้งนี้ จะถูกนำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับสมบัติทางกายภาพตามมาตรฐาน ISO ได้แก่ ความหนา ความเค้นดึงเมื่อมีการยืดร้อยละ 300 ความเค้นดึงเมื่อมีการยืดร้อยละ 500 แรงดึงเมื่อขาด การต้านแรงดึงจนขาด และความยืดเมื่อขาด และ ASTM D3578-05 (standard specification for examination gloves) ได้แก่ ค่าความหนา ค่า tensile (ก่อน-หลังบ่มเร่ง) และค่าความยืดเมื่อขาด (ก่อน-หลังบ่มเร่ง) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ STATISTIX<sup>®</sup> นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor ด้วย

## 7. การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation rubber ด้วยเทคนิค dot blot

### (1) การเตรียมตัวอย่างซีรัมบน PVDF membrane

ทำการแช่ PVDF membrane ในเมทานอลเป็นเวลา 5 นาที และนำไปแช่ใน Transfer buffer อย่างน้อย 15 นาที หลังจากนั้นทำการหยดตัวอย่างซีรัม 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น membrane และรอจนกระทั่งแห้ง

### (2) การบ่มซีรัมร่วมกับแอนติบอดี

นำ PVDF จากข้อ (1) มาล้างด้วย TSB buffer นาน 10 นาที 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10-15 ml บ่มต่อด้วย non-fat milk ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่น PVDF ไปบ่มร่วมกับ Anti-REF monoclonal antibody (อัตราการใช้เจือจาง 1: 10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้ล้าง PVDF ด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 15 นาที และล้างด้วย TSB buffer อีก 1 ครั้ง ต่อไปให้นำแผ่น PVDF ดังกล่าวมาบ่มร่วมกับ Goat anti-mouse IgG HRP (อัตราการใช้เจือจาง 1:10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น PVDF เช่นเดิมด้วย TBST และ TSB buffer

### (3) การตรวจสอบผล

นำแผ่น PVDF นี้ไปทำปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจสอบชนิด chemiluminescent detection kit (Pierce, super signal Chemiluminescence) 5 นาที จากนั้นเตรียมสารเคมีสำหรับล้างฟิล์มโดยผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Fixer ในอัตราส่วน 4:1 และผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Developer ในอัตราส่วน 4:1 เช่นเดียวกัน นำแผ่น PVDF มาประกบลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray ในที่มืดเป็นเวลา 5-60 นาที หรือข้ามคืน ขึ้นกับกรณีแล้วล้างฟิล์มโดยแช่แผ่นฟิล์มในสารละลาย Fixer เป็นเวลา 30 วินาที และแช่ในสารละลาย Developer เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว ผึ่งแผ่นฟิล์มให้แห้ง แล้วสังเกตแถบสีดำที่เกิดขึ้น

## 8. การวิเคราะห์ข้อมูลต้นทุนการผลิต

จะได้ทำการวิเคราะห์ถึงต้นทุนการผลิตทั้งกระบวนการที่พัฒนาขึ้นนี้เทียบกับกระบวนการเดิม ทั้งนี้จะได้ใช้ข้อมูลผลการศึกษางานวิจัย RDG5650081 ร่วมด้วย ทั้งนี้ประเด็นที่ต้องศึกษาคือ ต้นทุนการผลิตต่อหน่วยของเอนไซม์ และผลกระทบที่มีต่อต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์จากยางพาราบางชนิด

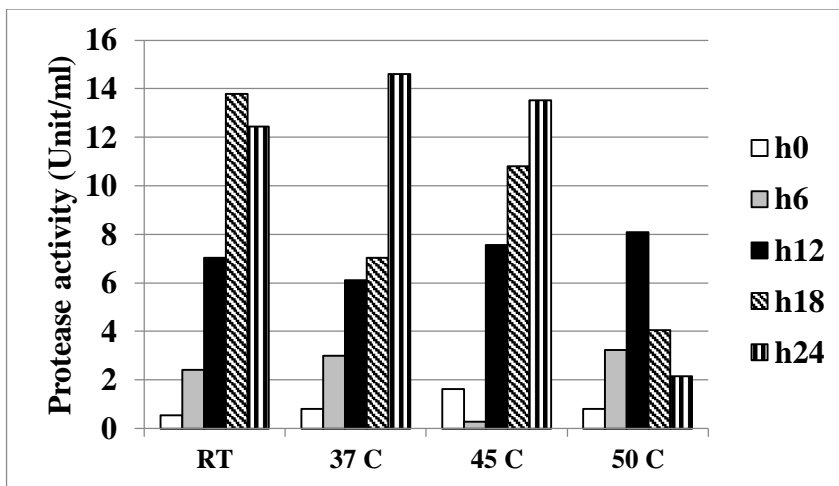
## 9. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

## ผลการทดลองและวิจารณ์

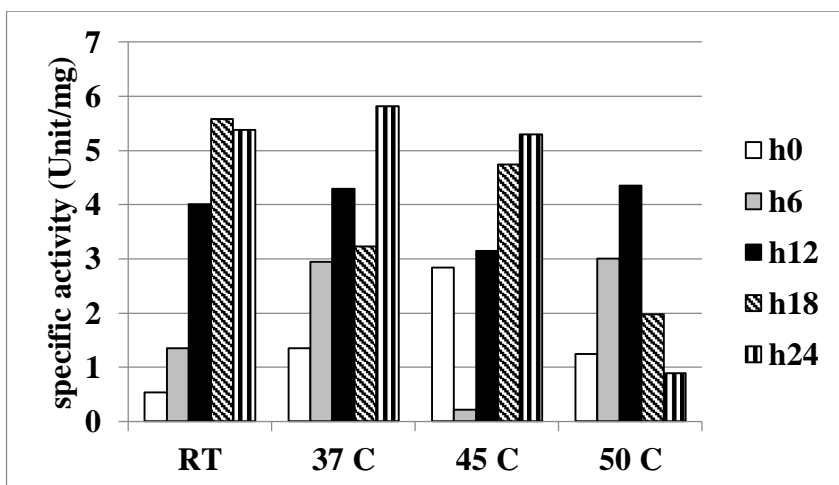
### 1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร

#### (1) ผลของอุณหภูมิ

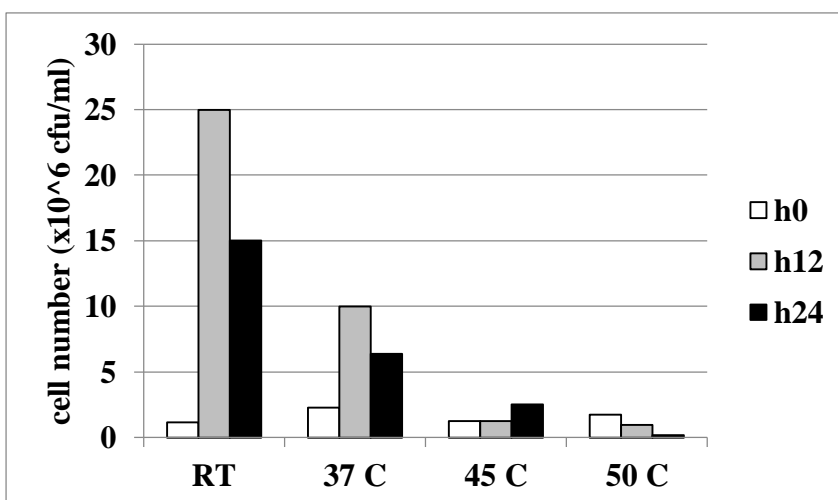
ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบหมักที่อุณหภูมิ 4 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 24 เพื่อวัดการเจริญของเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ และพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11-16 พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสค่อนข้างใกล้เคียงกันในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 37 และ 45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 11) สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Gouda (2006) Abusham et al. (2009) และ Chantawannakul et al. (2002) ที่พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ที่คัดเลือกสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 37 และ 42 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า Productivity ซึ่งหมายถึงการผลิตเอนไซม์ต่อหนึ่งหน่วยเวลา ก็จะเห็นว่าเอนไซม์ถูกผลิตมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องชั่วโมงที่ 18 (ภาพที่ 14) สอดคล้องกับการเจริญของเชื้อที่พบว่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 13 และ 15) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนั้น จะสังเกตได้ว่าพบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื่อน้อยมาก ซึ่งถึงแม้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การผลิตผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเซลล์ที่เจริญ (Product yield coefficient,  $Y_{p/x}$ ) แล้วได้ค่าค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอสสุทธิที่ผลิตขึ้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมินี้จึงไม่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตและการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียสแล้ว ก็จะพบว่าสูงค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว การให้ความร้อนเพื่อควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ถือเป็นอีกหนึ่งต้นทุนของการผลิต ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ในการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ภายในถังหมักที่มีการเจริญของจุลินทรีย์อยู่นั้น ความร้อนที่ได้รับนอกจากจะมาจากระบบให้ความร้อนแล้ว ยังสามารถมาได้จากความร้อนจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic heat) ของเซลล์ได้อีกด้วย หากกระบวนการระบายความร้อนทำได้ไม่ดีแล้ว จะกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Abusham et al., 2009) และที่สำคัญที่สุดคือความร้อนที่สูงเกินไปจะทำให้โครงสร้างเอนไซม์เสียสภาพได้ (denaturation)



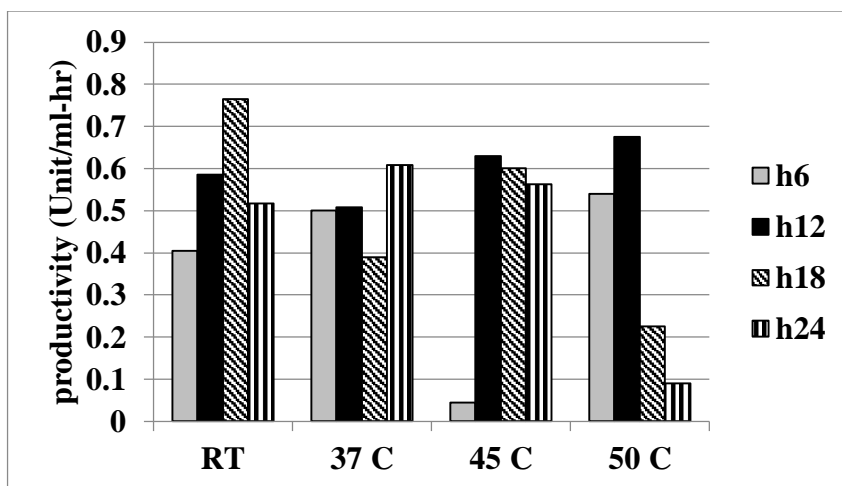
ภาพที่ 11 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ



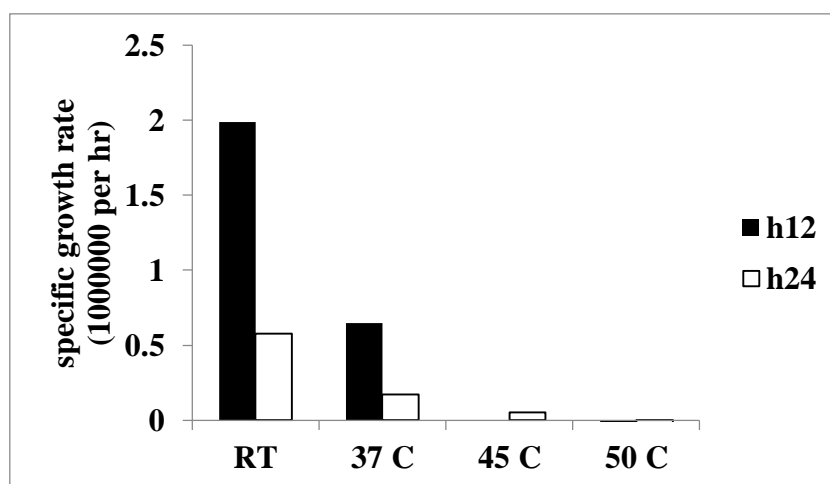
ภาพที่ 12 ค่า Specificity activity ของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ



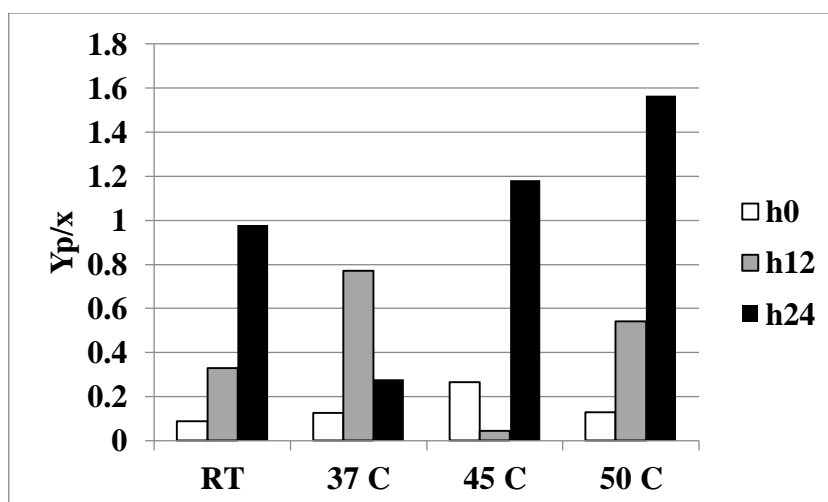
ภาพที่ 13 การเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 14 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยเวลา (Productivity) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 15 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

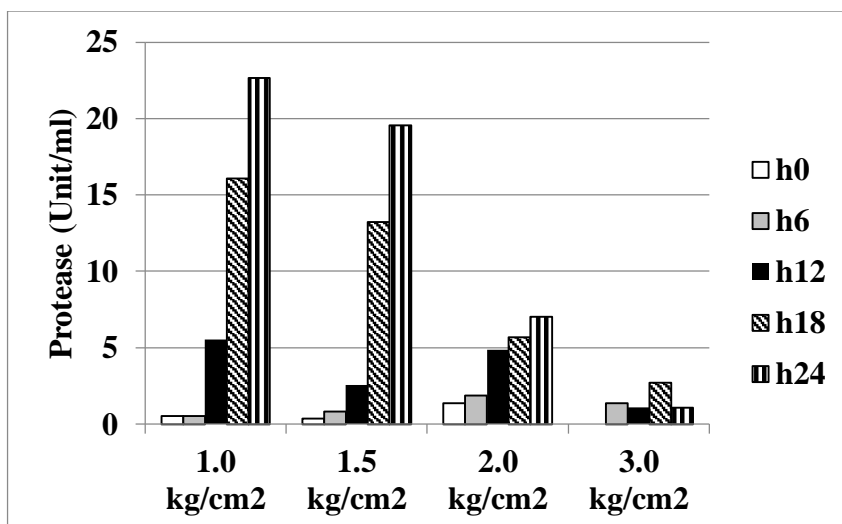


ภาพที่ 16 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยมวลเซลล์เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

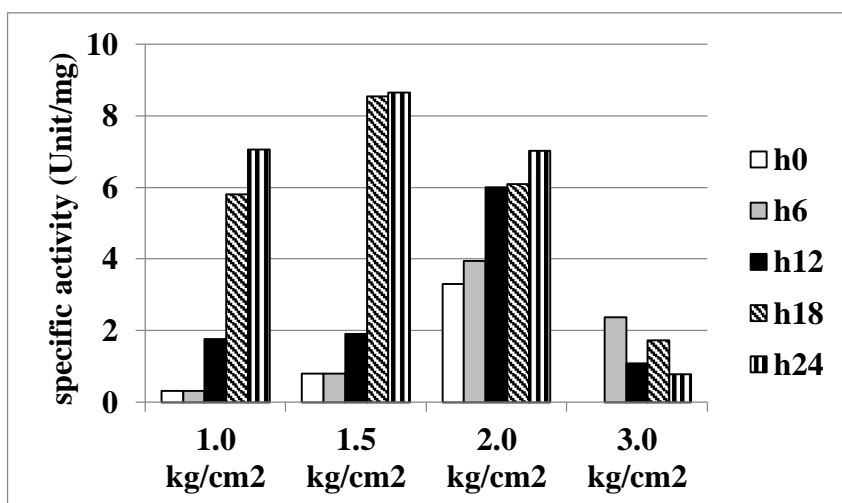
## (2) ผลของอัตราการให้อากาศ

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ในอาหารเหลวจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม ( $1-3 \text{ kg/cm}^2$ ) โดยควบคุมอัตราการกวนอยู่ที่  $100 \text{ rpm}$  แล้วเปรียบเทียบผลผลิตและการเจริญของเชื้อ ก็พบว่าเชื้อผลิตโปรตีนและให้ค่า Productivity ได้สูงเมื่อให้อากาศที่ระดับ  $1$  และ  $1.5 \text{ kg/cm}^2$  (ภาพที่ 17 และ 20) แต่ที่  $1 \text{ kg/cm}^2$  มีค่าสูงกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตแล้ว กลับพบว่าการให้อากาศที่ระดับ  $2$  และ  $3 \text{ kg/cm}^2$  มีค่าสูงกว่าการให้อากาศที่ระดับต่ำ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตเอนไซม์โปรตีนเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ไม่ใช่ชีวมวล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศที่ระดับ  $1 \text{ kg/cm}^2$  สำหรับการทดลองต่อไป

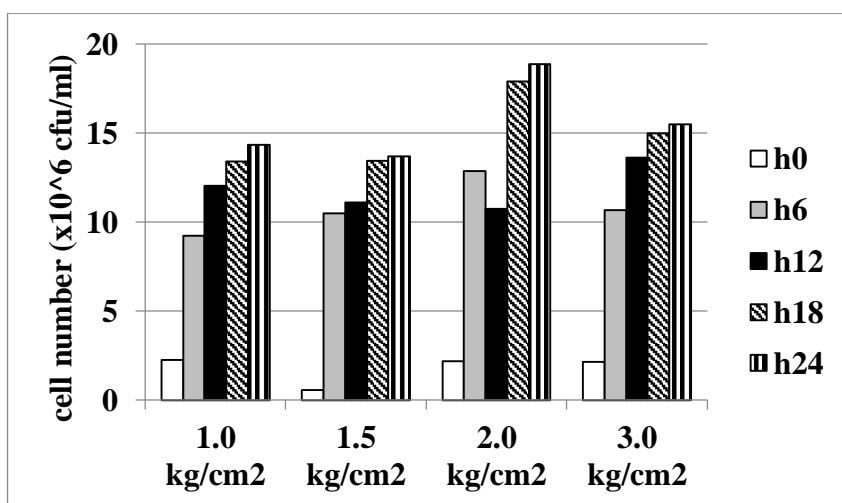
ในระบบการหมักที่ออกแบบครั้งนี้ มีการให้อากาศผ่านทางปั๊มลมที่จ่ายอากาศเข้าสู่ถังหมักผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด  $0.45 \text{ ไมครอน}$  จากนั้นอากาศจะแตกตัวเป็นฟองละเอียดด้วยหัวทรายภายในถังหมัก เพื่อให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากขึ้น ทั้งนี้อัตราการให้อากาศที่เพิ่มขึ้น ควรทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารเหลวเพิ่มขึ้นและเชื้อสามารถเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์สูงขึ้นตามไปด้วย แต่ผลการทดลองครั้งนี้กลับพบว่าที่อัตราการให้อากาศระดับ  $2 \text{ kg/cm}^2$  เป็นต้น เชื้อผลิตเอนไซม์โปรตีนได้ลดลง เหตุการณ์นี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Abusham et al. (2009) ที่เพิ่มอัตราการให้อากาศด้วยการเขย่า แล้วพบว่าเชื้อ *B. subtilis* มีการผลิตเอนไซม์โปรตีนลดลง ทั้งนี้ได้มีการอธิบายเหตุผล โดยอ้างอิงจาก Roychoudhury et al. (1988) ที่ระบุว่าอัตราการให้อากาศที่สูงเกินไปอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง



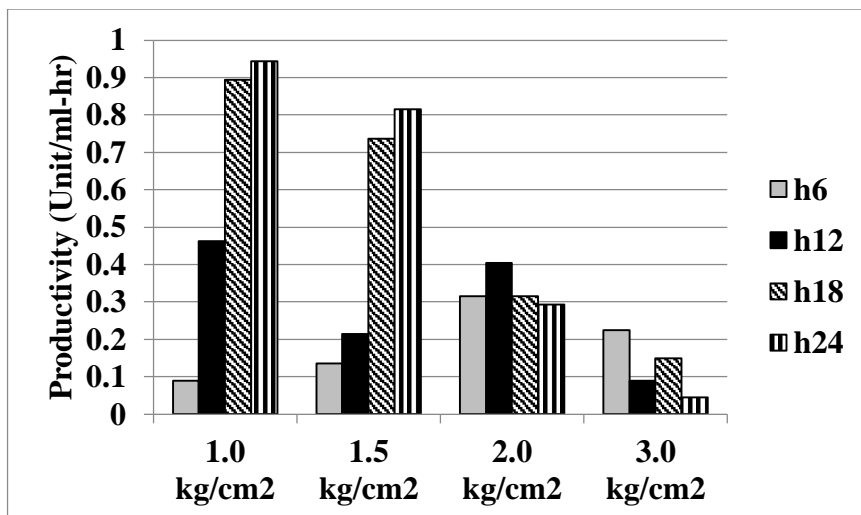
ภาพที่ 17 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงโดยให้อากาศที่ระดับต่างๆ



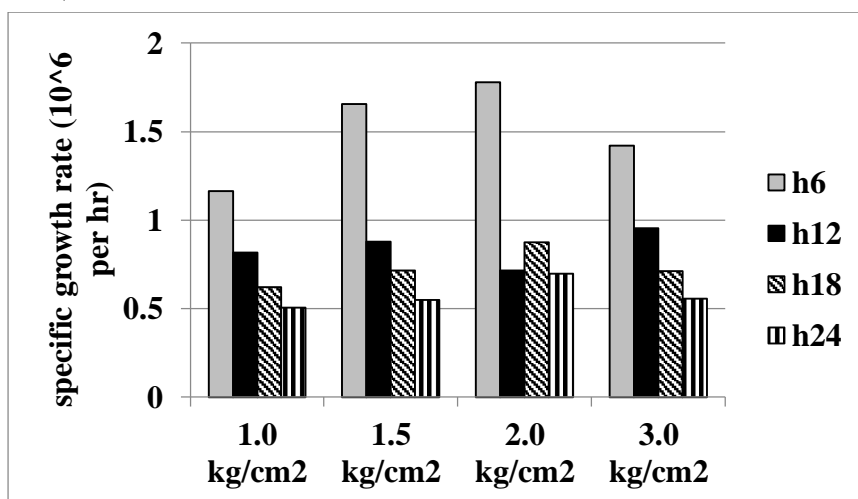
ภาพที่ 18 ค่า Specificity activity ของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงโดยให้อากาศระดับต่างๆ



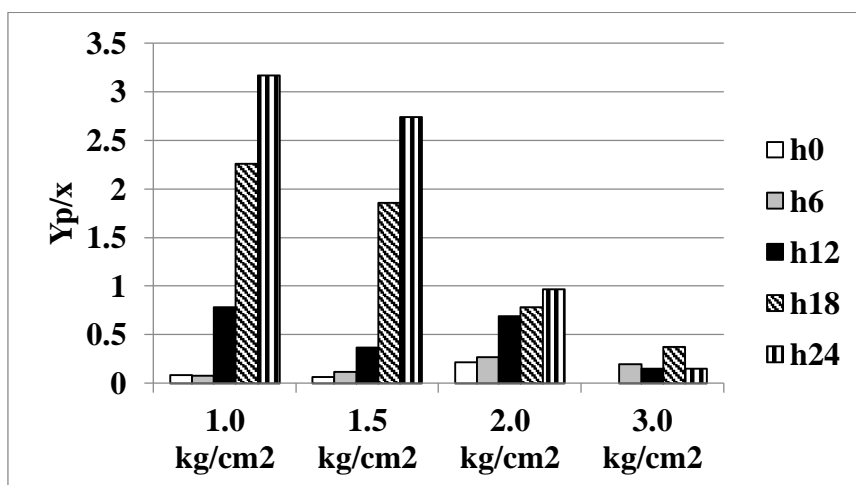
ภาพที่ 19 การเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงโดยให้อากาศระดับต่างๆ



ภาพที่ 20 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยเวลา (Productivity) เมื่อให้อากาศที่ระดับต่างๆ



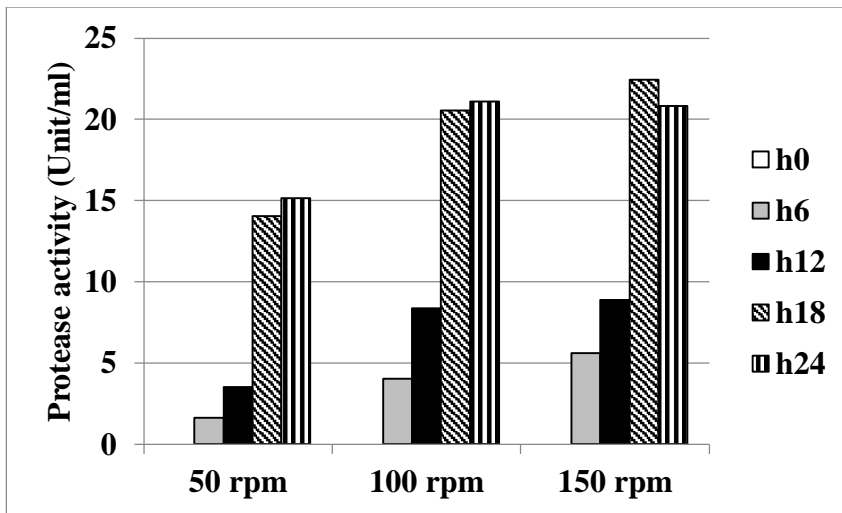
ภาพที่ 21 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงโดยให้อากาศระดับต่างๆ



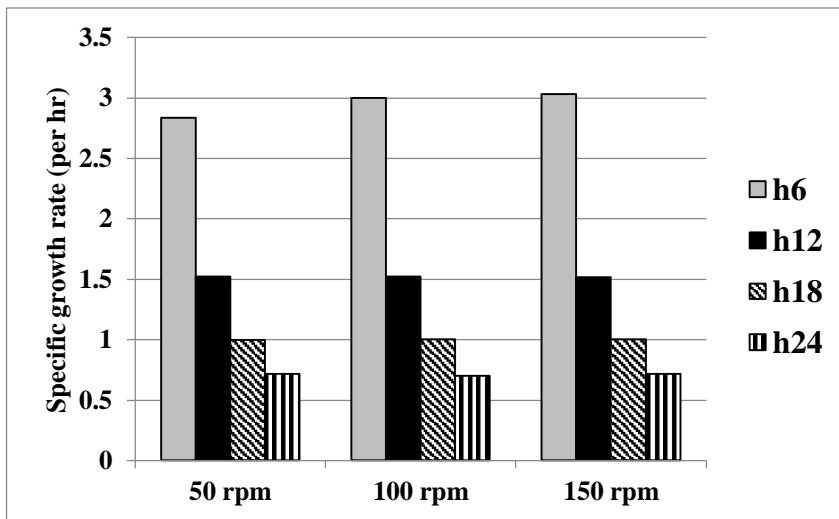
ภาพที่ 22 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยมวลเซลล์เมื่อเลี้ยงโดยให้อากาศระดับต่างๆ

### (3) ผลของอัตราการกวน

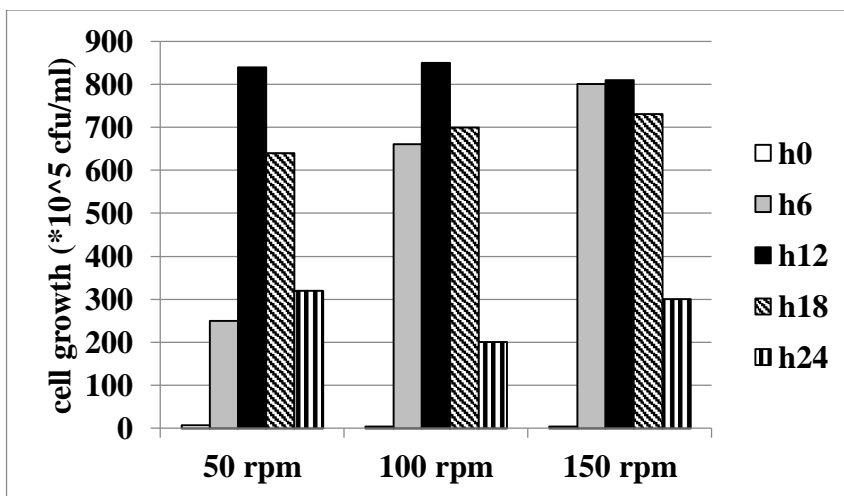
ในระบบถังหมักที่ออกแบบนี้ นอกจากมีการให้อากาศด้วยปั๊มลมแล้ว ยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพการละลายของออกซิเจนในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อโดยการกวนด้วยใบกวน (impeller) อีกทั้งการกวนยังช่วยป้องกันการนอนก้นของกากถั่วเหลืองที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาอัตราการกวน 3 ระดับตั้งแต่ 50-150 rpm โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้อากาศที่ระดับ  $1.5 \text{ kg/cm}^2$  ผลการทดลองพบว่าอัตราการกวนที่สูงขึ้น มีแนวโน้มให้ผลิตเอนไซม์โปรติเอส การเจริญของเซลล์ และค่า productivity สูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 23-28 โดยที่อัตราการกวน 100 และ 150 rpm ให้ผลใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าการให้อากาศและการกวนในระดับที่สูงทำให้เกิดฟองขึ้นในถังหมักที่เลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวต้นทุนต่ำซึ่งมีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลัก แต่เกิดฟองเล็กน้อยในถังหมักที่ใช้อาหารเหลว nutrient broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในระหว่างการหมักจำเป็นต้องเติมสารลดการเกิดฟอง (antifoam) เป็นระยะ ซึ่งฟองที่เกิดขึ้นนี้จะก่อผลเสียแก่การหมัก โดยทำให้อัตราการถ่ายเทแก๊สลดลง โอกาสปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกเพิ่มสูงขึ้น และยังทำให้เกิดการชะเอาเชื้อแบคทีเรียในถังหมักออกไปด้วย ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เลือกอัตราการกวนที่ระดับ 150 rpm แม้จะพบว่าเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและค่า productivity เพียงเล็กน้อย แต่สามารถช่วยเพิ่มการผสมและลดการนอนก้นของกากถั่วเหลืองในถังหมักได้ดีกว่า



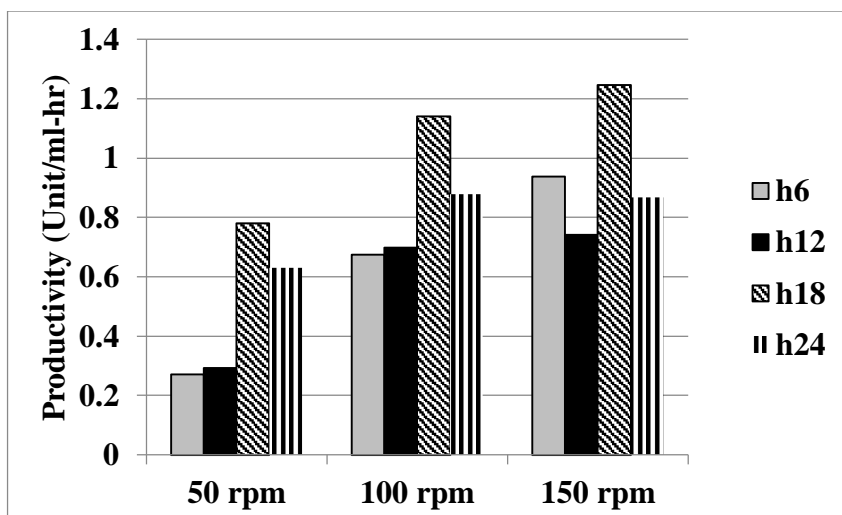
ภาพที่ 23 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงโดยมีการกวนที่ระดับต่างๆ



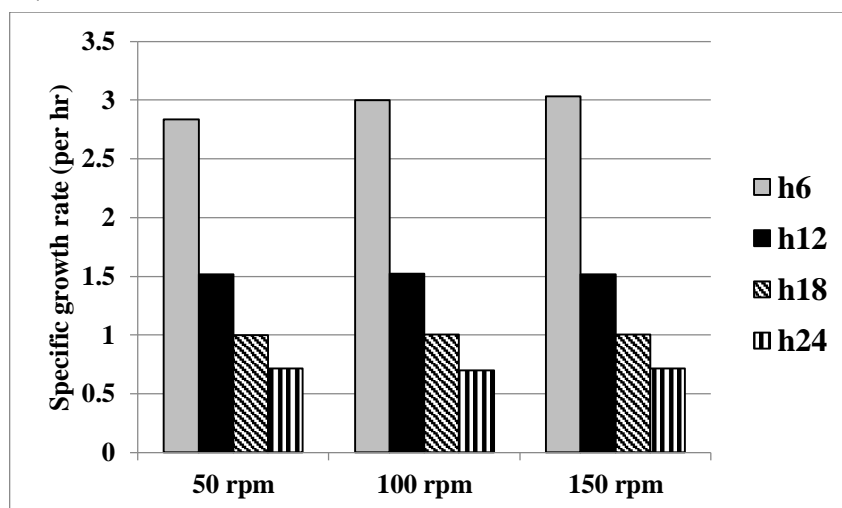
ภาพที่ 24 ค่า Specificity activity ของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงโดยมีการกวนระดับต่างๆ



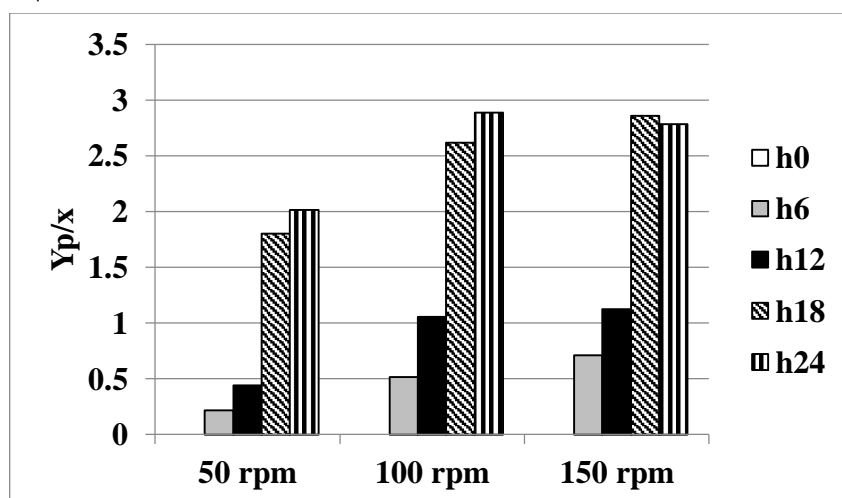
ภาพที่ 25 การเจริญของแบคทีเรีย *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงโดยมีการกวนระดับต่างๆ



ภาพที่ 26 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยเวลา (Productivity) เมื่อมีการกวนระดับต่างๆ



ภาพที่ 27 อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยเวลาเมื่อเพาะเลี้ยงโดยมีการกวนระดับต่างๆ



ภาพที่ 28 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* ต่อหน่วยมวลเซลล์เมื่อเลี้ยงโดยมีการกวนระดับต่างๆ

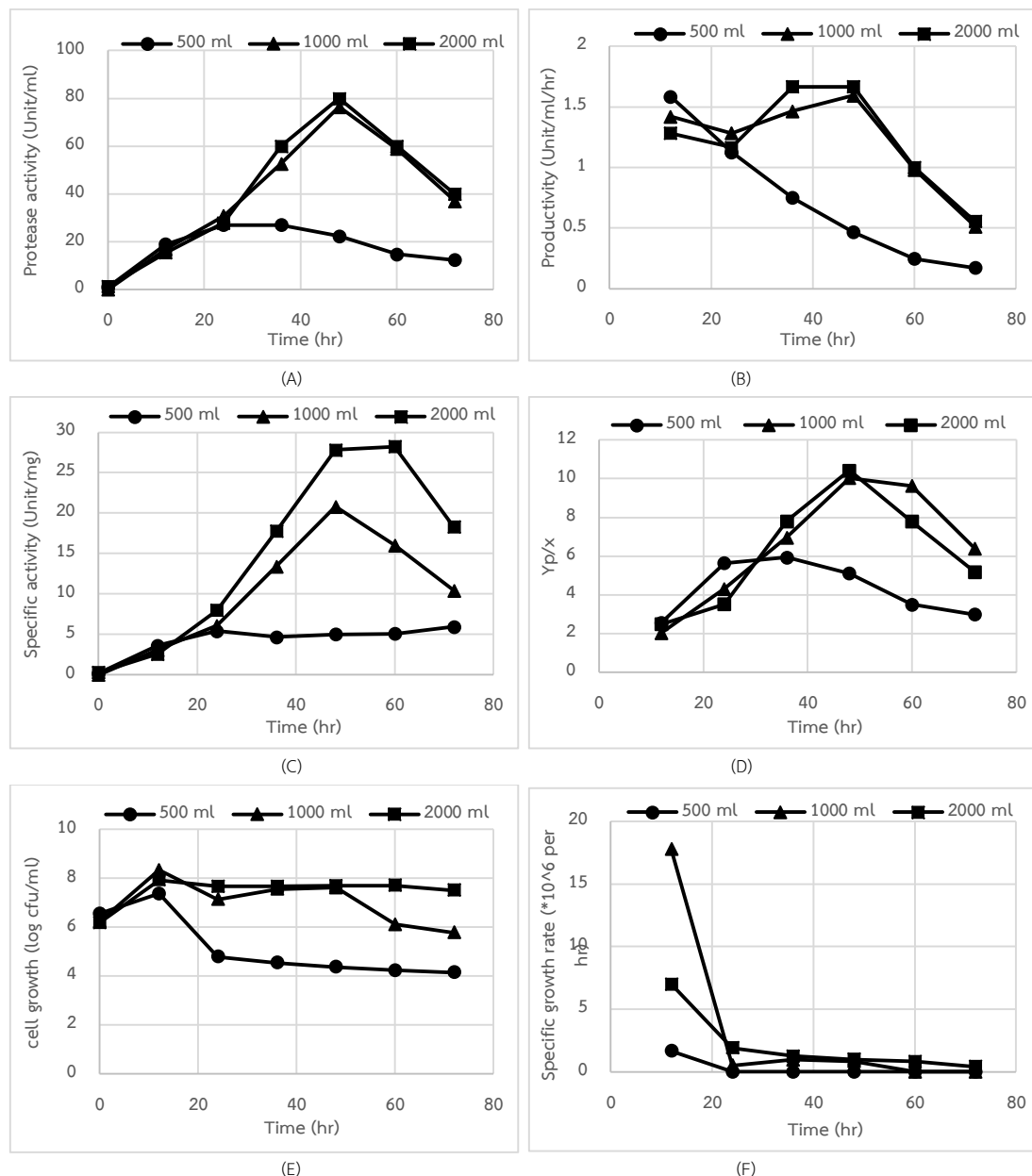
## 2. การศึกษารูปแบบการหมักที่เหมาะสม

ภายหลังทำการศึกษาหาสภาวะการหมักที่เหมาะสมเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ซึ่งพบว่าอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนที่เหมาะสมได้แก่ 28-30 องศาเซลเซียส 1 kg/cm<sup>2</sup> และ 150 rpm ตามลำดับ สภาวะดังกล่าวนี้ถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบกึ่งกะและแบบต่อเนื่อง แต่เบื้องต้นพบปัญหาและข้อจำกัดในการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบถังหมักที่ออกแบบนี้ ที่ต้องมีการนำอาหารเข้า-ออกจากถังหมักตลอดเวลาโดยใช้ปั๊มไม่สามารถทำได้เนื่องจากอุณหภูมิของกากถั่วเหลืองที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเหลวต้นทุนต่ำทำให้เกิดอุดตันในท่อส่งอาหาร อีกทั้งเมื่อทำการหมักเป็นเวลานาน กากถั่วเหลืองเกิดการบวมพอง (swelling) ก็ยังทำให้ปัญหาการอุดตันเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงยังคงเหลือเพียงการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะ

ในการหมักแบบกึ่งกะซึ่งจะมีการถ่ายอาหารเก่าออกจากถังหมักและเติมอาหารใหม่เข้าไปซึ่งจะเริ่มทำหลังชั่วโมงที่ 24 และทำทุก 12 ชั่วโมง ในอัตราที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 500 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตรต่อครั้ง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 26 จะเห็นได้ว่าภายหลังการถ่ายอาหารเก่าและเติมอาหารใหม่ลงไป ปริมาณ 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตรแล้ว เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นมาได้อีก ในขณะที่การถ่ายอาหารในอัตรา 500 มิลลิลิตรนั้น แม้เชื้อจะไม่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงขึ้นอย่างชัดเจน แต่ก็พบว่าเอนไซม์ยังคงพบได้ในปริมาณที่ค่อนข้างคงที่เป็นเวลานานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามหลังจากชั่วโมงที่ 48 ก็พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดต่ำในทุกการทดลอง ค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการทดลองถ่ายอาหาร 500 มิลลิลิตรลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ในขณะที่อีกสองชุดการทดลองนั้น มีค่า productivity ที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน อีกทั้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและคงที่จนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้ ทั้งนี้ การถ่ายอาหารเก่าออกจากถังหมักนั้นนอกจากจะถือเป็นการเก็บผลิตภัณฑ์ ยังสามารถช่วยลดการสะสมของของเสียจากระบบการเมแทบอลิซึมที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Moon and Parulekar, 1990; Tabandeh et al., 2011) ส่วนการเติมอาหารใหม่ลงไป ก็เป็นกระตุ้นให้เชื้อสามารถเจริญมากขึ้นได้อีกจากสารอาหารใหม่ที่เติมลงไป ดังนั้นเราจึงเราสามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเติมและถ่ายอาหารต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม หากสูงเกินไปเชื้อก็จะเจริญเติบโตไม่ทัน ก็อาจจะถูกชะออกจากถังหมักไปได้ ทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์ลดลง อีกหนึ่งประเด็นที่ต้องให้ความสำคัญในการหมักแบบนี้คือปัญหาการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์จากภายนอกในระหว่างกระบวนการถ่ายอาหารเข้า-ออก จากผลการทดลองในครั้งนี้ แม้อัตราการถ่ายอาหารเก่าออกจากถังหมักและการเติมอาหารใหม่เข้าไปในอัตรา 2,000 มิลลิลิตรจะให้ประสิทธิภาพการผลิตโปรติเอสสูงกว่าอัตรา 1,000 มิลลิลิตร แต่ผู้วิจัยเห็นว่าควรเลือกอัตรา 1,000 มิลลิลิตรในทุกๆ 12 ชั่วโมง เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่ออาหารถูกเติมเพิ่มขึ้น 2 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตโปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตรในครั้งนี้ ระหว่างการหมักรูปแบบกะและกึ่งกะแล้ว ก็พบว่าประสิทธิภาพที่แตกต่างกันดังสรุปในตารางที่ 3 การหมัก

แบบกะให้ผลผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 ส่วนการแบบกึ่งกะให้ผลผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 (เติมอาหารใหม่ 2 ครั้ง) จะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและ product yield coefficient ที่ผลิตได้จากการหมักแบบกะต่ำกว่าการหมักแบบกึ่งกะอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แต่ค่า productivity ระหว่างการหมักแบบกะและกึ่งกะในชั่วโมงที่ 24 แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 29 เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์การหมักแบบกึ่งกะ เมื่อใช้อัตราการถ่ายอาหารเข้า-ออกในระดับที่แตกต่างกัน โดย (A) คือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity)

(B) คือค่า Productivity

(C) คือค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)

(D) คือค่า Product yield coefficient ( $Y_{p/x}$ )

(E) คือค่าจำนวนเซลล์ในหน่วย log cfu/ml

(F) คือค่าการเจริญจำเพาะของเซลล์ (specific growth rate)

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ของการหมักแบบกะและกึ่งกะในถังหมักขนาด 20 ลิตร

พารามิเตอร์	การหมักแบบกะ (18 hr)	การหมักแบบกึ่งกะ	
		24 hr	48 hr
กิจกรรมของโปรติเอส (unit/ml)	22.42 ± 1.30	29.83 ± 1.76	76.0 ± 5.0
ค่า Productivity (unit/ml/hr)	1.21 ± 0.45	1.28 ± 0.03	1.55 ± 0.13
Product yield coefficient ( $Y_{p/x}$ )	2.8 ± 0.13	4.27 ± 0.55	10.07 ± 0.46

### 3. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 50 ลิตร

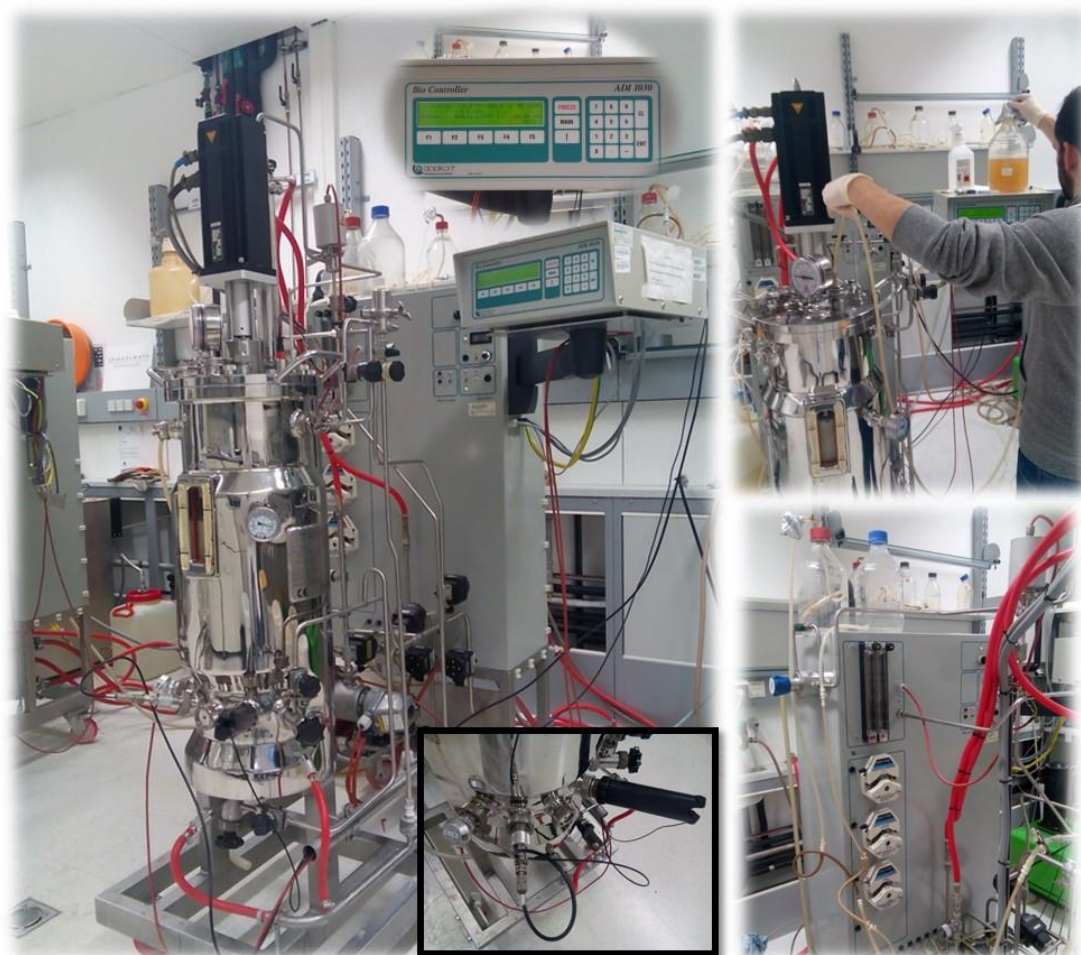
จากข้อมูลในการทดลองก่อนหน้านี้ทำให้ทราบสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการนี้ผู้วิจัยได้ทดลองขยายการหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร (working volume 30 ลิตร) ซึ่งเป็นถังหมักชนิด stirred tank bioreactor (STR) มีระบบตรวจวัดและควบคุมอุณหภูมิ pH และปริมาณออกซิเจนแบบอัตโนมัติ (ภาพที่ 27) แต่ด้วยข้อจำกัดของอุปกรณ์ถังหมักทำให้สามารถทดลองเพาะเลี้ยงได้เพียงการหมักแบบกะเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก็ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 31 (A-F) ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการหมักในถังขนาด 20 ลิตร โดยสามารถผลิตได้สูงสุดถึงกว่า 175 unit/ml ในเวลาเพียง 9 ชั่วโมง ทำให้ค่า productivity สูงถึง 13.47 unit/ml-hr การเจริญของเชื้อก็เช่นกันที่พบว่าค่อนข้างรวดเร็วและสามารถสูงได้ถึงกว่า 9 log cfu/ml จากกราฟแสดงการเจริญของ *Bacillus* (ภาพที่ 28E) แสดงให้เห็นว่าการเจริญในระยะ log phase สิ้นสุดในเวลาเพียงประมาณ 6 ชั่วโมงหลังเริ่มการหมัก แล้วจึงเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเมื่อพิจารณากลับไปยังกราฟแสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (ภาพที่ 28A) จะเห็นว่าเชื้อผลิตโปรติเอสได้สูงมากหลังชั่วโมงที่ 6 แล้วสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mosavian et al. (2012) ที่ระบุว่า *Bacillus* จะผลิต extracellular protease หลังการเจริญในระยะ log phase ประสิทธิภาพการหมักที่ได้จากถังหมักชนิดนี้ ถือว่าสูงกว่าประสิทธิภาพจากถังหมัก 20 ลิตรที่ออกแบบในงานวิจัยครั้งนี้มาก ดังตารางที่ 4 ซึ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในถังหมัก 20 ลิตรและ 50 ลิตร ปัจจัยที่ทำให้ประสิทธิภาพการหมักสูงน่าจะมาจากประสิทธิภาพการควบคุมสภาวะคงการหมักให้คงที่ ทั้งอุณหภูมิและ pH ดังแสดงในภาพที่ 32 แต่อย่างไรก็ตาม การควบคุมปริมาณออกซิเจนนั้น ทำได้ยากมากเนื่องจากปัญหาการเกิดฟอง โดยปรกติแล้วหากพบว่าออกซิเจนลดลงจนอาจเป็นอันตรายต่อการเจริญของเซลล์ ระบบจะสั่งการให้เพิ่มการจ่ายอากาศหรือเพิ่มอัตราการกวนให้สูงขึ้น แต่ในกรณีอาหารเหลว

ที่มีกากั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบนี้ การเพิ่มอากาศหรือการกวนในอัตราเร็วที่สูงมักทำให้เกิดฟองขึ้น และล้นออกจากถังหมัก ในทางปฏิบัติจึงจำเป็นต้องเติมสารกำจัดฟองเป็นระยะเช่นเดียวกับการหมักใน ถังหมัก 20 ลิตร

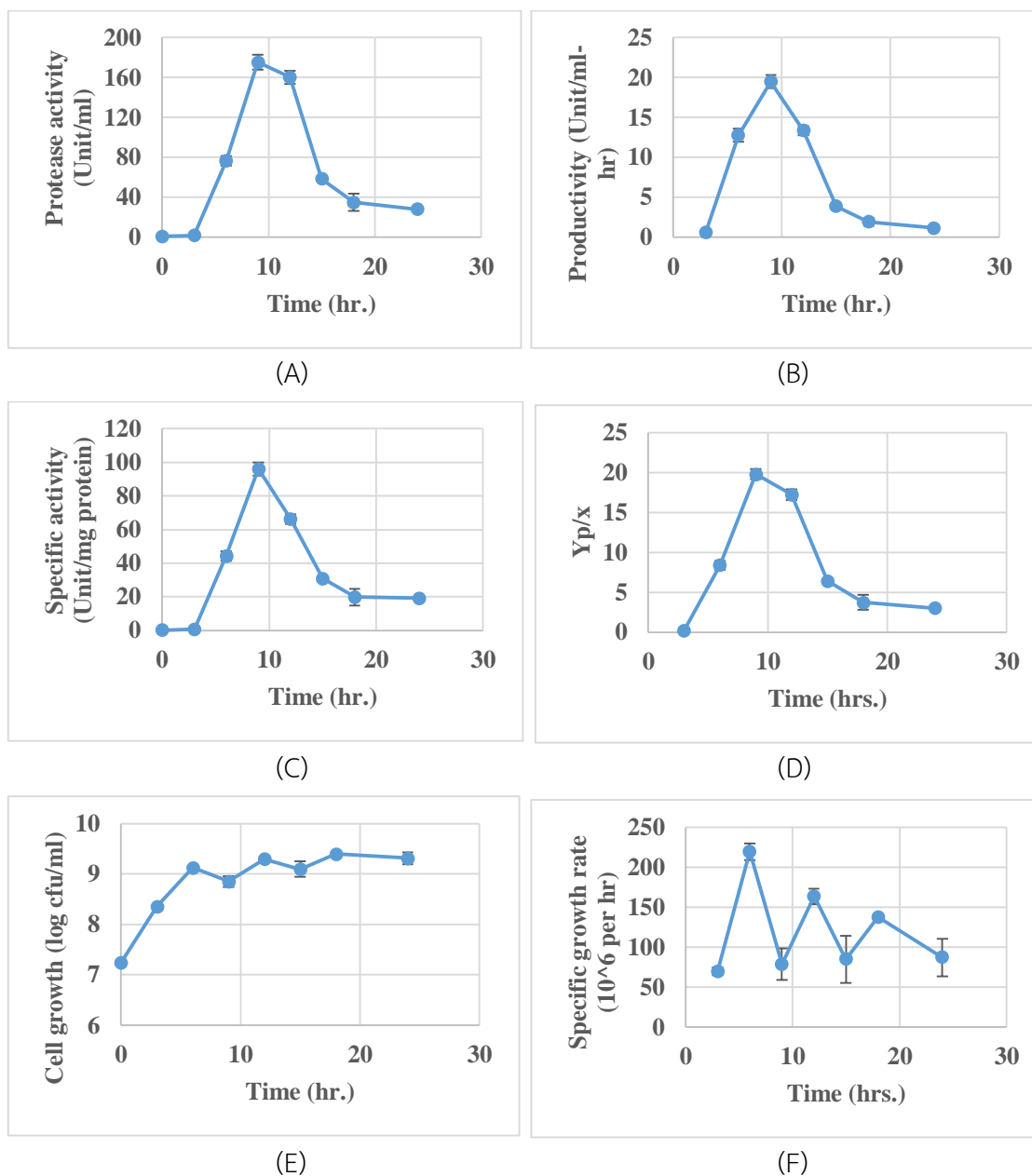
ค่า pH ของอาหารเลี้ยง ถือเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดย pH มีผลต่อ การขนส่งสารอาหารและโมเลกุลหลายๆ ชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การเปลี่ยนแปลงค่า pH จะทำให้สมดุล ของกรด-เบสและฟลักซ์ (fluxes) การถ่ายเทมวลของสารอาหาร ตัวกระตุ้น (inducers) และ growth factors หลายชนิดเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งโครงรูป (conformation) ของโมเลกุลเอนไซม์โปรติเอสที่ ผลิตออกมาแล้วก็อาจเปลี่ยนแปลงทำให้ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ต้นทุนต่ำที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้านี้มีแหล่งไนโตรเจนทั้งอินทรีย์ ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) และอนินทรีย์ (โปรตีนถั่ว เหลือง) ดังนั้นในช่วงที่มีการนำไนโตรเจนอนินทรีย์เข้าไปใช้ประโยชน์ในเซลล์ อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่า pH ที่ลดลง แต่หากมีการใช้ประโยชน์ไนโตรเจนอินทรีย์ ค่า pH จะสูงขึ้น (Bhunia et al., 2012) Moon and Parulekar (1990) ได้เปรียบเทียบการหมักแบบกะทั้งควบคุมและไม่ควบคุม pH เพื่อผลิต เอนไซม์โปรติเอสชนิด alkaline protease จาก *B. firmus* ผลการทดลองพบว่าเมื่อการหมักเสร็จสิ้น ถังหมักที่ไม่ได้ควบคุม pH จะมีค่า pH ที่ลดต่ำลง และทำให้ค่า productivity ลดลงเช่นกัน โดยการ ผลิตโปรติเอสจะลดลงอย่างมากเมื่อ pH ลดลงต่ำกว่า 7.0 ดังนั้นการที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมัก 20 ลิตรได้ไม่สูงเท่าในถัง 50 ลิตรครั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป

Abusham et al. (2009) รายงานโดยอ้างอิงจาก Frankena et al. (1986) และ Rahman et al. (2005) เกี่ยวกับผลของอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่มีต่อประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน Bacillus โดยพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์เอนไซม์และพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ซึ่งถูกควบคุมได้ด้วยอุณหภูมิและการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ในกลุ่ม extracellular enzyme (เช่นโปรติเอสจากงานวิจัยนี้) ที่อุณหภูมิส่งผลต่อการขับเอนไซม์ออกจาก เซลล์ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้ม เซลล์เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นอุณหภูมิของการหมักควรเปลี่ยนแปลงให้น้อยที่สุด

โดยสรุปแล้ว การหมักโดยมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้คงที่ น่าจะเป็นแนวทางที่ เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้ได้ผลผลิตสูงสุด อาจจะไม่สำคัญว่าจะต้องเป็นถังหมัก ขนาดใดหรือทำจากวัสดุชนิดใด ระบบการควบคุมอัตโนมัติก็เป็นอีกหนึ่งอุปกรณ์ในการเฝ้าระวัง ควบคุมการหมักให้เกิดอย่างมีประสิทธิภาพ

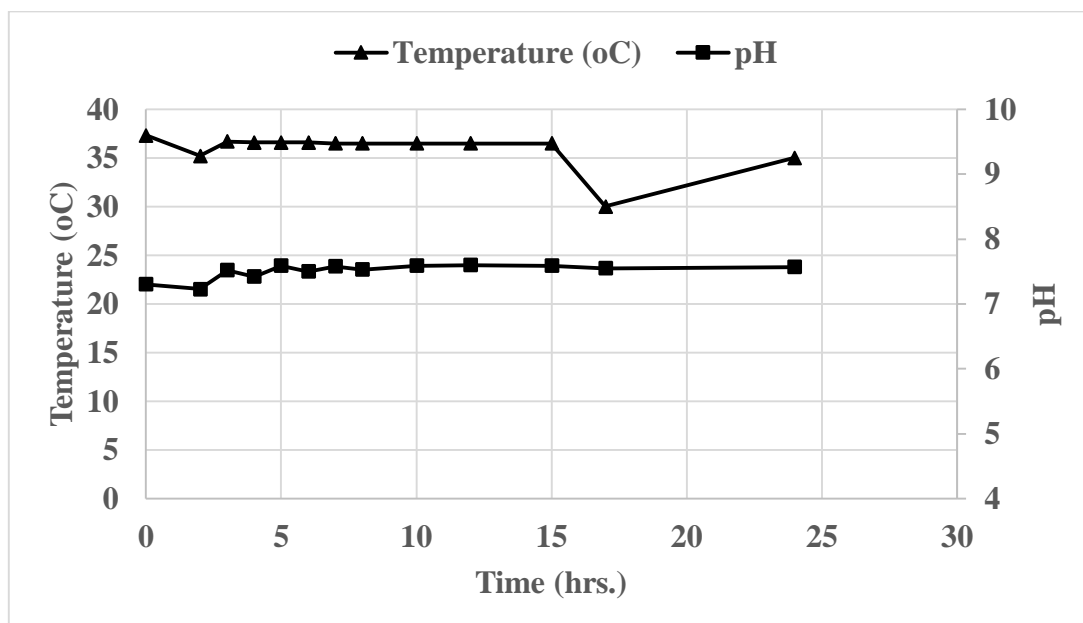


ภาพที่ 30 แสดงลักษณะของถังหมักชนิด stirred tank bioreactor ขนาด 50 ลิตร ที่ใช้การทดลองหมักแบบกะ



ภาพที่ 31 ค่าจลนพลศาสตร์การหมักแบบกะเมื่อทำการหมักในถังหมัก STR ขนาด 50 ลิตร และมีการควบคุมสภาวะการหมักด้วยระบบควบคุมอัตโนมัติ โดย

- (A) คือกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease activity)
- (B) คือค่า Productivity
- (C) คือค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)
- (D) คือค่า Product yield coefficient ( $Y_{p/x}$ )
- (E) คือค่าจำนวนเซลล์ในหน่วย log cfu/ml
- (F) คือค่าการเจริญจำเพาะของเซลล์ (specific growth rate)



ภาพที่ 32 แสดงระดับอุณหภูมิและค่า pH ที่ตรวจวัดได้ในถังหมักขนาด 50 ลิตรในระหว่างการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ของการหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตรและ 50 ลิตร

พารามิเตอร์	การหมักแบบกะ (20L) 18 hr	การหมักแบบกึ่งกะ (20 L)		การหมักแบบกะ (STR 50L) 9 hr
		24 hr	48 hr	
กิจกรรมของโปรติเอส (unit/ml)	22.42 ± 1.30	29.83 ± 1.76	76.0 ± 5.00	175.2 ± 7.41
ค่า Productivity (unit/ml/hr)	1.21 ± 0.45	1.28 ± 0.03	1.55 ± 0.13	13.47 ± 0.82
Product yield coefficient ( $Y_{p/x}$ )	2.8 ± 0.13	4.27 ± 0.55	10.07 ± 0.46	17.28 ± 0.59

#### 4. การผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยน้ำยางที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอส

การทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ สารเคมี สูตร อุปกรณ์และเทคนิคการทำถุงมือยางจากบริษัทผู้ผลิตถุงมือยางแห่งหนึ่งในจังหวัดสงขลา ทำการผลิตทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่ สูตรมาตรฐานของโรงงาน สูตรเติมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า (6L) และสูตรเติมเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย (MR10) โดยเอนไซม์จากงานวิจัยนี้ ผลิตมาจากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบและหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร ผลการทดลองพบว่าถุงมือสูตร MR10 มีลักษณะปรากฏที่ใกล้เคียงกับสูตรมาตรฐานของโรงงานทั้งในด้านความหนา สี และผิวสัมผัส ในขณะที่สูตร 6L ที่เติมเอนไซม์ทางการค้านั้นมีลักษณะแตกต่าง โดยมีผิวที่บางกว่าและขาดง่าย อีกทั้งพื้นผิวของถุงมือค่อนข้างเหนียว ทำให้ต้องใช้แปรงในปริมาณมากเพื่อลดการเกาะตัวของถุงมือ ความหนาของถุงมือแต่ละสูตรแสดงดังตารางที่ 5 นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าการบ่มน้ำยางร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าทำให้น้ำยางบางส่วนเสียสภาพและจับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากสารรักษาสภาพเอนไซม์ที่ถูกผสมในสารละลายเอนไซม์ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของอนุภาคยาง

จากการทดสอบถุงมือตามประเด็นต่างๆ บางรายการที่ระบุไว้ในมาตรฐาน มอก.538-2548 (ถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการคัดกรองชนิดใช้ครั้งเดียว) ซึ่งทดสอบตามมาตรฐาน ISO ผลการทดลองพบดังตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นว่ามิติด้านความหนาของทุกสูตรผ่านมาตรฐานที่ซึ่งกำหนดไว้ที่ 0.1 มม. ความยืดเมื่อขาดก็เช่นกันที่ผ่านมาตรฐานทุกสูตร แต่ประเด็นอื่นๆ ได้แก่ แรงดึงเมื่อขาดและความเค้นดึงเมื่อมีการยืดร้อยละ 300 ไม่ผ่านมาตรฐานทั้งสามสูตร ทั้งนี้สูตรไม่เติมเอนไซม์มีค่าสูงที่สุดตามมาด้วยสูตรที่เติมเอนไซม์จากเชื้อ MR10 ส่วนสูตรที่เติมเอนไซม์ทางการค้าให้ค่าทดสอบที่ต่ำที่สุด

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดสอบสมบัติของถุงมือตามมาตรฐาน ASTM ผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของถุงมือทั้งสามสูตรทั้งก่อนและหลังการบ่มแรงตามมาตรฐาน ASTM พบว่าถุงมือที่เติมเอนไซม์โปรติเอสทั้งสองสูตรมีความแข็งแรงในรูปของค่า Tensile และ stress at 500% ที่ต่ำกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน (ตารางที่ 7-8) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตร 6L มีเพียงค่าความยืดเมื่อขาด (elongation at break) เท่านั้นที่มีค่าสูงกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน ดังแสดงผลในตารางที่ 7-9 และเมื่อเปรียบเทียบสมบัติของถุงมือยางที่ผลิตครั้งนี้กับข้อกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ Rubber examination glove (ASTM D3578-05) type II แล้ว พบว่าความหนาของถุงมือทุกสูตรผ่านมาตรฐาน ส่วนค่า Tensile นั้นพบว่าสูตรของโรงงานผ่านมาตรฐาน แต่สูตรที่เติมเอนไซม์ไม่ผ่านมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากการบ่มแรงแล้วพบว่าสูตร MR10 มีค่าสูงขึ้นและผ่านมาตรฐานได้ในขณะที่ค่า Stress at 500% elongation ก็พบว่า มีเพียงสูตรของโรงงานเท่านั้นที่ผ่านมาตรฐาน

เป็นที่น่าสังเกตว่าถุงมือยางสูตรที่เติมเอนไซม์โปรติเอสแล้วนำมาผลิตถุงมือตามกระบวนการของโรงงานน่าจะเกิดการวัลคาไนซ์ (vulcanization) ที่ไม่สมบูรณ์ สังเกตได้จากภายหลังการบ่มแรงที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแล้วพบว่าสมบัติเชิงกลด้านต่างๆ ดีขึ้น ทั้งนี้สันนิษฐานว่ากรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้สภาพความเป็นกรดส่วนผสมยางสูงขึ้น ลักษณะ

เช่นนี้มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดการเชื่อมขวาง (cross-link) ของยางได้ ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Perrella and Gasperi (2002) ที่รายงานว่าการผลิตถุงมือยางจากน้ำยางที่มีการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสชนิด alkaline protease ในปริมาณ 0.025% เป็นเวลา 1-2 วัน ถุงมือที่ได้ยังคงผ่านมาตรฐาน ASTM3578 แต่ในรายงานไม่ได้ระบุสถานะในการวัลคาไนซ์น้ำยาง ดังนั้นหากจะมนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ในกระบวนการผลิตถุงมือแล้ว จำเป็นต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัลคาไนซ์น้ำยางเพื่อให้ได้ถุงมืออย่างที่มีคุณภาพต่อไป

น้ำยางชั้นที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำถุงมือแบบนี้ พบว่ายังคงมีโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b1 (rubber elongation factor; REF) หลงเหลืออยู่จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Dot blot แต่เมื่อทำการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้แล้ว ก็พบว่าไม่สามารถตรวจพบโปรตีน REF ได้ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ ดังภาพที่ 33 และเมื่อผ่านกระบวนการผลิตถุงมืออย่างแล้วนำตัวอย่างถุงมือทั้งสามสูตรมาทำการสกัดโปรตีนด้วยกระบวนการตามมาตรฐาน ASTM5712-10 ร่วมกับการสกัดด้วยเครื่อง sonicator ที่ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 10 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ REF การทดสอบพบว่า ไม่พบการปรากฏของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้ในตัวอย่างทั้งสาม (ภาพที่ 34) ทั้งที่ควรพบในถุงมือสูตรของโรงงาน เพราะน้ำยางชั้นที่เป็นวัตถุดิบในการทำถุงมือแบบนี้ ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าน้ำยางสดมาก แต่ก็ยังอาจพบโปรตีนภูมิแพ้หลงเหลืออยู่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน Hev b1 และ Hev b3 ที่ส่วนมากพบอยู่บนอนุภาคน้ำยางและบางส่วนปนอยู่ในส่วนซีรัม (Yeang et al., 2004) ปริมาณโปรตีนในน้ำยางแต่ละล็อตก็มีความแปรผันขึ้นกับหลายปัจจัย ทั้งสายพันธุ์ ปุ๋ย และดิน เป็นต้น (Sussman et al., 2002) อย่างไรก็ตาม เทคนิคการผลิตถุงมือของโรงงานก็อาจจะช่วยกำจัดโปรตีนออกจากถุงมืออย่างได้เช่นกัน ได้แก่ การล้างด้วยน้ำเปล่าและการทำ Chlorination (Perrella and Gasperi, 2002; Pichayakorn et al., 2014) จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ตรวจไม่พบโปรตีนภูมิแพ้ในตัวอย่างถุงมือ

ตารางที่ 5 แสดงสมบัติด้านต่างๆ ของถุงมือทั้งสามสูตรเปรียบเทียบกับมาตรฐาน ISO

	สูตรโรงงาน	สูตรโรงงาน+ เอนไซม์ทางการค้า	สูตรโรงงาน+เอนไซม์ จากงานวิจัย	มาตรฐาน ISO*
ความเค้นดึงเมื่อมีการ ยืดร้อยละ 300 (N)**	0.88 ± 0.06	0.49 ± 0.05	0.7 ± 0.04	2
ความเค้นดึงเมื่อมีการ ยืดร้อยละ 500 (N)**	0.19 ± 0.09	1.02 ± 0.07	1.57 ± 0.08	ไม่ได้กำหนด ไว้
แรงดึงเมื่อขาด (N)	11.75 ± 0.35	2.85 ± 0.21	5.85 ± 1.76	12.5
การต้านแรงดึงจนขาด (MPa)	20.4 ± 0.42	5.7 ± 0.28	10.45 ± 3.18	ไม่ได้กำหนด ไว้
ความยืดเมื่อขาด (%)	770 ± 28	719 ± 26.8	708.5 ± 43.13	700
ความหนา (mm)	0.146 ± 0.01	0.124 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.10

หมายเหตุ: ทำการวิเคราะห์จำนวน 2 ซ้ำ และทดสอบโดยศูนย์บริการทดสอบรับรองภาคกลาง ฝ่ายวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมยางแห่งประเทศไทย

\*อ้างอิงจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว (มกอ. 538-2548) และเป็นมาตรฐานที่กำหนดสำหรับถุงมือประเภทที่ 1 (ทำจากน้ำยางธรรมชาติ)

\*\*ได้จากการแปลงค่าที่รายงานมาซึ่งรายงานในหน่วย MPa ดังนั้น สามารถแปลงให้อยู่ในหน่วย N ได้ ด้วยสมการความสัมพันธ์ MPa = N/mm<sup>2</sup>

ตารางที่ 6 แสดงความหนาโดยเฉลี่ยของถุงมือสูตรต่างๆ

สูตรถุงมือ	ความหนาเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ± SD		
	ก่อนบ่มแรง	หลังบ่มแรง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	0.143 ± 0.003	0.144 ± 0.002	0.08
สูตรโรงงาน+เอนไซม์ทางการค้า	0.128 ± 0.002	0.133 ± 0.003	
สูตรโรงงาน+เอนไซม์จากงานวิจัย	0.145 ± 0.002	0.146 ± 0.005	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น

ตารางที่ 7 แสดงค่า Tensile ของถุงมือสูตรต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการบ่มเร่ง

สูตรถุงมือ	ค่า Tensile (MPa) $\pm$ SD		
	ก่อนบ่มเร่ง	หลังบ่มเร่ง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	15.56 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>	15.91 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	14
สูตรโรงงาน+เอนไซม์ทางการค้า	4.55 $\pm$ 0.42 <sup>c</sup>	7.55 $\pm$ 0.61 <sup>c*</sup>	(ก่อน-หลังบ่มเร่ง)
สูตรโรงงาน+เอนไซม์จากงานวิจัย	8.47 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	14.7 $\pm$ 1.71 <sup>b*</sup>	

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น
- ตัวอักษร a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- \* คือค่าเฉลี่ยของก่อนและหลังบ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 แสดงค่า stress at 500% ของถุงมือสูตรต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการบ่มเร่ง

สูตรถุงมือ	Stress at 500% $\pm$ SD		
	ก่อนบ่มเร่ง	หลังบ่มเร่ง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	2.84 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	3.67 $\pm$ 0.19 <sup>a*</sup>	2.8
สูตรโรงงาน+เอนไซม์ทางการค้า	1.19 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	1.53 $\pm$ 0.19 <sup>c*</sup>	(ก่อนบ่มเร่ง)
สูตรโรงงาน+เอนไซม์จากงานวิจัย	1.51 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	2.36 $\pm$ 0.33 <sup>b*</sup>	

หมายเหตุ

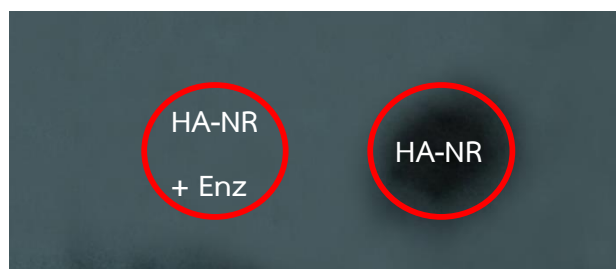
- ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น
- ตัวอักษร a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- \* คือค่าเฉลี่ยของก่อนและหลังบ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 แสดงค่าความยืด ผน จุดขาดของถุงมือสูตรต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการบ่มเร่ง

สูตรถุงมือ	ความยืด ผน จุดขาด (เปอร์เซ็นต์) $\pm$ SD		
	ก่อนบ่มเร่ง	หลังบ่มเร่ง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	808.7 $\pm$ 44.5 <sup>b</sup>	739.3 $\pm$ 31.4 <sup>b*</sup>	650% (ก่อนบ่มเร่ง)
สูตรโรงงาน+เอนไซม์ทางการค้า	853.4 $\pm$ 47.3 <sup>b</sup>	862.6 $\pm$ 56.9 <sup>a</sup>	500% (หลังบ่มเร่ง)
สูตรโรงงาน+เอนไซม์จากงานวิจัย	910.8 $\pm$ 76.9 <sup>a</sup>	821.8 $\pm$ 42.2 <sup>a*</sup>	

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น
- ตัวอักษร a, b ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- \* คือค่าเฉลี่ยของก่อนและหลังบ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 33 ผลการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF ด้วยเทคนิค Dot blot ในน้ำยางข้นและน้ำยางข้นที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส



ภาพที่ 34 ผลการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF ด้วยเทคนิค Dot blot ในตัวอย่างถุงมือยางทางการแพทย์ที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยครั้งนี้ โดย (1) คือถุงมือสูตรมาตรฐานของโรงงาน (2) คือถุงมือสูตร 6L (3) คือถุงมือสูตร MR10



ภาพที่ 35 แสดงกระบวนการผลิตถุงมือ ณ โรงงานผลิตถุงมือยาง

## 5. การวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ข้อมูลจากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า การหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร ทั้งแบบกะและแบบกึ่งกะ และการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 50 ลิตรที่มีระบบควบคุมสภาวะการหมักแบบอัตโนมัติ นั้น ให้ประสิทธิภาพการหมักที่แตกต่างกัน ดังแสดงมาแล้วในตารางที่ 4 ดังนั้นในหัวข้อนี้ ผู้วิจัยจะทำการวิเคราะห์ถึงต้นทุนหลักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในรูปแบบการหมักแบบต่างๆ โดยจำแนกค่าใช้จ่ายออกเป็นหมวดค่าใช้จ่ายโรงงาน (overhead cost) ซึ่งได้แก่ เครื่องจักรและเครื่องมือหลักในการปฏิบัติงาน ค่าวัสดุดิบทางตรง (direct material cost) และค่าแรงงานทางตรง (direct labor cost) ทั้งนี้ ผู้วิจัยแบ่งค่าวัสดุดิบทางตรงออกเป็น 2 หมวดย่อย ได้แก่ ค่าวัสดุสิ้นเปลืองหลักและค่าสาธารณูปโภค ผลการวิเคราะห์ได้แสดงในตารางที่ 10-12 ซึ่งพบว่าราคาต้นทุนการผลิตเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิตจากการหมักในถังหมัก 20 ลิตร ทั้งแบบกะและกึ่งกะ และการหมักแบบกะในถังหมัก 50 ลิตรมีราคาเท่ากับ 0.0137 บาท 0.0053 บาท และ 0.0014 บาท ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม แม้การหมักในถัง 20 ลิตรแบบกะจะมีต้นทุนการผลิตที่สูงสุด แต่ก็ใช้เวลาสั้นที่สุดในการผลิตจนกระทั่งได้เอนไซม์ออกมาในรูปแบบพร้อมใช้งาน คือใช้เวลาเพียง 50 ชั่วโมง รองลงมาคือการหมักในถังหมัก 50 ลิตร (60 ชั่วโมง) และการหมักแบบกึ่งกะในถังหมัก 20 ลิตร (74 ชั่วโมง) ผู้วิจัยยังพบว่าประเภทของระบบการหมักส่งผลต่อต้นทุนค่าแรงงานด้วย โดยการหมักแบบกึ่งกะที่ทำการหมักเป็นเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง ทำให้ต้องจ้างแรงงานเพิ่มอีกประมาณ 1 วัน ส่วนการหมักในถัง 50 ลิตร ถึงแม้จะใช้เวลาการหมักเพียง 9 ชั่วโมง แต่ต้องเสียเวลาในการฆ่าเชื้อถังหมักและอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างนาน ราคาต้นทุนที่แสดงครั้งนี้ ไม่ได้คิดรวมค่าใช้จ่ายโรงงาน ที่โดยหลักแล้วเป็นค่าใช้จ่ายในการซื้อเครื่องจักรและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ แม้การหมักด้วยถังหมัก STR ที่มีระบบควบคุมอัตโนมัติจะมีต้นทุนการผลิตต่อหน่วยที่ถูกที่สุด แต่ราคาถังหมักค่อนข้างสูง (ถังหมัก SIP ขนาด 30 ลิตรพร้อมระบบควบคุมอัตโนมัติ และระบบฆ่าเชื้อในตัวยี่ห้อ WINPACT® ราคา 5 ล้านบาท) ในขณะที่ถังหมัก 20 ลิตรที่ใช้ครั้งนี้ มีราคาเพียง 6,000 บาทต่อชิ้น ราคาของถังหมักนี้น่าจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่ภาคเอกชนใช้ตัดสินใจเลือกระบบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส นอกเหนือจากราคาต้นทุนการผลิต

ตารางที่ 10 แสดงการแจกแจงต้นทุนค่าใช้จ่ายและต้นทุนเวลาสำหรับการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสด้วยการหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร (ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 ลิตร) ระบบการหมักแบบกะและทำการหมักเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

หมวด ค่าใช้จ่าย	ต้นทุนค่าใช้จ่าย		ต้นทุนเวลา	
	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	รายการ	ชั่วโมง
ค่าอุปกรณ์ (ค่าใช้จ่าย โรงงาน หรือ Overhead cost)	1. ถังหมัก Nalgene Carboy ขนาด 20 ลิตร (Nalgene®) พร้อมฝาผลิตจากวัสดุ Polypropylene	6,000	-	-
	2. บีมอากาศ Model LP-100 ยี่ห้อ RESUN® พร้อมตู้ มาตรฐานวัดความแรงลมและวาล์ว	5,000	-	-
	3. หม้อน้ำแช่ความดันไอชนิดไฟฟ้า (HIRAYAMA® model HEV-50)	200,000	-	-
	4. ตู้เขี่ยเชื้อ (horizontal clean bench)	50,000	-	-
	5. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (RATEK®)	150,000	-	-
	6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (decanter centrifuge)	450,000	-	-
	7. ตู้แช่เย็น 2 ประตู	20,000	-	-
	8. อุปกรณ์เครื่องแก้วและเครื่องมือเบ็ดเตล็ดในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา	10,000	-	-
	9. อื่นๆ			
ค่าวัสดุ สิ้นเปลือง	<u>ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรติเอส</u>			
	- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต้นทุนต่ำ (กากถั่วเหลืองและสารเสริมอื่นๆ ราคา 5 บาท/ลิตร) <sup>a</sup>	75	- เพาะเลี้ยง <i>B. subtilis</i> และการเตรียมหัวเชื้อ	36
	- แผ่นกรองอากาศขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ยี่ห้อ Sartorius®	200		
	<u>ขั้นตอนการแยกเซลล์แบคทีเรีย</u>			
-	-	ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์และตะกอนทิ้ง	1	

<u>ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรตีนเอสจากอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>				
	- สารอะซิโตน (160 บาท / ลิตร)	1,800 <sup>b</sup>	เติมอะซิโตน	0.5
	- สารรักษาสภาพ (กลีเซอรอล+KMS)	50	ตั้งทิ้งไว้เพื่อตกตะกอนสมบูรณ์	12
			กรองเก็บตะกอนโปรตีน	0.5
<b>ค่า</b>	<u>ค่าไฟฟ้า</u>	486.73 <sup>d</sup>	-	-
<b>สาธารณูปโภค</b>	- บั้มอากาศ (1.8 หน่วย) <sup>c</sup> - หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ(3.74 หน่วย) - ตู้แช่เชื้อ (0.27 หน่วย) - เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (23.04 หน่วย) - เครื่องปั่นเหวี่ยง (decanter centrifuge) (3 หน่วย) - ตู้แช่เย็น (5.1 หน่วย) <u>ค่าน้ำประปา</u> - น้ำสำหรับเตรียมเลี้ยงเชื้อและการซักล้าง (1 ลบ.เมตร)	18.25 <sup>e</sup>		
<b>ค่าแรงงาน</b>	แรงงานที่มีทักษะ วันละ 500 บาท จำนวน 2 คน ทำงาน 2 วัน	2,000	-	-
	<b>รวมค่าใช้จ่าย<sup>f</sup></b>	<b>4,629.98</b>	-	-
	<b>รวมเวลา</b>	-	-	50
ได้ผลผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสทั้งสิ้น 336,300 ยูนิต				
ดังนั้น 1 ยูนิตมีราคาต้นทุน 0.0137 บาท ใช้เวลาเตรียม 50 ชั่วโมง				

หมายเหตุ:

<sup>a</sup> เป็นข้อมูลการเตรียมโปรตีนเอสจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 15 ลิตร

<sup>a</sup> กากถั่วเหลืองราคา 20.8 บาท / กิโลกรัม

<sup>b</sup> อะซิโตนราคา 160 บาทต่อลิตร และเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการตกตะกอนแล้ว สามารถกลั่นอะซิโตนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ คาดว่าการสูญเสียของอะซิโตนระหว่างกระบวนการกลั่นอยู่ที่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคิดเป็นต้นทุนเพียง 48 บาทต่อลิตร (ใช้ทั้งสิ้น 37.5 ลิตร)

<sup>c</sup> หน่วยไฟฟ้าคำนวณจาก “กำลังไฟ (กิโลวัตต์) x ชั่วโมงทำงาน”

<sup>d</sup> ราคา 486.73 บาท มาจาก ค่าพลังงานไฟฟ้า 36.95 หน่วย (144.42 บาท) + ค่าบริการ (312.24 บาท) + Vat 7% (31.84 บาท) - ค่าไฟฟ้าผันแปร (1.77 บาท) (การไฟฟ้านครหลวง; <http://www.mea.or.th>)

<sup>e</sup> ราคาอ้างอิงจากการประกาศส่วนภูมิภาค (<http://www.pwa.co.th/contents/service/tableprice>)

<sup>f</sup> ไม่นำค่าอุปกรณ์มาคำนวณต้นทุนการผลิตด้วย

ตารางที่ 11 แสดงการแจกแจงต้นทุนค่าใช้จ่ายและต้นทุนเวลาสำหรับการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสด้วยการหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร (ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 ลิตร) ระบบการหมักแบบกึ่งกะและทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หมวด ค่าใช้จ่าย	ต้นทุนค่าใช้จ่าย		ต้นทุนเวลา	
	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	รายการ	ชั่วโมง
ค่าอุปกรณ์ (งบลงทุน) *โดยประมาณ	1. ถังหมัก Nalgene Carboy ขนาด 20 ลิตร (Nalgene®) พร้อมฝา ผลิตจากวัสดุ Polypropylene	6,000	-	-
	2. บั๊มอากาศ Model LP-100 ยี่ห้อ RESUN® พร้อมตู้ มาตรฐานวัดความแรงลม และวาล์ว	5,000	-	-
	3. หม้อน้ำแช่ความดันไอชนิดไฟฟ้า (HIRAYAMA® model HEV-50)	200,000	-	-
	4. ตู้เขี่ยเชื้อ (horizontal clean bench)	50,000	-	-
	5. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (RATEK®)	150,000	-	-
	6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (decanter centrifuge)	450,000	-	-
	7. ตู้แช่เย็น 2 ประตู	20,000	-	-
	8. อุปกรณ์เครื่องแก้วและเครื่องมือเบ็ดเตล็ดในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา	2,000	-	-
	9. อื่นๆ			
ค่าวัสดุ สิ้นเปลือง	<u>ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรติเอส</u>			
	- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต้นทุนต่ำ (กากถั่วเหลืองและสารเสริมอื่นๆ ราคา 5 บาท/ลิตร) <sup>a</sup>	90	- เพาะเลี้ยง <i>B. subtilis</i> และการเตรียมหัวเชื้อ	60
	- แผ่นกรองอากาศขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ยี่ห้อ Sartorius®	200		
	<u>ขั้นตอนการแยกเซลล์แบคทีเรีย</u>			
	-	-	ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์และตะกอนทิ้ง	1
	<u>ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>			
- สารอะซิโตน (160 บาท / ลิตร)	2,160 <sup>b</sup>	เติมอะซิโตน	0.5	
- สารรักษาสภาพ (กลีเซอรอล+KMS)	50	ตั้งทิ้งไว้เพื่อตกตะกอนสมบูรณ์	12	
		กรองเก็บตะกอนโปรตีน	0.5	

ค่า สาธารณูปโภค	<u>ค่าไฟฟ้า</u> - บั้มอากาศ (4.8 หน่วย) <sup>c</sup> - หม้อน้ำฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (3.74 หน่วย) - ตู้แช่แข็ง (0.27 หน่วย) - เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (23.04 หน่วย) - เครื่องปั่นเหวี่ยง (decanter centrifuge) (3 หน่วย) - ตู้แช่เย็น (5.1 หน่วย) <u>ค่าน้ำประปา</u> - น้ำสำหรับเตรียมเลี้ยงเชื้อและการซัก ล้าง (2 ลบ.เมตร)	499.12 <sup>d</sup>           36.5 <sup>e</sup>	-           -	-           -
ค่าแรงงาน	แรงงานที่มีทักษะ วันละ 500 บาท จำนวน 2 คน ทำงาน 3 วัน	3,000	-	-
	<b>รวมค่าใช้จ่าย <sup>f</sup></b>	<b>6,035.62</b>	-	-
	<b>รวมเวลา</b>	-	-	<b>74</b>
ได้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้งสิ้น 1,140,000 ยูนิต				
ดังนั้น 1 ยูนิตมีราคาต้นทุน 0.0053 บาท ใช้เวลาเตรียม 74 ชั่วโมง				

หมายเหตุ:

<sup>a</sup> เป็นข้อมูลการเตรียมโปรติเอสจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 18 ลิตร (เติมอาหารใหม่อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ลิตร)

<sup>a</sup> กากถั่วเหลืองราคา 20.8 บาท / กิโลกรัม

<sup>b</sup> อะซิโตนราคา 160 บาทต่อลิตร และเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการตกตะกอนแล้ว สามารถถลันอะซิโตนนำกลับมาใช้ใหม่ได้ คาดว่าการสูญเสียของอะซิโตนระหว่างกระบวนการกลั่นอยู่ที่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคิดเป็นต้นทุนเพียง 48 บาทต่อลิตร (ใช้ทั้งสิ้น 45 ลิตร)

<sup>c</sup> หน่วยไฟฟ้าคำนวณจาก “กำลังไฟ (กิโลวัตต์) x ชั่วโมงทำงาน”

<sup>d</sup> ราคา 499.12 บาท มาจาก ค่าพลังงานไฟฟ้า 39.95 หน่วย (156.15 บาท) + ค่าบริการ (312.24 บาท) + Vat 7% (32.65 บาท) - ค่าไฟฟ้าผันแปร (1.92 บาท) (การไฟฟ้านครหลวง; <http://www.mea.or.th>)

<sup>e</sup> ราคาอ้างอิงจากการประสานภูมิภาค (<http://www.pwa.co.th/contents/service/tableprice>)

<sup>f</sup> ไม่นำค่าอุปกรณ์มาคำนวณต้นทุนการผลิตด้วย

ตารางที่ 12 แสดงการแจกแจงต้นทุนค่าใช้จ่ายและต้นทุนเวลาสำหรับการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสด้วยการหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร (ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 30 ลิตร) ระบบการหมักแบบกะและทำการหมักเป็นเวลา 9 ชั่วโมง

หมวด ค่าใช้จ่าย	ต้นทุนค่าใช้จ่าย		ต้นทุนเวลา	
	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	รายการ	ชั่วโมง
ค่าอุปกรณ์ (งบลงทุน) *โดยประมาณ	1. ถังหมัก Stirred tank reactor พร้อมชุดควบคุม (APPLIKON® model ADI-1030) และเครื่องกำเนิดไอน้ำ (TREVIL®)	>5,000,000	-	-
	2. ป้อนลม ขนาด 4 kg/cm <sup>2</sup> ยี่ห้อ SWAN® model DR-213	20,000	-	-
	3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอชนิดไฟฟ้า (HIRAYAMA® model HEV-50)	200,000	-	-
	4. ตู้เขี่ยเชื้อ (horizontal clean bench)	50,000	-	-
	5. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (RATEK®)	150,000	-	-
	6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (decanter centrifuge)	450,000	-	-
	7. ตู้แช่เย็น 2 ประตู	20,000	-	-
	8. อุปกรณ์เครื่องแก้วและเครื่องมือเบ็ดเตล็ดในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา	2,000	-	-
	9. อื่นๆ			
ค่าวัสดุ สิ้นเปลือง	<u>ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโปรติเอส</u>			
	- อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต้นทุนต่ำ (กากถั่วเหลืองและสารเสริมอื่นๆ ราคา 5 บาท/ลิตร) <sup>a</sup>	150	- นึ่งฆ่าเชื้ออาหารและถังหมัก และ cooling down	12
			- เพาะเลี้ยง <i>B. subtilis</i> และการเตรียมหัวเชื้อ	33
	<u>ขั้นตอนการแยกเซลล์แบคทีเรีย</u>			
	-	-	ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์และตะกอนทิ้ง	1
	<u>ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>			
- สารอะซิโตน (160 บาท / ลิตร)	3,600 <sup>b</sup>	เติมอะซิโตน	1	
- สารรักษาสภาพ (กลีเซอรอล+KMS)	100	ตั้งทิ้งไว้เพื่อตกตะกอนสมบูรณ์	12	
		กรองเก็บตะกอนโปรตีน	1	



## สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยที่ได้รับในครั้งนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิต เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ด้วยอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็น องค์ประกอบหลักในถังหมักขนาด 20 ลิตร คือการหมักที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส อัตรา การให้อากาศเท่ากับ  $1.0 \text{ kg/cm}^2$  และมีการกวนด้วยใบพัดที่อัตราเร็ว 150 rpm ภายใต้สภาวะดังกล่าว และมีการหมักในรูปแบบกะ (batch fermentation) จะสามารถทำให้ได้ค่า productivity เท่ากับ  $1.21 \text{ unit/ml-hr}$  แต่ค่า productivity จะสามารถเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ หากทำการ เพาะเลี้ยงในรูปแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่มีการเติมอาหารใหม่ 1 ลิตรในทุก 12 ชั่วโมง ภายหลังจากเพาะเลี้ยงแบบกะไปแล้ว 24 ชั่วโมง และค่า productivity จะเพิ่มขึ้นกว่า 10 เท่าหากทำ การหมักในถังหมักที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมของการหมักให้คงที่ ดังเช่นการใช้ถังหมัก STR ขนาด 50 ลิตร ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจนกระทั่งอยู่ในรูปแบบพร้อมใช้งาน แล้ว สามารถสรุปได้ว่าการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตรมีต้นทุนที่ถูกที่สุด (0.0014 บาทต่อยูนิต) รองลงมาคือการหมักแบบกึ่งกะ (0.0053 บาทต่อยูนิต) และแบบกะในถังหมักขนาด 20 ลิตร (0.0137 บาทต่อยูนิต) แต่การหมักแบบกะในถังหมัก 20 ลิตรกลับใช้เวลาการผลิตเอนไซม์สั้นที่สุด (50 ชั่วโมง) ตามด้วยการหมักแบบกะในถังหมัก STR 50 ลิตร (60 ชั่วโมง) และการหมักแบบกึ่งกะในถังหมัก 20 ลิตร (74 ชั่วโมง) ตามลำดับ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ครั้งนี้ เมื่อนำมากำจัดโปรตีนในน้ำยางชันแล้ว นำไปผลิตเป็นถุงมือทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน พบว่าส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของ ยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือ ได้แก่ ค่าแรงดึงและค่า stress at 500% จึงไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย นี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัล คาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

## ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

มีข้อเสนอแนะหากต้องนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ในการผลิตถุงมือของโรงงาน ที่จำเป็นต้อง ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับสูตรการขึ้นรูปหรือการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัลคาไนซ์ยางเพื่อให้ ผลิตภัณฑ์มีความแข็งแรง อย่างน้อยต้องผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05

## เอกสารอ้างอิง

- นุชนาฏ ญ ระนอง และ วราภรณ์ ขจรไชยกูล. “เทคโนโลยีการลดโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ”. *วารสารยางพารา*, 16(2539): 81-90.
- พรรษา อดุลยธรรม และ กฤษณา คงศิลป์. รายงานการวิจัยเรื่อง การใช้เอ็นไซม์ในการลดโปรตีนในน้ำยางเพื่อการผลิตน้ำยางชั้น. ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง, 2543.
- ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ และ พรสิทธิ์ วงศ์บุญฑริก. “การเตรียมและสมบัติบางประการของยางโปรตีนต่ำ”. *วารสารสงขลานครินทร์*, 19(2540): 223-229.
- ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. รายงานการวิจัยเรื่อง การคัดเลือกโปรตีนเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ. สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย, 2552.
- ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. รายงานการวิจัยเรื่อง การเตรียมโปรตีนเอสในรูปที่เหมาะสมเชิงอุตสาหกรรมสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยางสด. สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย, 2552.
- ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน. รายงานการวิจัยเรื่อง การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ. สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย, 2552.
- สมใจ ศิริโชค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ: กรุงเทพ.
- สาโรจน์ ศิริตันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา, ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2540. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพ.
- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances* 31: 877-902.
- Abusham, R.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B. and Basri, M. 2009. Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent-tolerant protease from a newly isolated halo tolerant *Bacillus subtilis* strand. *Microbial Cell Factories* 8: 1-9.
- Bhunja, B., Basak, B. and Dey, A. 2012. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. *Journal of Biochemical Technology* 3(4): 448-457.
- Chang, Y-H., Chang, K-S., Huang, C-W., Hsu, C-L. and Jang, H-D. 2012. Comparison of Batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. *Fuel* 97: 166-173.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote., and Lumyong, S. (2002). Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28: 241-245.

- Frankena, J., Koningstein, G.M., Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24: 106-112.
- Gouda, M.K. 2006. Optimization and purification of alkaline protease produced by marine *Bacillus* sp. MIG newly isolated from eastern harbor of Alexandria. *Polish Journal of Microbiology* 55: 119-126.
- Jin, H., Liu, R. and He, Y. 2012. Kinetics of batch fermentations for ethanol production With immobilized *Saccharomyces cerevisiae* growing on sweet sorghum stalk juice. *Procedia Environmental Science* 12: 137-145.
- Klinklai, W., Kawahara, S., Mizumo, T., Yoshizawa, M., Sakdapipanich, J.T., Isono, Y., and Ohno, H. 2003. Depolymerization and ionic conductivity of enzymatically deproteinized natural rubber having epoxy group. *European Polymer Journal* 39: 1707-1712.
- Ma, L., Chen, L., Jia, W., Zhang, D. and Chen, S. 2013. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology* 166: 192-197.
- Moon, S-H and Parulekar, S.J. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch culture of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 467-483.
- Mosavian, M.T.H., Sargolzaei, J., Tabandeh, F., Moghaddam, H.R.H. and Yakhchali, B. 2012. Examining kinetic parameters of fermentation process and batch cultures on the production of alkaline protease. *African Journal of Biotechnology* 11: 6335-6344.
- Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.
- Pichayakorn, W., Suksaeree, J. and Taweepreda, W. 2014. Improved deproteinization process for protein-free natural rubber latex. *Advanced Material Research* 844: 474-477.
- Rajoka, M.I., Ahmed, S., Hashmi, A.S. and Athar, M. 2011. Production of microbial biomass protein from mixed substrates by sequential culture fermentation of *Candida utilis* and *Brevibacterium lactofermentum*. *Ann Microbiol* DOI 10.1007/s13213-011-0357-8

- Roychoudhury, S., Parulekar, S.J., Weigand, W.A. 1988. Cell Growth and  $\alpha$ -amylase production characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnol Bioeng* 33: 197-206.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy: historical perspective. *Methods* 27: 3-9.
- Tabandeh, F., Moghaddam, H.R.H., yakhchali, B., Shariati, P., Mousavian, M.T.H. and Ghasemi, F. 2011. Fed-batch fermentation of *Bacillus clausii* for efficient production of alkaline protease using different feeding strategies. *Chemical Engineering Community* 198: 1063-1074.
- Truscott, W. 2002. Glove powder reduction and alternative approaches. *Methods* 27: 69-76.
- Verbelen, P.J., Schutter, D.P.D., Delvaux, F., Verstrepen, K.J. and Delvaux, F.R. 2006. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters* 28: 1515-1525.
- Wang, F-S., Li, C-C., Lin, Y-S. and Lee, W-C. 2013. Enhanced ethanol production by continuous fermentation in a two-tank system with cell recycling. *Process Biochemistry* 48: 1425-1428.
- Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Khongbantad, W., Niamsup, P. and Lumyong, S. 2012. Screening and selection of *Bacillus* spp. for fermented corticate soybean Meal production. *Journal of Applied Microbiology* 113, 798-806.
- Yeang, H.-Y. 2004. Natural rubber latex allergen: new developments. *Current Opinion In Allergy and Clinical Immunology* 4: 99-104.
- Yeang, H.Y., Arif, S.R.M., Yudof, F., and Sunderasan, E. 2002. Allergenic proteins of Natural rubber latex. *Methods* 27: 32-45.

## โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10  
เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา

Purification and characterization of protease from *Bacillus subtilis* MR10 for  
degradation of allergenic protein in rubber latex

## บทสรุปรายงานสำหรับผู้บริหาร

**ชื่อโครงการ** การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา  
Purification and characterization of protease from *Bacillus subtilis* MR10 for degradation of allergenic protein in rubber latex

### ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาติชาย โชนงนุช  
หน่วยงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร  
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ที่อยู่ 155 หมู่ 2 ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100  
โทรศัพท์ 053-948261 โทรสาร 053-948206  
E-mail chartchai.k@cmu.ac.th

### นักศึกษา/ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล นายกวีวัฒน์ บุญคาน  
หน่วยงาน สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร  
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ที่อยู่ 155 หมู่ 2 ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100  
โทรศัพท์ 053-948261 โทรสาร 053-948206  
E-mail kawewat\_plug@hotmail.com

งบประมาณทั้งโครงการ 475,200 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2557 ถึง 30 พฤศจิกายน 2558

## หลักการและเหตุผล

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ส่วนใหญ่น้ำยางจะถูกแปรรูปเป็นบล็อกหรือแผ่นยางสำหรับส่งออกไปยังประเทศในเอเชีย เช่น จีน มาเลเซีย และญี่ปุ่น สำหรับเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ลูกโป่ง ถุงมือ ถุงยางอนามัย จุกนมทารก และสายสวนปัสสาวะ ซึ่งใช้น้ำยางเป็นสารตั้งต้น ปัจจุบันราคาน้ำยางลดลงเมื่อเทียบกับไม่กี่ปีที่ผ่านมา เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ที่ทำจากยางจึงจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพยิ่งขึ้น ซึ่งในน้ำยางมีโปรตีนจำนวนมากที่สามารถทำให้เกิดโรคมุมิแพ้กับคนที่ใช้ผลิตภัณฑ์ยางได้โดยเฉพาะถุงมือยาง การแพ้ยางได้รับการจัดอันดับว่าทำให้เกิดอาการอักเสบของผิวหนัง ระคายเคือง และเกิดภูมิแพ้ที่เป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์ (Sussman et al., 2002) ดังนั้นกระบวนการที่สำคัญในการแปรรูปยาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์คือ การกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ งานวิจัยรายงานว่าโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในซีรัมยางสามารถกำจัดโดยแอมโมเนีย แต่วิธีนี้อาจกระทบกับคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำยาง (Perrella และ Gaspari, 2002) การศึกษาก่อนหน้านี้มีพบว่าโปรตีนเอสหายจาก *Bacillus subtilis* MR10 สามารถย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางได้ อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนของเอนไซม์และกลไกการทำงานของโปรตีนดังกล่าว มีการศึกษาศึกษาการเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *B. subtilis* MR10 เพื่อใช้ย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนภายใต้โครงการ “การคัดเลือกโปรตีนเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027)” และ “การเตรียมโปรตีนเอสในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยางสด (สัญญาเลขที่ RDG5350029)” พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสในรูปแบบผงที่สะดวกต่อการเก็บรักษาและใช้งานได้ ทั้งยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในน้ำยางพาราสดได้ ดังผลการศึกษาจากโครงการ “การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045)” แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีความหลากหลาย ทั้งในแง่ของโครงสร้างและความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ แม้ว่าเอนไซม์โปรตีนเอสหายจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 จะแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ได้ แต่เพื่อให้การนำเอนไซม์โปรตีนเอสมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดว่าเอนไซม์ที่ *B. subtilis* MR10 มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาอย่างไร รวมทั้งต้องทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อการยืนยันความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา

ผู้วิจัยคาดว่า การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์หายไปได้ไปใช้ประโยชน์ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ และสามารถใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาล้างพารา

## ผลการดำเนินงาน

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 โดยการตกตะกอนเอนไซม์โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแบบลำดับส่วน (salt fractionation) พบกิจกรรมของเอนไซม์ปริมาณมากกว่า 70% สามารถตกตะกอนในช่วง 40-80% เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี โดย เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-Sephadex C-50) และเจลฟิลเตรชัน (Sephacryl S-100) ตามลำดับ สามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ได้สำเร็จตามเป้าหมาย ซึ่งยืนยันได้จากผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดย SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรติเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรติเอส 2 (P2) เอนไซม์บริสุทธิ์ P1 และ P2 มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3950 และ 3238 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

โปรติเอส P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์โปรติเอส P1 และ P2 มีความเสถียรที่ช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรติเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของโลหะ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ของเอนไซม์บริสุทธิ์โปรติเอส P1 และ P2 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เช่นเดียวกับโปรติเอสหยาบที่ผลิตจาก *B. subtilis* MR10

จากผลการศึกษาที่ได้รับในครั้งนี้ เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอสเพื่อผลิตน้ำยาล้างพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ โดยเพื่อประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดของเอนไซม์นั้น กระบวนการผลิตจำเป็นต้องถูกกำหนดไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์และหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น

## สรุปผลการวิจัย

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% ตามด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-Sephadex C-50) และเจลฟิลเทรชัน (Sephacryl S-100) ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรตีเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรตีเอส 2 (P2) เอนไซม์บริสุทธิ์ P1 และ P2 มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 3,950 และ 3,238 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์โปรตีเอส P1 และ P2 มีความเสถียรในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรตีเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของโลหะ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 เอนไซม์โปรตีเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เช่นเดียวกับโปรตีเอสหยาบ เอนไซม์บริสุทธิ์ทั้งสองชนิดสามารถย่อยหรือกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราดิบได้เหมือนกัน

## ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

มีข้อเสนอแนะว่าในการเตรียมเอนไซม์จากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เพื่อจะนำเอนไซม์ไปใช้งานจริง หากสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ P1 ออกมามากกว่า P2 ก็จะเป็นสิ่งที่ดี เพราะเอนไซม์ P1 มีความเสถียรและไม่เสียสภาพเมื่อมีไอออนโลหะ  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  และ  $Ag^+$  หรือหากต้องการให้แบคทีเรียสามารถผลิต P1 ได้มากเป็นกรณีพิเศษอาจต้องเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ในการเพิ่มปริมาณการผลิต ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ

## ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิชาการเรื่อง “Capability of purified protease from *Bacillus subtilis* MR10 in rubber allergic protein degradation”

## บทคัดย่อ

*Bacillus subtilis* MR10 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทยและมีรายงานว่าสามารถผลิตโปรตีนโอไลติกเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง โปรตีนเอสหยาบที่ผลิตโดย *B. subtilis* MR10 สามารถย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราได้ ทำให้เกิดแนวความคิดในการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราดีก่อนการนำไปแปรรูป การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีนเอสสามารถทำบริสุทธิ์ได้โดยเริ่มจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-Sephadex C-50) และเจลฟิลเทรชัน (Sephacryl S-100) ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรตีนเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรตีนเอส 2 (P2) เอนไซม์บริสุทธิ์ P1 และ P2 มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3950 และ 3238 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ P1 และ P2 เสถียรในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรตีนเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของโลหะ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 เอนไซม์โปรตีนเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เช่นเดียวกับโปรตีนเอสหยาบ

## ABSTRACT

*Bacillus subtilis* MR10 isolated from Tua-nao, a traditional Thai fermented soybean food, was previously reported to be highly produced proteolytic enzymes. Crude protease from *B. subtilis* MR10 could degrade allergenic proteins in rubber latex serum and it was proposed to be used in allergenic proteins removal from rubber latex before processing. Proteases from *B. subtilis* MR10 was purified by ammonium sulphate precipitation, ion exchange chromatography (CM-Sephadex C-50) and gel filtration (Sephacryl S-100) techniques, respectively. It was found that crude protease was consisted of two proteases, Protease 1 (P1) and Protease 2 (P2). The purified P1 and P2 had a specific activity 3950 and 3238 U/mg protein, with a purification fold of 26.6 and 21.8, respectively. The molecular weights of P1 and P2 were approximately 45 and 30 kDa. The optimal pH for the P1 and P2 activity was 9.0 and 8.0 while the optimal temperatures were 45-55 and 45-50°C, respectively. P1 and P2 were stable at pH range of 5.0-10.0 and 7.0-10.0, respectively. Kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of P1 were 8.0 mg·ml<sup>-1</sup> and 3840 µg·ml<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> respectively, while those of P2 were 13.8 mg·ml<sup>-1</sup> and 5302 µg·ml<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. Two proteases showed the same in substrate specific against casein. In addition, Ag<sup>+</sup> and Hg<sup>2+</sup> were found to inhibit the enzyme activity of P1, while Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, EDTA and SDS were found to inhibit the enzyme activity of P2. Both P1 and P2 proteases demonstrated the capability to degrade allergenic protein as found in crude enzyme.

## บทนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ส่วนใหญ่น้ำยางจะถูกแปรรูปเป็นบล็อกหรือแผ่นยางสำหรับส่งออกไปยังประเทศในเอเชีย เช่น จีน มาเลเซีย และญี่ปุ่น สำหรับเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ลูกโป่ง ถุงมือ ถุงยางอนามัย จุกนมทารก และสายสวนปัสสาวะ ซึ่งใช้น้ำยางเป็นสารตั้งต้น ปัจจุบันราคาน้ำยางลดลงเมื่อเทียบกับไม่กี่ปีที่ผ่านมา เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ที่ทำจากยางจึงจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพยิ่งขึ้น ซึ่งในน้ำยางมีโปรตีนจำนวนมากที่สามารถทำให้เกิดโรคมุมิแพ้กับคนที่ใช้ผลิตภัณฑ์ยางได้โดยเฉพาะถุงมือยาง การแพ้ยางได้รับการจัดอันดับว่าทำให้เกิดอาการอักเสบของผิวหนัง ระบายเคือง และเกิดภูมิแพ้ที่เป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์ (Sussman et al., 2002) ดังนั้นกระบวนการที่สำคัญในการแปรรูปยาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์คือ การกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ งานวิจัยรายงานว่าโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในซีรัมยางสามารถกำจัดโดยแอมโมเนีย แต่วิธีนี้อาจกระทบกับคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำยาง (Perrella และ Gaspari, 2002) การศึกษาก่อนหน้านี้มีพบว่าโปรตีนเอสหายจาก *Bacillus subtilis* MR10 สามารถย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางได้ อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนของเอนไซม์และกลไกการทำงานของโปรตีนดังกล่าว มีการศึกษาศึกษาการเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *B. subtilis* MR10 เพื่อใช้ย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนภายใต้โครงการ “การคัดเลือกโปรตีนเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027)” และ “การเตรียมโปรตีนเอสในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยางสด (สัญญาเลขที่ RDG5350029)” พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสในรูปแบบผงที่สะดวกต่อการเก็บรักษาและใช้งานได้ ทั้งยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในน้ำยางพาราสดได้ ดังผลการศึกษาจากโครงการ “การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045)” แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีความหลากหลาย ทั้งในแง่ของโครงสร้างและความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ แม้ว่าเอนไซม์โปรตีนเอสหายจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 จะแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ได้ แต่เพื่อให้การนำเอนไซม์โปรตีนเอสมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดว่าเอนไซม์ที่ *B. subtilis* MR10 มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาอย่างไร รวมทั้งต้องทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อการยืนยันความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา

ผู้วิจัยคาดว่า การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จะเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์หายไปได้ไปใช้ประโยชน์ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ และสามารถใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาล้างพารา

## การทบทวนเอกสาร

### 1. เอนไซม์โปรติเอสและตัวอย่างงานวิจัยการศึกษาสมบัติของโปรติเอสจากแหล่งต่างๆ

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์เชิงเทคนิค (Technical enzyme) ที่มีสัดส่วนการนำมาใช้งานสูงที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์อื่นๆ โดยคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (Uhlir, 1998; Sumatha et al., 2006) ทั้งยังจัดเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่จากธรรมชาติซึ่งทำหน้าที่ย่อยโปรตีนอีกด้วย (Muhammad et al., 2011) หากจะแบ่งโปรติเอสออกเป็นกลุ่มตามลักษณะการแตกพันธะเปปไทด์แล้ว ก็อาจจะได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Exopeptidase และ Endopeptidase ทั้งนี้เอนไซม์กลุ่ม Endopeptidase พบว่ามีความสำคัญต่อภาคอุตสาหกรรมมากกว่า (Sumatha et al., 2006) นอกจากนี้ยังอาจแบ่งโปรติเอสได้ตามหมู่ประจุ pH ที่เหมาะสมในการทำงาน (acidic, neutral, alkaline) สับสเตรทที่จำเพาะ (เช่น collagenase, keratinase, elastase เป็นต้น) หรือการแบ่งตามบริเวณเร่ง (Active site) รวมถึงความไวต่อตัวยับยั้งชนิดต่างๆ ซึ่งอันหลังนี้สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ Serine protease, Sulfhydryl protease, metal-containing protease และ acid protease (ปราณี, 2543) สมบัติของโปรติเอสแต่ละกลุ่มแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงคุณลักษณะของโปรติเอสทั้ง 4 กลุ่ม

กลุ่ม	EC No.	MW (kDa)	Opt. pH	Opt. Temp.	Metal ion requirement	AA. at active site	inhibitor
Aspartic or carboxyl proteases	3.4.23	30-45	3-5	40-55	Ca <sup>2+</sup>	Aspartate or cysteine	Pepstatin
Cysteine or thiol proteases	3.4.22	34-35	2-3	40-55	-	Aspartate or cysteine	Indoacetamide, p-CMB
Metallo proteases	3.4.24	19-37	5-7	65-85	Zn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Phenylalanine or leucine	EDTA, EGTA
Serine proteases	3.4.21	18-35	6-11	50-70	Ca <sup>2+</sup>	Serine, histidine, aspartate	PMSF, DIFP, EDTA, soybean trypsin inhibitor, phosphate buffer, indole, phenol

ที่มา: Sumatha et al., 2006.

## โปรตีนจากพืช

เราสามารถพบเอนไซม์โปรตีนในพืชหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นมะละกอ (Papain) สับปะรด (Bromelain) มะเดื่อ (Ficin) และกีวี (Actinidin) เป็นต้น โดยในปี 2008 Devaraja และคณะ ได้รายงานสมบัติของ Aspartic protease ที่พบในยางของ *Ficus racemosa* (L.) ซึ่งเป็นพืชตระกูลมะเดื่อชนิดหนึ่ง เอนไซม์ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับการอิ่มตัว 80% (4 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำมาผ่าน Size exclusion chromatography (BioSep-SEC-S2000 column) แล้วนำแต่ละ fraction มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย Amicon Ultra centrifugal filter (10000 Da cutoff) ก่อนที่จะนำมาผ่าน DEAE-Sephadex A-50 column ที่ชะด้วย 0-0.5 M NaCl ก็จะได้โปรตีนที่บริสุทธิ์ โปรตีนจากแหล่งนี้พบว่า มีขนาดโมเลกุลที่  $44,500 \pm 500$  Da มีค่า optimal pH อยู่ในช่วงค่อนข้างกว้างคือ 4.5-6.0 มีค่า optimal temperature อยู่ที่  $60 \pm 0.5$  °C และเป็นเอนไซม์ที่ทนร้อน เอนไซม์ชนิดนี้จะถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์โดยสาร Pepstatin-A

เอนไซม์ปาเปนจากยางมะละกอก็เป็นโปรตีนอีกชนิดที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดย Uhlig (1998) รายงานว่าปาเปนมีขนาดโมเลกุลประมาณ 21,000 Da โครงสร้างเป็น Polypeptide ขนาดยาว 159 หน่วย ในจำนวนนี้มี cystein bridges 3 จุด จึงมีหมู่ SH ที่ง่ายต่อการทำปฏิกิริยาต่อออกซิเจนและโลหะหนัก ดังนั้นการที่จะให้ปาเปนทำงานได้อย่างเต็มที่นี้ จึงจำเป็นต้องมีการเติมสารกลุ่ม reducing agent หรือสารประกอบที่จับโลหะหนักด้วย ปาเปนมีค่า pI อยู่ในช่วง 8.5-9 ส่วน pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 6.5-7.8 สามารถทนความร้อนได้ถึงระดับอุณหภูมิ 60-70°C ตัวยับยั้งที่สำคัญคือ oxidizing agent ต่างๆ  $H_2O_2$   $O_2$  และโลหะหนัก ( $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) ในปี 2006 Nitsawang และคณะ ได้นำเสนอเทคนิคใหม่ในการทำเอนไซม์ปาเปนให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Aqueous two-phase extraction ในระบบที่ประกอบด้วย polyethylene glycol ความเข้มข้น 8% (w/v) และแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 15% (w/v) เทคนิคนี้ใช้เวลาสั้นและมีประสิทธิภาพมากกว่าเทคนิคเดิมที่เรียกว่า two-step salt precipitation

เอนไซม์แอกตินินจากกีวีได้ถูกศึกษาสมบัติและนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยเนื้อและตกตะกอนน้ำมันเพื่อทำเนยแข็ง (Ha et al., 2012; Piero et al., 2011; Alirezaei et al., 2011) โดยพบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์จากน้ำกีวีที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (80% Sat.) ผ่าน anion-exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-25) ที่ชะด้วย NaCl เข้มข้น 0-1 M อัตราการไหล 1 ml/min จากนั้นวิเคราะห์ผลการทำบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE จะสามารถทำงานได้ดีในการกระตุ้นการจับตัวของน้ำมันที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส Piero และคณะ (2011) นำเสนอวิธีการทำแอกตินินให้บริสุทธิ์ที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพด้วยการนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose CL6B แล้วชะด้วย NaCl เข้มข้น 0-2 M จากนั้นแต่ละ fraction ที่พบกิจกรรมของแอกตินินก็จะถูกนำมารวมกัน แล้วจึงตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (75% Sat.) เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้นี้ พบว่ามีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 24 kDa มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 6.5 และ 55 องศาเซลเซียส

ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษานี้ก็แสดงว่าแอกติตินินนี้เหมาะสมที่นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งได้

เอนไซม์โบรมิเลนจากสับประรดสามารถพบได้ทั้งในส่วนเนื้อ จุก และแกน ซึ่งเอนไซม์โบรมิเลนนี้มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกันไปตั้งแต่ 20-38 kDa ค่า pI อยู่ในช่วง 4.5-10 และสามารถทำงานได้ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหารได้ ซึ่งมีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง (Chaurasiya and Hebbar, 2013; Amid et al., 2011) กระบวนการสกัดและทำโบรมิเลนให้บริสุทธิ์นี้ ก็ได้มีผู้เสนอไว้หลากหลายวิธี ยกตัวอย่างเช่น การใช้เทคนิค Reverse micellar extraction (RME) ร่วมกับการตกตะกอนสามารถทำให้โบรมิเลนบริสุทธิ์ขึ้น 3.96 เท่า และเกี่ยวกับเอนไซม์ได้ 78.90% (Chaurasiya and Hebbar, 2013) ในขณะที่ Soares และคณะ (2012) เสนอเทคนิคการทำให้โบรมิเลนจากเศษสับประรดบริสุทธิ์ขึ้นด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอล เริ่มต้นเอนไซม์หยาบของโบรมิเลนจะถูกเตรียมขึ้นด้วยการกรองและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง จากนั้นจะนำมาตกตะกอนด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 30 และ 70% ตามลำดับ ก็จะได้โบรมิเลนที่บริสุทธิ์ขึ้น 2.28 เท่า

### โปรติเอสจากฟังไจ

ฟังไจเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ และมีการผลิตเอนไซม์จากแหล่งนี้เพื่อการค้าแล้วเช่นกัน แต่โปรติเอสจากฟังไจต่างสายพันธุ์ก็มีสมบัติที่แตกต่างกัน ดังเช่นรายงานของ Kudryavtseva และคณะ (2008) ที่สรุปสมบัติด้านต่างๆ ของโปรติเอสจาก Xylotrophic basidiomycetes สายพันธุ์ต่างๆ ไว้ดังตารางที่ 13

**ตารางที่ 13** แสดงสมบัติของโปรติเอสจาก Xylotrophic basidiomycetes บางสายพันธุ์

สปีชีส์	เอนไซม์	MW (kDa)	pI	pH range of stability	Optimal temperature
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	endoprotease	40	5.6	-	-
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	Proteinase I	28	4.7	-	-
	Proteinase II	26	4.2	-	-
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Protease	32	4.0	-	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	Aspartyl proteinase	36	-	3.2-5.2	52
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull)	Aspartyl proteinase	50	3.5	-	>35
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Fr.)	Subtilisin-like	75	4.5	-	-
	serine protease (PoS1)				

ที่มา: Kudryavtseva et al., 2008.

เชื้อราบางชนิดใช้ในการผลิตอาหารสำหรับมนุษย์และระหว่างการผลิตของจะสร้างโปรตีนเอสซีนมาด้วย ยกตัวอย่างเช่น *Rhizopus oryzae* ซึ่งจากกระบวนการทำโปรตีนเอสให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนเป็นส่วนๆ ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต Ion exchange chromatography และ size-exclusion chromatography แล้ว ก็พบว่าได้โปรตีนเอสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 91 เท่า (เก็บเกี่ยวได้ 26%) โปรตีนเอสที่จากเชื้อนี้เป็นชนิด Extracellular aspartate protease มีขนาดโมเลกุลประมาณ 35 kDa อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียสและ 5.5 ตามลำดับ เอนไซม์เสถียรได้ดีที่อุณหภูมิและ pH ในช่วง 30-45 องศาเซลเซียส 5.5-7.5 ตามลำดับ เท่านั้น มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 5 mg/ml และสามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดย pepstatin ในขณะที่สามารถถูกกระตุ้นการทำงานได้ 250 เท่าเมื่อมี  $Ca^{2+}$  ในปฏิกิริยา (Kumar et al., 2005)

การทำบริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของ Serine protease จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ได้ถูกศึกษาโดย Hernández-Martínez และคณะ (2011) การทำให้บริสุทธิ์นั้นประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ การผ่านคอลัมน์ High Q (anion chromatography) ที่ชะด้วย NaCl เข้มข้น 0-3 M แล้วนำมาผ่านคอลัมน์เดิมอีกครั้งแต่ชะด้วย NaCl เข้มข้น 0-2 M จากนั้น fraction ที่มีกิจกรรมจะถูกนำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกไปด้วยการปั่นเหวี่ยง ส่วนที่เหลือจะถูกนำไปผ่านคอลัมน์ High S Bio-Rad® (cation exchange chromatography) ซึ่งชะด้วย NaCl เข้มข้น 0-3 M โปรตีนเอสชนิดนี้ เป็นเอนไซม์ทนร้อน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.8 เท่า มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 88 kDa ทำงานได้ดีที่ pH 7 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นโมเลกุลแบบ monomeric enzyme และมีค่า half life ณ อุณหภูมิ 50, 60, 70 องศาเซลเซียส อยู่ที่ 65, 34, 14 นาทีตามลำดับ ทำให้เห็นว่าเอนไซม์แหล่งนี้ทนร้อนได้ดี จึงอาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่มีความร้อนมาเกี่ยวข้องได้

อีกหนึ่งงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพื่อใช้เป็นข้อมูลตัดสินใจนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม คืองานวิจัยของ Niyonzima และ More (2014) ที่พบว่าโปรตีนเอสจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* gr. เหมาะที่จะนำมาผสมในสารซักล้างได้ โดยผู้วิจัยได้ทำโปรตีนเอสให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่างๆ เอนไซม์หายาบที่ผลิตขึ้นจะถูกตกตะกอนด้วยอะซิโตนเย็น (-20 องศาเซลเซียส) และเก็บตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง ตะกอนที่ได้จะนำมาละลายกลับใน Tris-HCl buffer (pH 9.0) แล้วนำมาผ่าน affinity chromatography ชนิด agarose-bound lectins ซึ่งใช้ concanavalin A เป็นลิแกนด์ โปรตีนเอสชนิดนี้เป็น Alkaline protease โมเลกุลเป็นแบบ monomeric enzyme น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16 kDa ทำงานได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 8-12 แต่ได้ดีที่ pH 11 เอนไซม์สามารถเสถียรได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถูกกระตุ้นการทำงานได้เมื่อมี  $Ca^{2+}$  และ  $Mg^{2+}$  แต่ถูกยับยั้งด้วย  $Hg^{2+}$  ค่า  $V_{max}$  และ  $K_m$  เท่ากับ 12.8 U/ml และ 5.4 mg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มี Tween-80, Triton-100 และ SDS จะสามารถทำงานได้ดีขึ้น และยังคงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อมี  $H_2O_2$  และ NaClO สภาวะเหล่านี้พบได้ในสารซักล้าง ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าจะสามารถนำเอนไซม์โปรตีนเอสจากแหล่งนี้มาประยุกต์ใช้ในสารซักล้างได้

### โปรติเอสจากแบคทีเรีย

เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียจีส *Bacillus* sp. ก็ได้ถูกศึกษากันอย่างมากมาย เพื่อนำข้อมูลมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น alkaline protease จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* CN2 ที่พบว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นส่วนผสมในสารซักล้าง เนื่องจากทำงานได้ดีที่อุณหภูมิต่ำและทนต่อสาร SDS โปรติเอสนี้ยังทำงานได้ดีที่ pH 7.0-11.0 และอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่กว้างมาก ขนาดโมเลกุลของโปรติเอสก็ได้ถูกศึกษา โดยมีขนาด 27.636 kDa ข้อมูลเหล่านี้ล้วนมาจากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่างๆ เสียก่อน (Uchida et al., 2004) ผลงานลักษณะเดียวกันนี้ก็ได้ถูกศึกษาโดย Nascimento and Martins (2006) ซึ่งได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอาโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. ที่แยกมาจากดินประเทศบราซิลมาใช้ในผงซักฟอก ในการนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผล  $\text{CaCl}_2$   $\text{MgSO}_4$  glycine surfactant และ oxidizing agent บางชนิด ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าโปรติเอสยังคงเหลือกิจกรรม 95 และ 74% เมื่อถูกบ่มใน glycine ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ร่วมกับ  $\text{MnSO}_4$  และ  $\text{CaCl}_2$  ตามลำดับ EDTA ที่ใช้ในระดับต่างๆ ตั้งแต่ 1.0-5.0 mM ไม่มีผลต่อโปรติเอส แต่ Triton X -100 มีผลยับยั้งการทำงานของโปรติเอส

Serine protease จาก *Bacillus laterosporus*-AK1 ก็เป็นอีกหนึ่งชนิดที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาผสมในผงซักฟอกยี่ห้อ Aril และจากผลการทดสอบประสิทธิภาพก็พบว่าสามารถกำจัดคราบเลือดได้อย่างสมบูรณ์ เอนไซม์ดังกล่าวถูกตกตะกอนด้วยอะซิโตนเข้มข้น 70% แล้วผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 gel filtration และ DEAE cellulose ion-exchange chromatography เมื่อศึกษาสมบัติแล้วพบว่ามีย่านน้ำหนักโมเลกุล 86.29 kD ทำงานได้ดีที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และในสภาพที่มี  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  (Arulmani et al., 2007)

ในขณะที่ Asker และคณะ (2013) ได้ทำโปรติเอสจาก *Bacillus megaterium* ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (60% Sat.) จากนั้นนำมาผ่าน 2 คอลัมน์ ได้แก่ DEAE-cellulose chromatography และ Sephadex G-200 chromatography แล้ววิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์ จึงพบว่าโปรติเอสชนิดนี้เป็นเอนไซม์ทนร้อนและมี 2 ชนิด (P1 และ P2) แต่ละชนิดมีขนาดโมเลกุล 28 และ 25 kDa ตามลำดับ โมเลกุลโปรตีนประกอบไปด้วยกรดแอสพาทิกและเซอรัลีนเป็นจำนวนมาก เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ pH 7.5 แต่ก็ยังคงสภาพได้เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงถึง 80 องศาเซลเซียสและ pH 7.0-8.0 ด้วยสมบัติเหล่านี้ ผู้วิจัยจึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการกำจัดขนบนหนังสัตว์ (Deharing)

## 2. เทคนิคการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ มีการประยุกต์ใช้เทคนิคต่าง ๆ มากมาย ซึ่งในการทำเอนไซม์หลายชนิดสามารถแยกออกจากโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่เซลล์ของจุลินทรีย์สร้างขึ้นก็จะใช้เทคนิคที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้เพราะธรรมชาติของเอนไซม์จะมีความแตกต่างกันออกไป

### 2.1 การตกตะกอนโปรตีน

การตกตะกอนหรือที่เรียกว่า “ Precipitation “ เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตกตะกอนโปรตีนและสารในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสามารถทำได้ทั้งในระดับเล็กๆในห้องปฏิบัติการจนถึงการเก็บเกี่ยวผลผลิตในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม การตกตะกอนโปรตีน โดยหลักการแล้วจะเกิดเนื่องจากการรบกวนความสามารถในการละลายของโปรตีนในสารละลายโดยปัจจัยภายนอกที่เราเพิ่มหรือเติมเข้าไป ปัจจัยภายนอกดังกล่าว เช่น การตกตะกอนด้วยเกลือ (salt precipitation) ตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) สารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่มีประจุ (Non-ionic polymer) การเปลี่ยนค่า pH ของสารละลาย หรือ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นต้น ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถใช้วิธีตกตะกอนได้หลายวิธีคือ

#### 2.1.1 การตกตะกอนด้วยเกลือ (Salt precipitation)

การตกตะกอนด้วยเกลือเป็นการเติมเกลือลงในสารละลายเอนไซม์แล้ว ทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์เกิดการตกตะกอน สาเหตุของการตกตะกอนเนื่องมาจากสารละลายเกลือที่เติมเข้าไปเกิดการแตกตัวเป็นไอออนแล้วเข้าจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งเป็นสารที่มีประจุเหมือนกับทำให้ประจุรวมของโมเลกุลที่เกิดจากการรวมตัวของเอนไซม์กับไอออนของเกลือเป็นศูนย์ หรือไม่มีประจุ (neutralization) ส่งผลให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง เกิดการรวมตัวกันเองของโมเลกุลของเอนไซม์และตกตะกอนในที่สุด ปรากฏการณ์เช่นนี้เราเรียกว่า “Salting out effect” ชนิดของเกลือที่นิยมใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ) โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ) และโซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) เป็นต้น เกลือโซเดียมซัลเฟตมีค่าการละลายอิมิตัว 1.88 M ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในขณะที่เกลือ โซเดียมคลอไรด์มีค่าการละลายอิมิตัวประมาณ 5.33 M ที่ 20 องศาเซลเซียส ส่วนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าการละลายอิมิตัวประมาณ 4 M ที่ 0-25 องศาเซลเซียส ในบรรดาเกลือที่ใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์ แอมโมเนียมซัลเฟตได้รับความนิยมมากที่สุด ทั้งนี้เพราะมีข้อได้เปรียบหลายประการ คือ ที่สภาวะอิมิตัวของการละลาย สามารถตกตะกอนโปรตีนได้ดีมาก ยังคงมีความสามารถในการละลายสูงที่อุณหภูมิต่ำในช่วง 0-4 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นข้อดีเพราะการทำงานเกี่ยวกับโปรตีนหรือเอนไซม์โดยทั่วไป จะกระทำที่อุณหภูมิต่ำๆ ค่าการละลายอิมิตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0 องศาเซลเซียส การละลายน้ำเกิดความร้อนน้อยเมื่อเทียบกับเกลือชนิดอื่นๆ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ สามารถป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนได้

อย่างไรก็ตามข้อด้อยที่พบคือ เนื่องจากความสามารถในการตกตะกอนโปรตีนดีมาก ทำให้โปรตีนเกือบทุกชนิดตกตะกอนที่สภาวะสารละลายอิมิตัว ดังนั้นความบริสุทธิ์ของโปรตีนเมื่อเทียบกับการตกตะกอน (purification folds) มีค่าไม่สูงมากนัก ปกติจะมีค่าประมาณ 2-5 เท่า การแก้ไขข้อบกพร่องนี้สามารถทำได้ขึ้นด้วยวิธีการที่เรียกว่า “ Salt fractionation of enzyme protein “

การทำ Salt fractionation ดังได้เกริ่นไว้แล้วในเรื่องข้อด้อยของการตกตะกอนเอนไซม์เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตว่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ใดเมื่อเทียบกับก่อนการตกตะกอนมีค่าไม่มาก ปกติแล้วความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เราจะพิจารณาค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ซึ่งหมายถึงค่ากิจกรรมเอนไซม์ในสารละลายต่อปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม ดังนั้นในการตกตะกอนเอนไซม์ หากมีโปรตีนชนิดอื่นๆปะปนเข้ามาเยอะก็ทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าต่ำลง หลักการทำการก็คือการตกตะกอนเอนไซม์โปรตีนด้วยเกลือเป็นช่วงๆ แล้วแยกตะกอนที่เกิดขึ้นมาตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ว่าส่วนใหญ่ของกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วงใดของการตกตะกอน การตกตะกอนด้วยเกลือวิธีนี้จะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

### 2.1.2 การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent precipitation)

เป็นการตกตะกอนเอนไซม์หรือโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายรวมกับน้ำได้ หรือที่เรียกว่า miscible organic solvent ตัวทำละลายอินทรีย์กลุ่มนี้ได้แก่ อะซิโตน (acetone) เอทานอล (ethanol) เมทานอล (methanol) และ บิวทานอล (butanol) เหล่านี้เป็นต้น หลักการตกตะกอนของโปรตีนก็เช่นเดียวกับ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว สามารถละลายในน้ำได้ จะแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำและในขณะเดียวกันก็มีส่วนในการทำให้โมเลกุลของโปรตีนซึ่งปกติเป็นโมเลกุลที่มีประจุ กลายเป็นกลาง (neutralized protein) ส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันเองแล้วตกตะกอน วิธีการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เหล่านี้ ทำได้โดยการค่อยๆ เติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่แช่เย็นแล้ว ลงในสารละลายเอนไซม์ที่แช่เย็นแล้วเช่นกัน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลที่ 0°C ประมาณ 15 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ 5000 g นาน 15 นาที Wen และคณะ (1998) ได้ทำการตกตะกอนเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Trichosporon cutaneum* SL409 โดยการเติมเอทานอลที่ทำให้เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2.5 ลิตรลงในสารละลายเอนไซม์ 20 ลิตร จากนั้นนำไปเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ 12000 g 10 นาที ข้อควรระวังในการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวเช่น อะซิโตนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ค่อนข้างแรง ละลายน้ำแล้วเกิดความร้อนขึ้น (heat generation) ซึ่งอาจทำให้เกิดการเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงในสารละลายเอนไซม์จึงต้องทำอย่างระมัดระวัง ทั้งในเรื่องของอุณหภูมิและการผสมกันของตัวทำละลายอินทรีย์กับสารละลายเอนไซม์

### 2.1.3 การตกตะกอนโดยการความร้อน และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง

ในการใช้ความร้อนเพื่อตกตะกอนนั้น ความจริงแล้วไม่ใช่วิธีตกตะกอนเพื่อแยกเอาโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีนที่เราต้องการออกมาแต่จะเป็นการตกตะกอนเพื่อแยกเอาโมเลกุลของโปรตีนชนิดอื่นออกจากเอนไซม์ เพราะเราทราบกันดีว่าความร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน โดยเฉพาะโปรตีนที่ไม่ทนต่อความร้อน เมื่อได้รับความร้อน จะทำให้โครงร่างโปรตีน (Conformation) เสียไป กลายเป็นสายโพลีเปปไทด์ และตกตะกอนออกมาในที่สุด การเสียสภาพของโปรตีนโดยความร้อนนั้นจะคล้ายกันกับลักษณะไขขาวก่อนต้มกับภายหลังการต้มให้สุก ดังนั้นการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อนจึงมีข้อจำกัดในการใช้ โดยใช้ได้เฉพาะกับโปรตีนที่ทนอุณหภูมิสูงเท่านั้น เช่น การทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ฟอสฟาเตสจากจุลินทรีย์ทนร้อน *Thermotoga neapolitana* ซึ่งใช้วิธีให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนหรือทำลายโปรตีนอื่นที่ไม่ทนร้อน เป็นต้น

ในกรณีของการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยกรด อาศัยหลักการที่ประจุรวมบนโมเลกุลของโปรตีนจะมีค่าเป็น 0 โปรตีนอยู่ในสารละลายที่ค่า pH เท่ากับค่า pI ณ จุดที่เราเรียกว่า Isoelectric point ดังนั้นเราสามารถปรับ ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายโปรตีน หลากๆค่า โปรตีนหลากหลายชนิดที่ละลายปะปนกันอยู่ จะค่อยๆ แยกตกตะกอนออกจากกันได้ เช่นเดียวกับการทำ Salt fractionation ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายโปรตีนไม่ควรใช้กรดหรือด่างแก่ เพราะจะทำให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ที่เราต้องการได้ กรดหรือด่างที่นิยมใช้เช่น Tris-acetate (สำหรับ pH 5-5.8) lactic acid (สำหรับ pH < 5) Diethanolamine (สำหรับ pH 7-9) และ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (สำหรับ pH 10.5) เป็นต้น

### 2.1.4 การตกตะกอนด้วยสารโม่เลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่มีประจุ (Non-ionic polymer precipitation)

การตกตะกอนด้วยสารโม่เลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่มีประจุที่มีรายงานคือการใช้ polyethylene-imine และ polyethylene glycol แต่ที่กล่าวถึงกันมากคือ การตกตะกอนด้วยโพลีเอธิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ซึ่งถูกเสนอเป็นครั้งแรกในปี 1964 โดย Polson และคณะ PEG เป็นสารที่มีโม่เลกุลขนาดใหญ่มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 36 หลักการของการตกตะกอนโปรตีนในละลายของ PEG สามารถอธิบายได้ว่า ความมีขั้วของ PEG อันเนื่องมาจาก OH group ทำให้ PEG สามารถละลายน้ำได้ และในขณะเดียวกัน ความมีขั้วของ PEG จะทำให้ PEG สามารถจับกับโปรตีนได้ และจากโครงสร้างของ PEG ซึ่งมี OH group ทั้ง 2 ข้าง ยังสามารถทำให้เกิดการเชื่อมไขว้ (cross-linking) ระหว่างโม่เลกุลของโปรตีนสองสาย ทำให้เกิดเป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดใหญ่และเกิดการตกตะกอนในที่สุด จากผลการศึกษาพบว่าค่า PEG โดยค่า pH และ Ionic strength มีผลน้อยมากขนาดของ PEG ที่นิยมใช้คือ PEG<sub>4000</sub>-PEG<sub>6000</sub>



ภาพที่ 36 แสดงโมเลกุลของโพลีเอทิลีนไกลคอล

ที่มา : <http://paxgroup.com/paxchem/images/polyethyleneglycol11.jpg>

ข้อดีของการตกตะกอนด้วย PEG สามารถสรุปได้ดังนี้ คือ (1) ไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของ เอนไซม์หรือโปรตีน ไม่ว่าจะเป็นที่ความเข้มข้นของ PEG สูงๆ หรือที่อุณหภูมิที่แตกต่างไปจากสภาวะปกติก็ตาม (2) ใช้เวลาในการตกตะกอนน้อย (3) ในขณะที่มีการเติมลงในสารละลายมีการเปลี่ยนแปลง อุณหภูมิน้อยมาก (4) ไม่เป็นสารพิษหรือเป็นสารที่ติดไฟง่าย เช่นเดียวกับสารที่ใช้ตกตะกอนชนิดอื่นๆ เช่น อะซิโตน เอทานอล เป็นต้น (5) ภายหลังการตกตะกอนสามารถแยกออกได้ง่าย ส่วนข้อด้อยของการตกตะกอนด้วย PEG นั้น จากแหล่งข้อมูลที่พยายามรวบรวม ยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับข้อด้อยของการตกตะกอนด้วย PEG แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลว่ามีการใช้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรม เหตุผลน่าจะเนื่องมาจากต้นทุนเรื่องราคาของ PEG

## 2. 2. เทคนิคทางโครมาโตกราฟี

### 2.2.1 โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange chromatography)

โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ เป็นโครมาโตกราฟีที่ถือว่าธรรมดาที่สุดในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ การแยกโปรตีนหรือเอนไซม์โดยวิธีนี้อาศัยคุณสมบัติการมีประจุบนโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งเป็นผลมาจากกรดอะมิโนซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนหรือเอนไซม์นั่นเอง แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากโปรตีนมีคุณสมบัติเป็น Switterion ซึ่งมีประจรรวมบนโมเลกุลเป็นบวกหรือเป็นลบก็ได้ ขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายที่โปรตีนหรือเอนไซม์นั้นละลายอยู่ เช่นเดียวกับโปรตีนทั่วไป เอนไซม์ทุกชนิดจะมีค่า Isoelectric point หรือเรียกสั้นๆว่า pI ซึ่งหมายถึง ค่า pH ที่ทำให้ประจรรวมบนโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 0 โดยถ้าหาก pH มากกว่า pI ประจรรวมบนโมเลกุลของโปรตีนจะมีค่าเป็นลบ และในทางกลับกันหากค่า pH ต่ำกว่า pI ประจรรวมบนโปรตีนก็จะมีค่าเป็นบวก โดยหลักการแล้วโปรตีนจะถูกชะผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ โดยโปรตีนที่มีประจุเป็นลบจะจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุที่มีประจุเป็นบวก และในทางตรงข้ามโปรตีนที่มีประจุบวกก็จะจับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุที่เป็นลบ โปรตีนส่วนที่ไม่จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ (unbound protein) จะถูกชะออกจากคอลัมน์โดยสารละลายบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นจะทำการชะโปรตีนโดยใช้ บัฟเฟอร์ที่มี Counter ion ผสมอยู่ Counter ion จะมีความสามารถในการแย่งกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ ทำให้เอนไซม์เป้าหมายหลุดออกมา

ชนิดของตัวกลางและเปลี่ยนประจุสามารถแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1. ตัวกลางและเปลี่ยนประจุลบ (anion exchanger) เป็นสารตัวกลางที่ประจุเป็นบวก ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติที่จะจับกับโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีประจุรวมเป็นลบ ชนิดของตัวกลางแลกเปลี่ยนชนิดนี้ เช่น Diaminoethyl-cellulose (DEAE-cellulose) และ DEAE-Sephadex เป็นต้น
2. ตัวกลางและเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger) เป็นสารตัวกลางที่ประจุเป็นลบ ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติที่จะจับกับโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีประจุรวมเป็นบวก ชนิดของตัวกลางแลกเปลี่ยนชนิดนี้ เช่น Carboxymethyl-cellulose (CM-cellulose) และ CM-Sephadex เป็นต้น

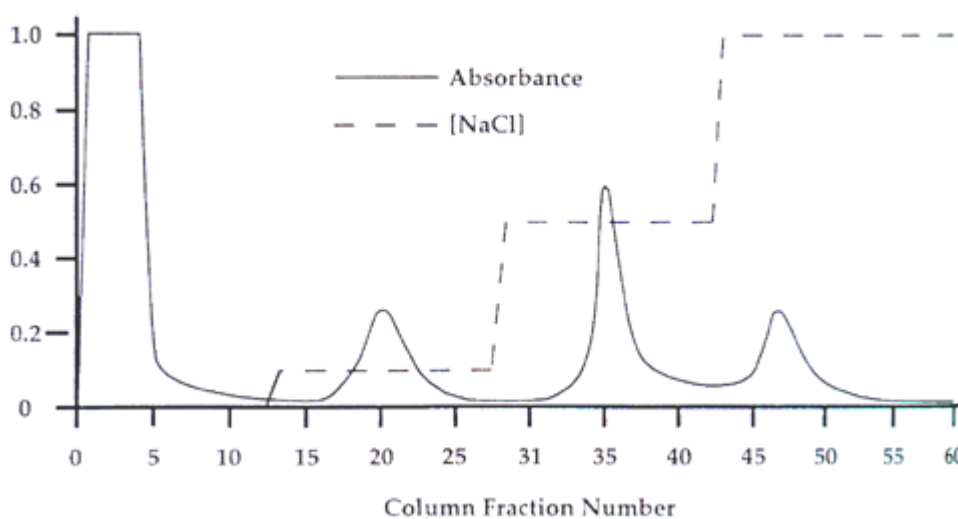
เอนไซม์จะถูกชะโดยบัฟเฟอร์ที่มี counter ion ผสมอยู่ ซึ่งมีมากมายหลายชนิด โปรตีนที่จับบน DEAE จะถูกชะโดย counter ion ที่มีประจุลบ เช่น  $\text{Cl}^-$  และ  $\text{PO}_4^{3-}$  เป็นต้น และในทำนองเดียวกัน โปรตีนที่จับบน CM จะถูกชะโดย counter ion ที่มีประจุบวก เช่น  $\text{Na}^+$   $\text{NH}_4^+$  และ  $\text{K}^+$  เป็นต้น ความแรงหรือความสามารถในการแย่งจับของ counter ion จะแตกต่างกันไป แล้วแต่ชนิดของ counter ion ความแรงของ counter ion สามารถลำดับได้ดังนี้

Anion exchange:  $\text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$

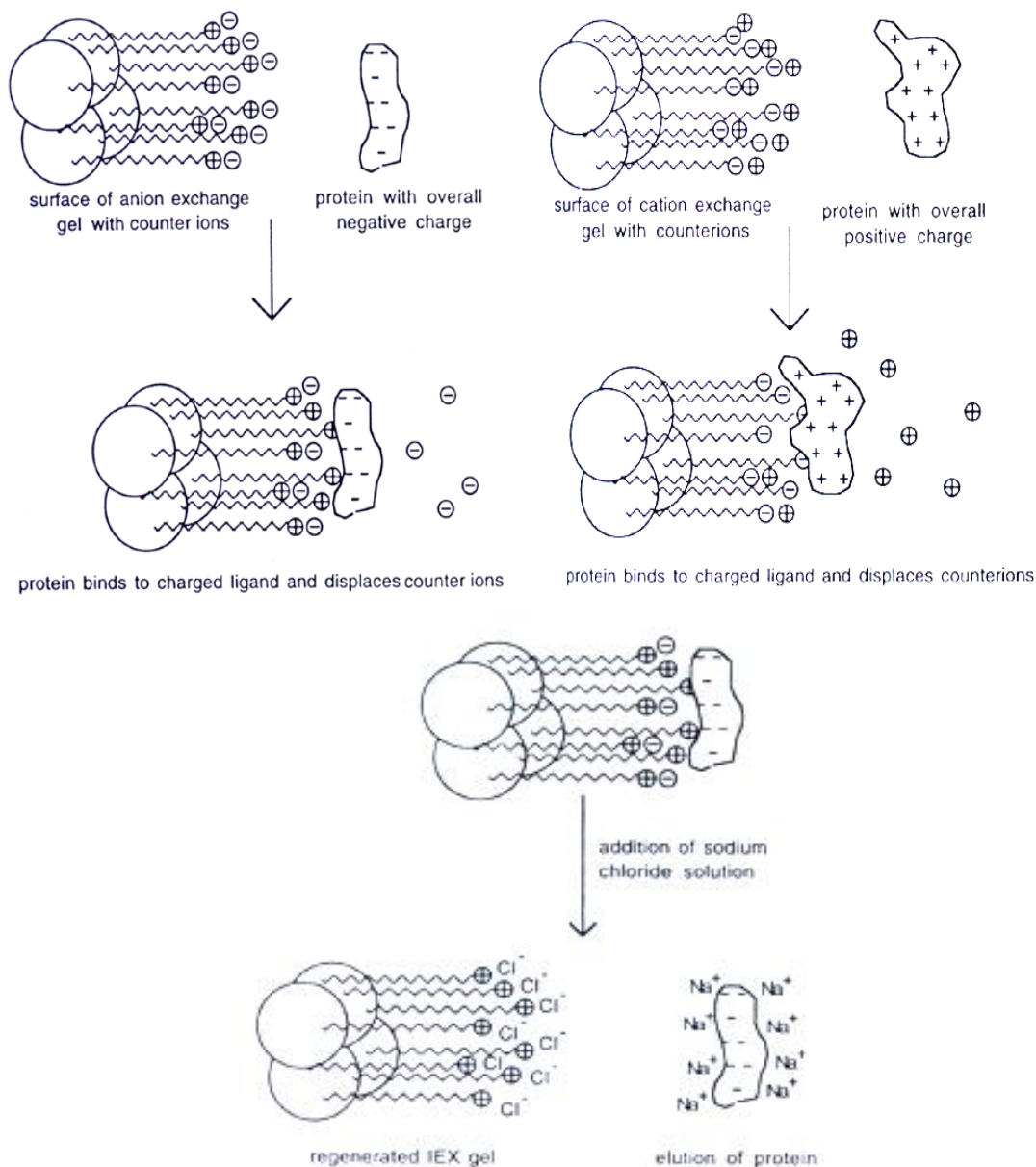
Cation exchange:  $\text{I}^- > \text{NO}_3^- > \text{PO}_4^{3-} > \text{CN}^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{HCO}_2^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$

รูปแบบของการชะ สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

1. การชะแบบ Step gradient
2. การชะแบบ Linear gradient



ภาพที่ 37 แสดงหลักการชะแยกโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีความแรงของประจุต่างกัน โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

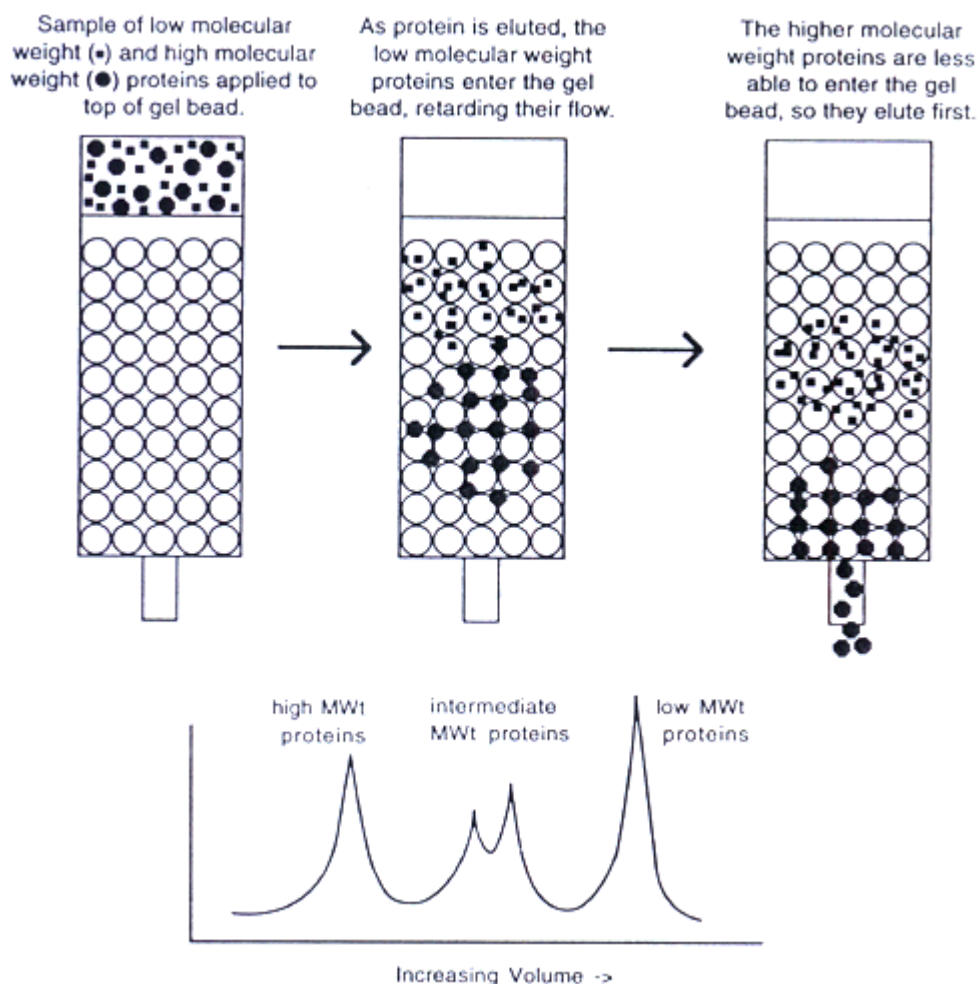


ภาพที่ 38 แสดงหลักการจับและการถูกชะโดย counter ion ของสารตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ  
ที่มา : Burden and Whitney, 1958

### 2.2.2 เจลฟิวเตรชั่น (gel filtration)

เจลฟิวเตรชั่น เป็นโครมาโตกราฟีที่สามารถแยกโมเลกุลของโปรตีนหรือเอนไซม์ โดยใช้ความแตกต่างของขนาดโมเลกุล (Molecular weight) จึงทำให้มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Molecular sieve chromatography โดยหลักการแล้วจะอาศัยการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ผ่านเจลที่มีลักษณะรูพรุน

เอนไซม์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ขนาดของรูพรุนจะไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปภายในรูพรุนของเจลได้ ดังนั้นจึงไหลผ่านช่องว่างระหว่างเม็ดเจล จึงทำให้สามารถเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์ได้เร็วกว่า โปรตีนที่มีขนาดเล็ก ซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในรูพรุน ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ช้ากว่า (แสดงในภาพที่ 39) โดยหลักการนี้ทำให้สามารถแยกโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีขนาดใหญ่ออกจากโปรตีน หรือสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กได้

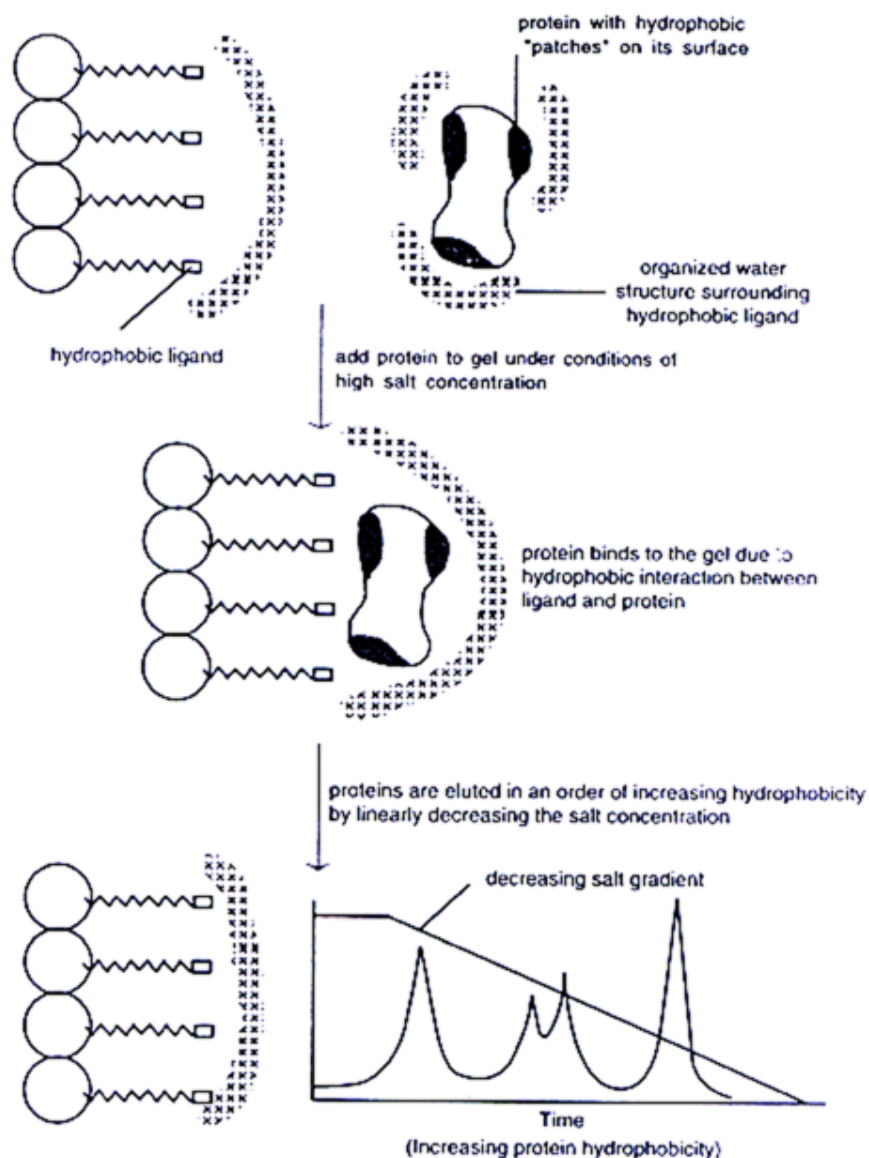


ภาพที่ 39 แสดงหลักการแยกโปรตีนหรือเอนไซม์ขนาดต่างกัน โดยเจลฟิวเตรชั่น  
ที่มา : Burden and Whitney, 1958

### 2.2.3 ไฮโดรโฟบิกโครมาโตกราฟี (Hydrophobic chromatography)

เป็นโครมาโตกราฟีอีกเทคนิคหนึ่ง ที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการของการเกิด repulsion ระหว่างสารประกอบที่ไม่มีขั้ว (non-polar compound) และสภาพแวดล้อมที่เป็น Polar environment เช่น น้ำ เป็นต้น เมื่อเราเติม single Hydrophobic compound ลงไป จะเกิดแรงกระทำทำให้โมเลกุลของน้ำเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และทำให้เกิดช่องว่าง เพื่อทำให้เกิดการลด entropy ดังนั้นเมื่อเติมสารที่เป็น non-polar compounds ลงไปในน้ำ ก็จะทำให้เกิดการจับกลุ่มโดย

อัตราโนมิติ เนื่องมาจากแรง Hydrophobic interaction (แสดงหลักการทำงานของ hydrophobic chromatography ในภาพที่ 5

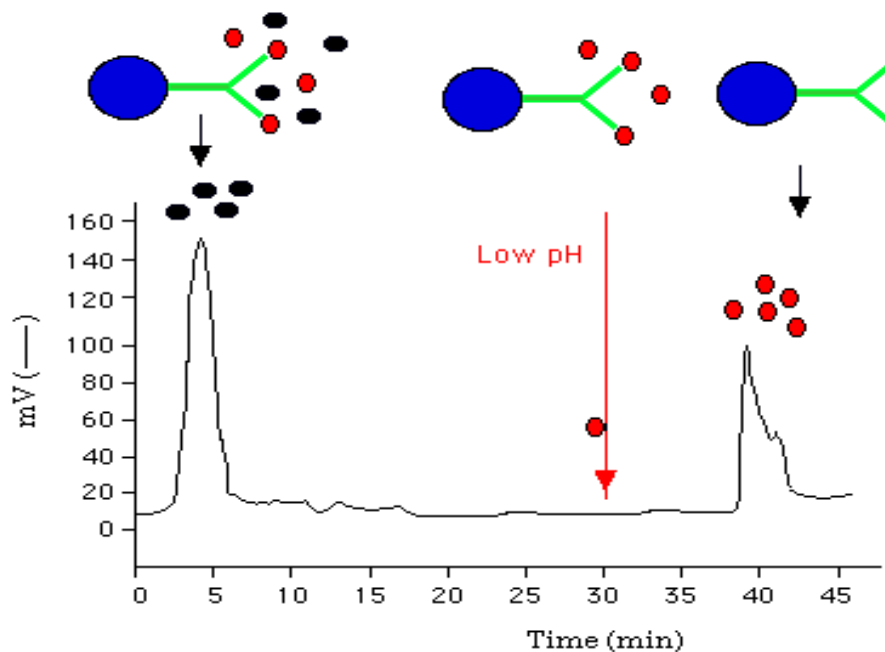


ภาพที่ 40 แสดงหลักการแยกโปรตีนหรือเอนไซม์โดย Hydrophobic chromatography

ที่มา : Burden and Whitney, 1958

#### 2.2.4 อффินิตีโครมาโตกราฟี (Affinity chromatography)

เป็นโครมาโตกราฟีที่มีความสามารถในการแยกโมเลกุลของโปรตีนสูงมาก ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าโปรตีนมีคุณสมบัติทั้งทางเคมีและชีวภาพ หลักการอาศัยความสามารถในการจับกันอย่างเฉพาะเจาะจงระหว่างโปรตีนและเอนไซม์



ภาพที่ 41 ความสัมพันธ์ระหว่างการแยกโปรตีนด้วย Affinity chromatography และ Elution profile

### 3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์

ภายหลังการผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์หลายๆขั้น สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ได้ โดยวิธีที่นิยมมากที่สุดคือการทำ SDS-PAGE

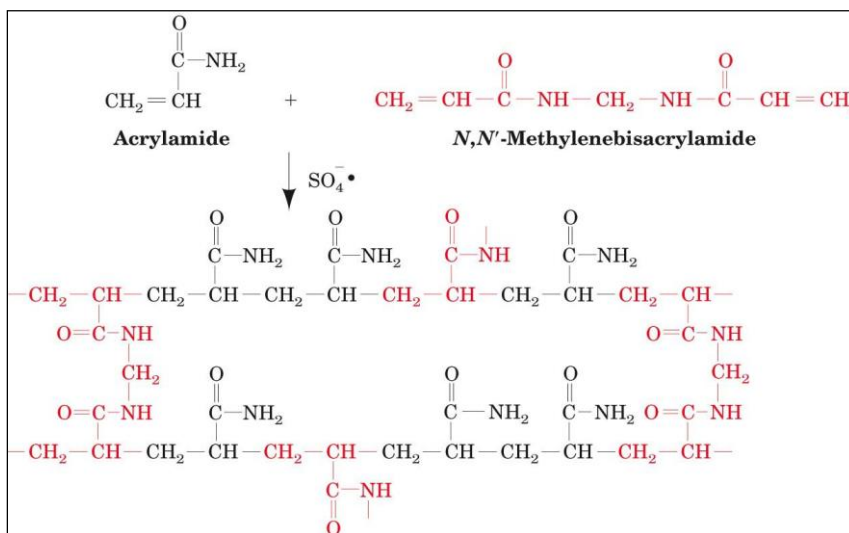
#### 3.1 SDS-PAGE

มีชื่อเต็มว่า Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide electrophoresis เป็นวิธีการหนึ่งในการวิเคราะห์โปรตีน เพื่อเปรียบเทียบ หรือศึกษาวิเคราะห์ และที่สำคัญสามารถบอกความบริสุทธิ์ของโปรตีนชนิดนั้นได้

อาศัยหลักการทำให้โมเลกุลของโปรตีนผ่านสารตัวกลางที่เป็น polyacrylamide gel โดยมีการใช้กระแสไฟฟ้าช่วย โปรตีนจะเคลื่อนที่เพราะแรงทางไฟฟ้า ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน โปรตีนขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ Laemmli (1970) เป็นบุคคลแรกที่มีการประยุกต์ใช้ SDS กับ polyacrylamide gel electrophoresis SDS จะจับกับส่วนที่เป็น Hydrophobic part ของโปรตีน แล้วทำให้โปรตีนคลายตัวกลายเป็นเส้นตรง ดังนั้นความยาวของโปรตีนจะแปรตรงกับขนาดของโมเลกุล

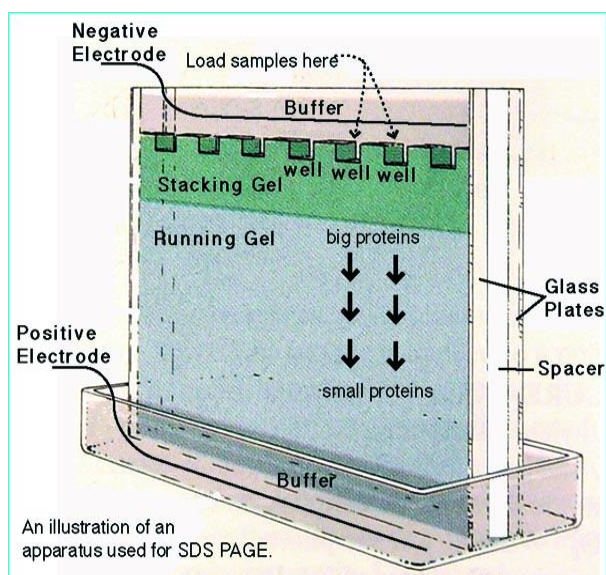
### 3.2 Polyacrylamide gel

Polyacrylamide gel เป็นเจลที่เกิดจากการ copolymerization ของ acrylamide monomer ( $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) และ N, N - methylene bis crylamide ( $\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} - \text{CH} = \text{CH}_2$ ) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น cross linking agent การเกิดโพลีเมอร์จะถูกกระตุ้นโดย Free radical ที่เกิดจาก ammonium persulfate (initiator) และมี Tetramethyl ethylene diamine (TEMED) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 42 แสดงส่วนโครงสร้างของโพลีอะคริลเอไมด์ (A) และลักษณะการเกิดการ Cross-linking ของ acrylamide และ N, N'-methylene-bis-acrylamide (B)

ที่มา : <http://web.siumed.edu/~bbartholomew/images/chapter6/F06-19.jpg>



ภาพที่ 43 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดย SDS-PAGE

ที่มา: [http://web.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse\\_Information/4581/techniques/gel\\_elect/gel.jpg](http://web.chemistry.gatech.edu/~williams/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/gel.jpg)

#### 4. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (ปราณี, 2543; พัทธา, 2541)

แม้เอนไซม์จะสามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมีให้เร็วขึ้น และบางครั้งอัตราเร็วของปฏิกิริยาอาจจะสามารถเพิ่มขึ้นได้ถึง กว่า  $10^8$ - $10^{10}$  เท่า เมื่อเทียบกับปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ แต่เอนไซม์คือโปรตีน จึงมีข้อจำกัดหลายประการในการทำงาน กล่าวคือเมื่อใดก็ตามที่โครงสร้าง (Conformation) ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปหรือเกิดการเสียสภาพ (Denaturation) ก็จะทำให้รูปร่างบริเวณแอคทีฟไซต์เปลี่ยนไปด้วยเช่นกัน ดังนั้น ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ก็จะลดลง โดยปัจจัยที่ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปนี้ได้แก่

##### 4.1 ความร้อน (Heat)

โดยปรกติแล้วเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้แก่ปฏิกิริยาเคมี ก็พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยามักจะเพิ่มขึ้น ซึ่งรวมถึงปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ด้วย เนื่องจากความร้อนจะช่วยให้สารตั้งต้นมีพลังงานสูงขึ้น และเพียงพอที่จะอยู่ในสภาวะเปลี่ยน (Transition state) เพื่อเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ได้เร็วขึ้น แต่เนื่องจากเอนไซม์มีโครงสร้างมาจากสายของโปรตีน (Polypeptide) ที่มีวนพับเป็นก้อน (Globular protein) ซึ่งความร้อนที่มากเกินไปจะทำให้ก้อนโปรตีนนี้เกิดการคลายตัว ดังนั้นบริเวณแอคทีฟไซต์จะมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไป จึงไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อีกต่อไป เรียกว่าเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ (Denature) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์แต่ละชนิดสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์จากแบคทีเรียบางชนิดสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 72 องศาเซลเซียสได้ กล่าวคือเอนไซม์แต่ละชนิดมีโครงสร้างที่สามารถทนต่อความร้อนได้แตกต่างกัน

##### 4.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การเปลี่ยนแปลงของค่า pH มีผลต่อประจุรวมบนโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งรวมไปถึงประจุบริเวณร่องแอคทีฟไซต์ด้วย เมื่อประจุเปลี่ยนแปลงไป ก็จะทำให้โครงสร้างของก้อนโปรตีนเกิดความเสียหายเช่นเดียวกัน ผลที่ตามมาจึงคล้ายกับกรณีของผลกระทบจากความร้อน

##### 4.3 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate concentration)

อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์อยู่จะขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารตั้งต้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เพราะเอนไซม์สามารถจับกับสารตั้งต้นและเร่งปฏิกิริยาได้มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นจนถึงจุดหนึ่งแล้ว กลับพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์มีจำนวนจำกัด ดังนั้นอัตราการเร่งปฏิกิริยาจึงยังคงเท่าเดิมแม้จะเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นเข้าไปอีกก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าบางครั้ง หากเพิ่มปริมาณ

สารตั้งต้นเข้าไปมากเกินไป ก็จะเป็นการขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลงได้

#### 4.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ (Enzyme concentration)

สามารถอธิบายได้เช่นเดียวกับผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้น คือเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์แล้ว อัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มขึ้นได้ แต่ถ้ามีเอนไซม์มากเกินไป ก็อาจจะขัดขวางการทำงานกันเอง ทำให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาลดลง

#### 4.5 โคแฟกเตอร์ (Cofactor)

เอนไซม์หลายชนิด มีโครงสร้างที่ยังไม่พร้อมที่จะทำงานได้ จำเป็นต้องอาศัยโมเลกุลอื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนมาเข้าร่วมเพื่อให้สามารถทำงานได้ โมเลกุลที่กล่าวถึงนี้เรียกว่า โคแฟกเตอร์ ยกตัวอย่างเช่น Fe, Zn, Mn, Cu และ วิตามิน เช่น ไบโอดีน ไบโอฟลาวิน และกรดโฟลิก เป็นต้น กรณีของโคแฟกเตอร์ที่มีโครงสร้างเป็นสารอินทรีย์ (เช่น วิตามินต่างๆ) เราจะเรียกว่า โคเอนไซม์ (Coenzyme)

#### 4.6 ตัวยับยั้ง (Inhibitor)

สารบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายกับสารตั้งต้นของเอนไซม์ จึงสามารถเข้าจับบริเวณแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกัน ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นเพื่อเร่งปฏิกิริยาผลิตผลิตภัณฑ์ได้อัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะลดลงหรืออาจไม่เกิดเลยก็เป็นได้ เรียกสารดังกล่าวว่า “ตัวยับยั้ง” หรือบางครั้ง ตัวยับยั้งก็ไม่จำเป็นต้องมีรูปร่างคล้ายกับสารตั้งต้นเสมอไป แต่สามารถเข้าจับเอนไซม์ที่บริเวณอื่นๆ ส่งผลให้รูปร่างแอคทีฟไซต์เปลี่ยนแปลงไป และเอนไซม์ก็จะไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้อีก

### 5. จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (ที่มา: [lms.mju.ac.th/courses/909/locker/บทที่%205.doc](https://lms.mju.ac.th/courses/909/locker/บทที่%205.doc))

จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์หมายถึง การศึกษาเกี่ยวกับความเร็วของปฏิกิริยาโดยรวมกลไกในการทำงานของเอนไซม์และปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา อัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาดังเช่นภาพที่ 44 จะพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรทในระยะเริ่มต้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อถึงความเข้มข้นของซับสเตรทระดับหนึ่งจะได้อัตราเร็วสูงสุด ( $V_{max}$ ) และหากเพิ่มปริมาณซับสเตรทต่อไปอีกอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่จะไม่เพิ่มขึ้นดังกราฟภาพที่ 44 ทั้งนี้ ความสัมพันธ์ในรูปกราฟไฮเพอร์โบลานี้ ปฏิกิริยาในสมการที่ 1 อธิบายได้ว่า การรวมตัวระหว่างซับสเตรทและเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนนั้น เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับและเกิดอย่างรวดเร็วได้ ต่อมามีการเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์เกิดปฏิกิริยาช้ากว่าในขั้นตอนแรก

จากความสัมพันธ์ในการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวมิเคลิส (Michaelis) และเมนเทน (Menten) ได้เขียนความสัมพันธ์เป็นสมการมิเคลิส-เมนเทน ได้ดังนี้คือ

$$V_o = \frac{V_{max} [S_o]}{K_m + [S_o]} \quad (1)$$

$V_o$  = อัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้น

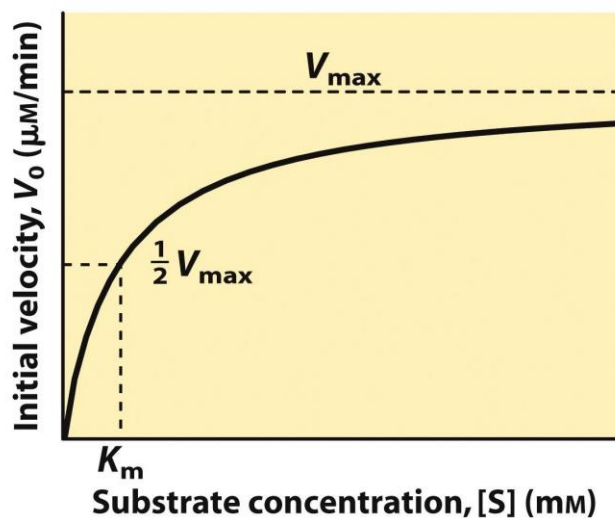
$V_{max}$  = อัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อเอนไซม์จับตัวกับซับสเตรทจนอิ่มตัว

ค่าคงที่ของ Michaelis ซึ่งกรณีของการเกิดปฏิกิริยาดังสมการที่ 1 จะมีค่าเท่ากับ

$$K_m = (k_{-1} + k_2/k_1)$$

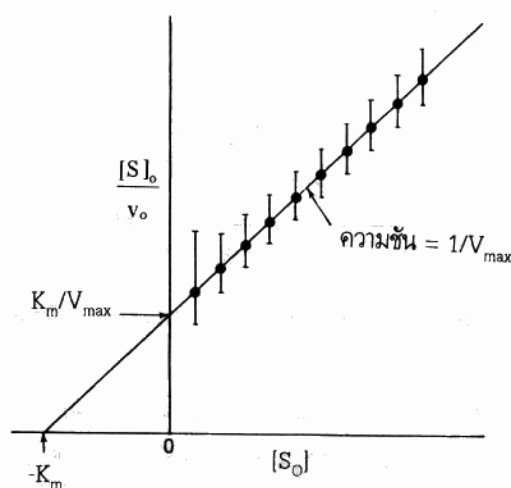
$[S_o]$  = ความเข้มข้นของซับสเตรทเริ่มต้น

ต่อมาได้มีการปรับปรุงกราฟไฮเพอร์โบล่า ให้เป็นกราฟเส้นตรง แบบของไลน์วีเวอร์-เบอร์ค (Lineweaver Berk) หรือแบบของ เฮนส์-วูล์ฟ (Hane Woolf) เพื่อสะดวกในการประเมินค่าความเร็วสูงสุด และค่า  $K_m$  ซึ่งแบบแรกนั้นเป็นกราฟระหว่างค่า  $1/V_o$  และ  $1/S_o$  ต้องเลือกใช้ช่วงความเข้มข้นของซับสเตรทใกล้เคียงกับค่า  $K_m$  คือประมาณ 0.33-2.0  $K_m$  ทั้งนี้เพราะถ้าใช้ความเข้มข้นที่มีค่าสูงเมื่อเทียบกับค่า  $K_m$  จะได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าความชันเกือบเท่าศูนย์ ทำให้ได้  $K_m$  ที่คลาดเคลื่อน ส่วนกราฟเส้นตรงแบบของเฮนส์-วูล์ฟ ดังภาพที่ 45 เป็นกราฟระหว่างค่า  $[S_o]/V_o$  และค่า  $[S_o]$  ซึ่งจะดีกว่ากราฟของไลน์วีเวอร์-เบอร์ค ตรงที่ค่าผิดพลาดของ  $[S_o]/V_o$  จะสะท้อนถึงความผิดพลาดของ  $V_o$  อย่างแท้จริงไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้นของซับสเตรทต่ำหรือสูงก็ตาม โดยดูได้จากขนาดของบาร์ (bar l) ที่แสดงในรูปในการทำกราฟชนิดนี้ต้องเลือกใช้ความเข้มข้นของซับสเตรทเช่นเดียวกัน เพราะถ้าใช้ซับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับค่า  $K_m$  จะได้กราฟที่เกือบอยู่ในแนวนอน แต่ถ้าซับสเตรทมีความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับค่า  $K_m$  จะได้กราฟเส้นตรงที่ตัดแกนทั้งสอง ตรงบริเวณที่ใกล้จุดเริ่มต้น (origin)



ภาพที่ 44 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรทและอัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยาในปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์

ที่มา : <http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=10984>



ภาพที่ 45 กราฟของเฮนส์-วูลฟ์ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $[S]_0/V_0$  กับ  $[S]_0$  บาร์ (l) แทนขนาดของความผิดพลาดของ  $V_0$  ที่มีค่าเท่ากับ  $\pm 0.05 V_{\text{max}}$

ที่มา : พัชรา, 2541.

## วัสดุและอุปกรณ์

### 1. เชื้อจุลินทรีย์

*Bacillus subtilis* MR10

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient broth ยี่ห้อ Himedia®

### 3. น้ำยาอาหาร

น้ำยาอาหารชั้น 60% DRC ชนิด high ammonia

### 4. สารเคมี

	ยี่ห้อ
Casein from bovine milk	FLUKA
Albumin from chicken white egg	SIGMA
Tyrosine	MERCK
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	SCHARLUA
Trichloroacetic acid (CCl <sub>3</sub> COOH)	MERCK
Sodium carbonate (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	MERCK
Folin-ciocalteau reagent	MERCK
Sodium hydroxide (NaOH)	J.T BAKER
Copper sulphate (Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	AJAX
Potassium sodium tartrate tetra hydrate (NaKC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O)	MERCK
Ammonium sulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	MERCK
HCl	LAB SCAN
Sodium Dodecyl Sulfate	BIO BASIC
Tris	Research Organics
Skim milk	MERCK
Aluminium sulphate octadecahydrate	Loba
Ethanol	Merck
Folin-ciocalteau's phenol	Merck
Glycerol	Carlo Erba

Hydrochloric acid	Carlo Erba
Methanol	Loba
Sodium hydroxide	Merck
Sodium carbonate	Merck
Sodium potassiumtartrate	Fisher
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck
GBX DEV/REPL	Kodax
GBX Fix/REPL	Kodax

## 5. อุปกรณ์

## ยี่ห้อ

เครื่องเขย่าชนิดแบบควบคุมอุณหภูมิได้	RATEK
ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar airflow)	FLUFRANCE
ตู้อบเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator)	MEMERT
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ	HETTICH ZENTRIFUGER
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	SPECTRONIC GENESYS 5
เครื่องกวนสารแบบใช้ความร้อน (Hot plate stirrer)	CLIFTON CERASTIR
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	BINDER
เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	VORTEX GENIC 2
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	MEMMERT
เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)	DURA-DRY
เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator)	BU CHI
Biofermentor 20 ลิตร	NALGENE
ถังหมัก stirred tank bioreactor ขนาด 50 ลิตร	Applicon
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml	PYREX
หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 ml	CORNING
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	PYREX
ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 500 ml, 1000 ml	DURAN
กระบอกตวง (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 ml, 500 ml, 1000 ml	PYREX
หลอดทดลอง (Test tube)	PYREX
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)	AMERSHAM

## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย และการผลิตเอนไซม์

เตรียมกล้าเชื้อโดยการถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 จาก stock culture ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร NB หรือสูตรกากถั่วเหลืองปรับปรุง ปริมาตร 3.5 ลิตรที่บรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีของไพโรจน์ (2552) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียครบ 24 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวผลผลิตเอนไซม์โดยการเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของสารละลายใสเพื่อตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และใช้เป็นเอนไซม์หยาบในการทดลองขั้นต่อไป

### 2. ศึกษาการทำ Salt fractionation (Deutscher, 1990)

นำส่วนของสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้วมาศึกษาถึงการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความเข้มข้นอิมิตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-40, 40-60, 60-80% แยกตะกอนด้วยการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากนั้นนำไปทำไดเอไลซิสเพื่อกำจัดเกลือออกจากสารละลายเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 จนกว่าจะเกิดสมดุลระหว่างเอนไซม์และบัฟเฟอร์ ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของแต่ละช่วงการตกตะกอน คัดเลือกช่วงของการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำให้ได้ปริมาณค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด

### 3. การทำบริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) (Deutscher, 1990)

เตรียมคอลัมน์ที่บรรจุ CM-sephadex C-50 ที่ทำให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 จากนั้นผ่านเอนไซม์เข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที โซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ ความเข้มข้น 0.1-0.5 โมลาร์ สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ ขั้นตอนนี้จะเก็บเอนไซม์ในหลอดๆ ละ 20 มิลลิลิตร ซึ่งนับเป็น 1 แฟร็กชัน (fraction) เพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) แล้วสร้างโครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนและค่า A280 กับจำนวนแฟร็กชัน ทำการรวมแฟร็กชันที่มีพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเข้าด้วยกัน และทำการกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ด้วยวิธีการผ่านเยื่อกรองขนาด 10 กิโลดาลตัน และล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม โดยเอนไซม์ที่สนใจจะไม่สามารถผ่านเยื่อกรองได้ ด้วยวิธีนี้จะทำให้

เอนไซม์มีความเข้มข้นขึ้นและสามารถลดความเข้มข้นของเกลือได้ นำเอนไซม์ที่เข้มข้นแล้วผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-100 ทำให้สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 และค่อยๆ ชะเอาโปรตีนอื่นออก รวมถึงเอนไซม์โปรตีนเอสด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จนกว่าจะพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เทคนิคนี้จะเก็บสารละลายที่ชะออกมาแฟร็กชันละ 2 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) แล้วสร้างโครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสและค่า A280 กับจำนวนแฟร็กชัน พร้อมกับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในแต่ละแฟร็กชันด้วยใช้ SDS-PAGE

#### 4. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดย Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ใช้วิธีของ Kanpiengjai และคณะ (2015) โดยใช้เจลอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 12% ในการแยกชนิดและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน

#### 5. ศึกษาสมบัติของเอนไซม์

##### 5.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรม (พีเอช 7.5 เวลา 10 นาที) โดยใช้อุณหภูมิ 20-65 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ค่าร้อยละกิจกรรมสัมพันธ์ (% relative activity) อุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น 100% สำหรับผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ สามารถทำได้โดยการนำเอนไซม์บ่มที่อุณหภูมิ 20-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นภายใต้อุณหภูมิน้ำแข็งแล้วจึงวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมที่มีอยู่ตอนเริ่มต้น (คิดเป็น 100%) และคำนวณหาค่าร้อยละกิจกรรมสัมพันธ์ (%relative activity)

##### 5.2 การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรม (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที) ภายใต้ระบบบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 3-10 แล้ววิเคราะห์ค่าร้อยละกิจกรรมสัมพันธ์ (%relative activity) พีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น 100% สำหรับผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ สามารถทำได้โดยการนำเอนไซม์บ่มกับเคซีนที่มีพีเอชแตกต่างกันระหว่าง 3-10 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมที่มีอยู่ตอนเริ่มต้น (คิดเป็น 100%) และคำนวณหาค่าร้อยละกิจกรรมสัมพันธ์ (%relative activity)

### 5.3 การตรวจสอบผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีมาตรฐานที่มีไอออนและสารเคมีบางชนิดความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ได้แก่ KCl LiCl NaCl AgNO<sub>3</sub> NiCl<sub>2</sub> FeCl<sub>2</sub> MgSO<sub>4</sub> Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CaCl<sub>2</sub> MnCl<sub>2</sub> CuSO<sub>4</sub> HgCl<sub>2</sub> CoCl<sub>2</sub> BaCl<sub>2</sub> AlCl<sub>3</sub> EDTA SDS และ Mercaptoethanol คำนวณค่าร้อยละกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่เติมไอออนหรือสารเคมี

### 5.4 การวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์กับซับสเตรทและค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีมาตรฐานโดยใช้ซับสเตรทที่แตกต่างกันได้แก่ เคซีน เจลาติน และอัลบูมิน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรท โดยแสดงเป็นค่าร้อยละกิจกรรมสัมพันธ์เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อทำปฏิกิริยากับเคซีน สำหรับการวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทำได้โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีมาตรฐานโดยแปรผันความเข้มข้นของเคซีนให้อยู่ในช่วง 5-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้วิเคราะห์หาค่าทางจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ด้วยโปรแกรม Sigma plot เวอร์ชัน 12.0 ซึ่งเป็นไปตามสมการของ Lineweaver-Burk ดังนี้

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

## 6. การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor ด้วยเทคนิค dot blot

6.1 การเตรียมน้ำยาราดโปรตีนต่ำสำหรับใช้ในงานวิจัย ผสมน้ำยาราดกับน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเติมโปรติเอสในสัดส่วนโปรติเอส 500 ยูนิตต่อน้ำยาราด 100 ml พร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

6.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ นำน้ำยาราดโปรตีนต่ำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดเฉพาะส่วนของเหลวชั้นกลางออกมากใช้ของเหลวดังกล่าวเป็นตัวอย่างของซีรัมในการวิเคราะห์หาโปรตีนภูมิแพ้ต่อไป

6.3 การเตรียมตัวอย่างซีรัมบน PVDF membrane ทำการแช่ PVDF membrane ในเมทานอลเป็นเวลา 5 นาที และนำไปแช่ใน Transfer buffer อย่างน้อย 15 นาที หลังจากนั้นทำการหยดตัวอย่างซีรัม 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น membrane และรอจนกระทั่งแห้ง

6.4 การบ่มซีรัมร่วมกับแอนติบอดี นำ PVDF จากข้อ 6.3 มาล้างด้วย TSB buffer นาน 10 นาที 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 10-15 ml บ่มต่อด้วย non-fat milk ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่น PVDF ไปบ่มร่วมกับ Anti-latex antigen monoclonal antibody แต่ละชนิด (อัตราการใช้ 1: 10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ให้ล้าง

PVDF ด้วย TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละประมาณ 15 นาที และล้างด้วย TSB buffer อีก 1 ครั้ง ต่อไปให้นำแผ่น PVDF ดังกล่าวมาบ่มร่วมกับ Goat anti-mouse IgG HRP (อัตราการใช้เจือจาง 1:10,000 in 4% non-fat milk) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น PVDF เช่นเดิมด้วย TBST และ TSB buffer

6.5 การตรวจสอบผล นำแผ่น PVDF นี้ไปทำปฏิกิริยาด้วยชุดตรวจสอบชนิด chemiluminescent detection kit (Pierce, super signal Chemiluminescence) 5 นาที จากนั้นเตรียมสารเคมีสำหรับล้างฟิล์มโดยผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Fixer ในอัตราส่วน 4:1 และผสมน้ำกลั่นกับสารละลาย Developer ในอัตราส่วน 4:1 เช่นเดียวกัน นำแผ่น PVDF มาประกบลงบนแผ่นฟิล์ม X-ray ในที่มีดเป็นเวลา 5-60 นาที หรือข้ามคืน ขึ้นกับกรณีแล้วล้างฟิล์มโดยแช่แผ่นฟิล์มในสารละลาย Fixer เป็นเวลา 30 วินาที และแช่ในสารละลาย Developer เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว ผึ่งแผ่นฟิล์มให้แห้ง แล้วสังเกตแถบสีดำที่เกิดขึ้น

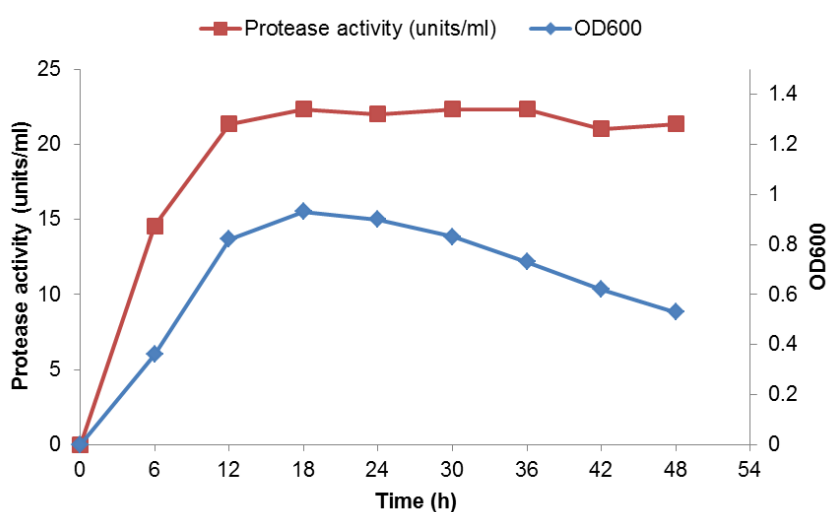
## 7. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

\*หมายเหตุ: ในการศึกษาเชิงปริมาณ ได้มีการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 1. การเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เพื่อผลิตเอนไซม์

พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จากถังหมักแบบกวนผสมได้ โดยสามารถผลิตเอนไซม์เท่ากับ 22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอในการนำมาใช้ศึกษาครั้งนี้ สารละลายเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะสีอมเหลืองและไม่มีความขุ่น แต่อย่างไรก็ตาม สารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้นี้จำเป็นต้องนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น เพื่อสามารถศึกษาคุณสมบัติด้านอื่นๆ ของเอนไซม์ต่อไป



ภาพที่ 46 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและเซลล์ของ *B. subtilis* MR10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ที่ 37 องศาเซลเซียส

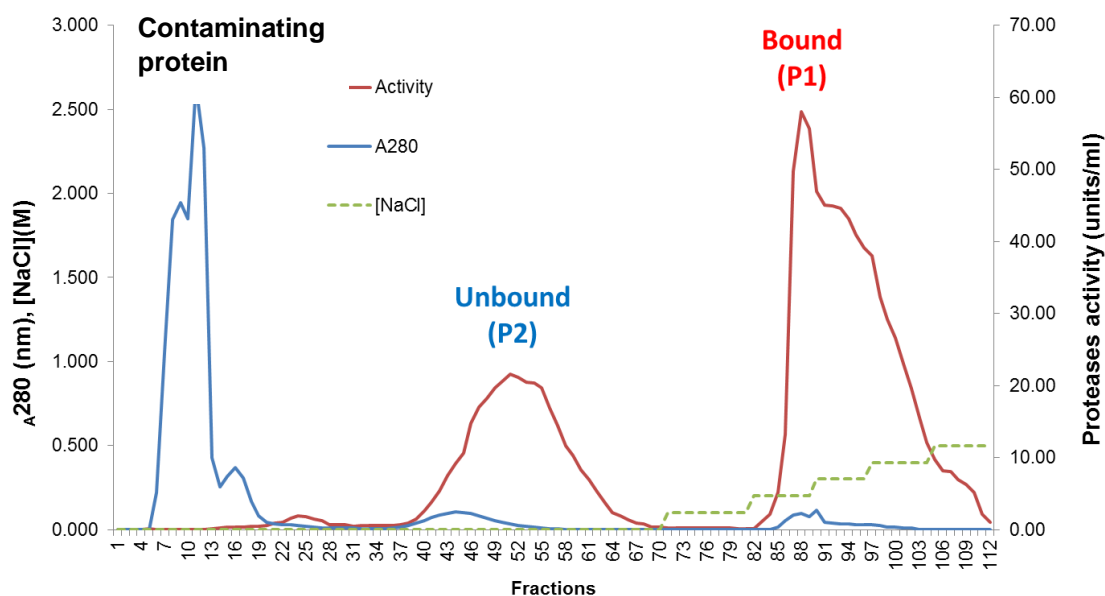
### 2. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 โดยการตกตะกอนเอนไซม์โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแบบลำดับส่วน (salt fractionation) พบกิจกรรมของเอนไซม์ปริมาณมากกว่า 60% ในช่วงการใช้เกลือความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตระหว่าง 40-80% ทั้งนี้ หากเลือกตกตะกอนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 40% จะทำให้ได้เอนไซม์เพียง 4% เท่านั้น และหากใช้ความเข้มข้นมากกว่า 80% ก็เป็นการสิ้นเปลืองและยังพบว่ามิโปรตีนชนิดอื่นตกตะกอนลงมาเพิ่มเติมด้วย ส่งผลต่อความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิต จึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในขั้นต้น ตารางที่ 14 ตารางสรุปผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 เริ่มทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสด้วยกิจกรรมของเอนไซม์อย่างหนาแน่นจำนวน 44,500 ยูนิต ซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 148.3 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 1.1 เท่า และได้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกลับคืนมา

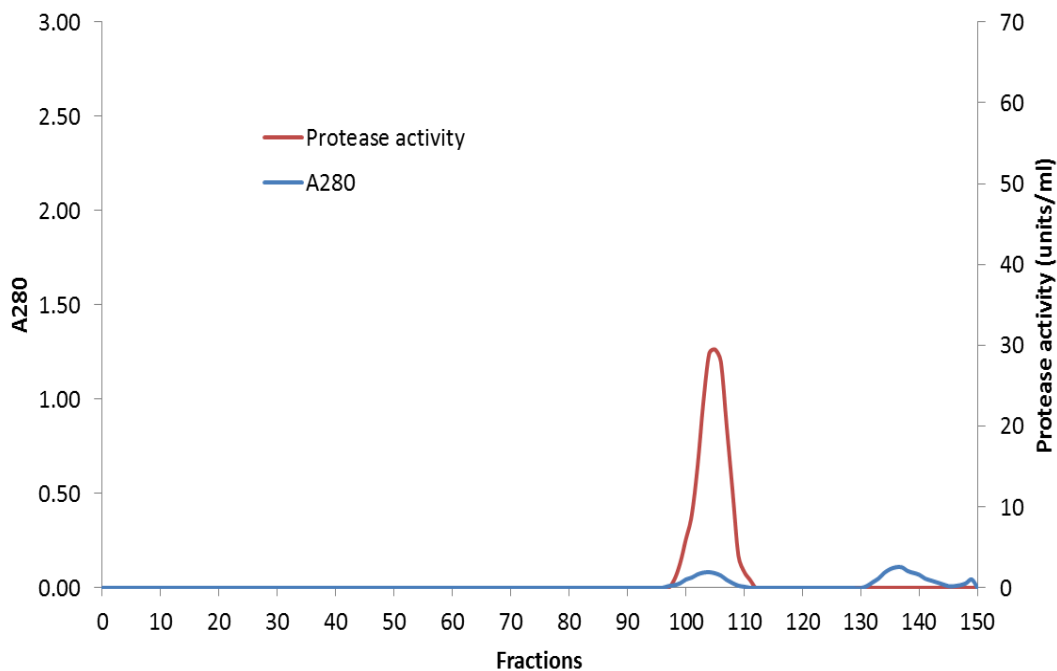
จำนวน 30,000 ยูนิต นำเอนไซม์จำนวนนี้ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cation exchange chromatography โดยใช้ตัวกลางประจุคงที่คือ CM- sephadex C-50 ในสภาวะที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ หลังจากผ่านเอนไซม์เข้าไปยังตัวกลางและทำการชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-0.5 โมลาร์ ทำให้ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 47 พบว่าโครมาโทกราฟีสามารถแยกเอนไซม์โปรตีเอสอย่างหายาออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ P1 และ P2 และ P1 ให้ค่ากิจกรรมหลักของเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุดประมาณ 10,000 ยูนิต เอนไซม์นี้แสดงประจุโมเลกุลเป็นประจุบวกภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ ในขณะที่ P2 เป็นกิจกรรมรองของเอนไซม์โปรตีเอสและมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 4,900 ยูนิต และแสดงประจุเป็นโมเลกุลเป็นประจุลบทำให้ถูกชะออกมาได้อย่างง่ายโดยปราศจากการชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ด้วยวิธีการทำบริสุทธิ์ด้วย CM-sephadex C-50 ทั้ง P1 และ P2 มีความบริสุทธิ์ขึ้นถึง 22.8 และ 11.1 เท่า เปรียบเทียบกับเอนไซม์อย่างหายา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* MR10 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้อย่างน้อย 2 ชนิด อย่างไรก็ตามการบ่งชี้ชนิดของเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาพาราจิงจำเป็นต้องทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสองชนิดต่อไปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชัน โดยใช้ตัวกลางคงที่คือ sephacryl S-100 ที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นโครมาโทแกรมในภาพที่ 48 และ 49 จากการทดลองได้เอนไซม์ P1 และ P2 ที่บริสุทธิ์ขึ้น ถึง 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ และเอนไซม์ทั้งสองมีความบริสุทธิ์เมื่อวิเคราะห์ดูความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังภาพที่ 50 และสามารถประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีทั้งสองเป็น 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสที่พบใน *Bacillus* sp. (Farhadian และคณะ 2015; Uttatree; Ferrareze et al., 2016) โดยเฉพาะเอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. amyloliquefaciens* FSE-68 ที่พบว่าเป็น neutral metalloprotease (32 กิโลดาลตัน) และ alkaline serine protease (27 กิโลดาลตัน) (Cho et al., 2003)

ตารางที่ 14 สรุปผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* MR10

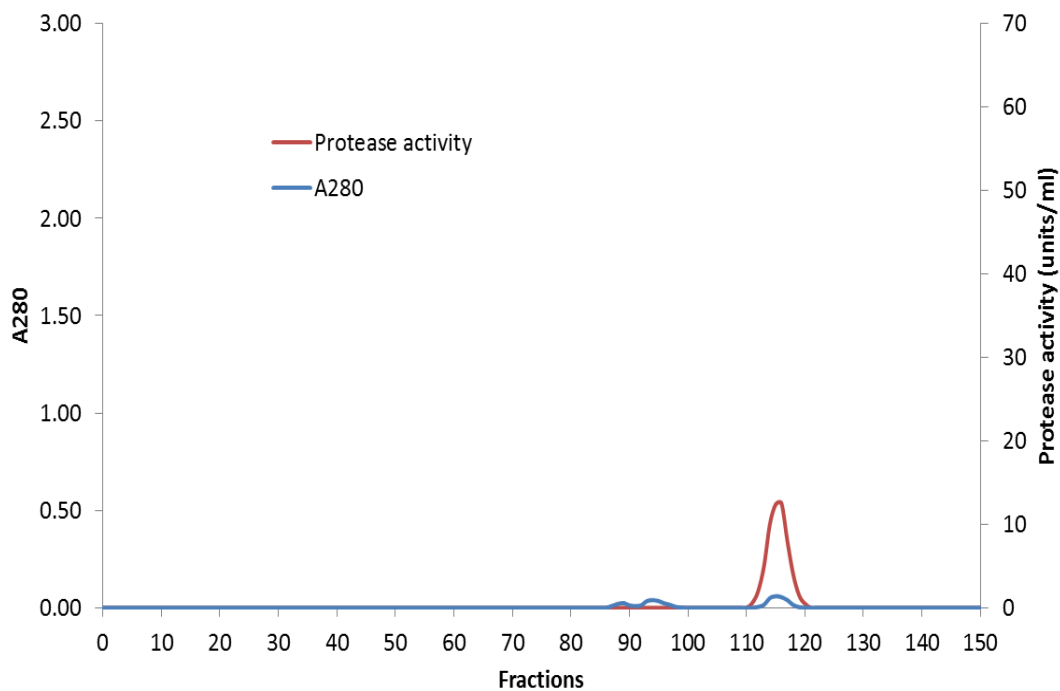
Step		Total activity	Total protein	Specific activity	Purification	Recovery
		(Units)	(mg)	(U/mg)	(fold)	(%)
Crude enzyme		44,500	300	148.3	1.0	100.0
Precipitation		30,100	188	160.1	1.1	67.6
CM-Sephadex	P1	10,162	12	846.8	5.7	22.8
	P2	4,922	6	820.3	5.5	11.1
Sephacryl S-100	P1	5,530	1.4	3,950.0	26.6	12.4
	P2	2,590	0.8	3,237.5	21.8	5.8



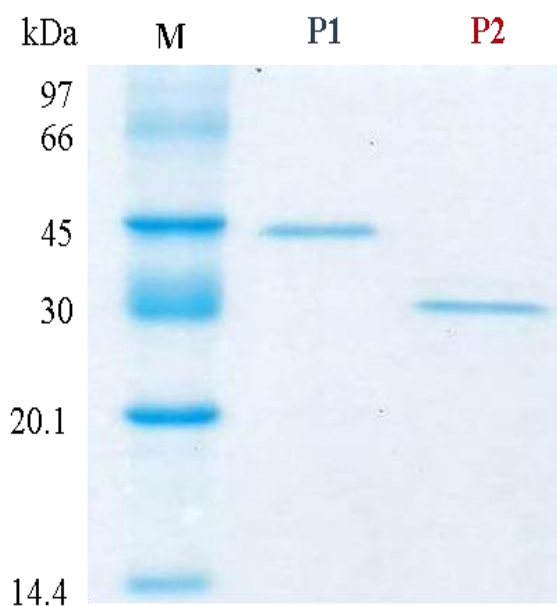
ภาพที่ 47 โครมาโทแกรมของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* MR10 ด้วย CM-Sephadex C-50 ภายใต้อุณหภูมิที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์พีเอช 7.5



ภาพที่ 48 โครมาโทแกรมของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอส P1 จาก *B. subtilis* MR10 ด้วย Sephacryl S-100 เซด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5



ภาพที่ 49 โครมาโทแกรมของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอส P2 จาก *B. subtilis* MR10 ด้วย Sephacryl S-100 เซด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5

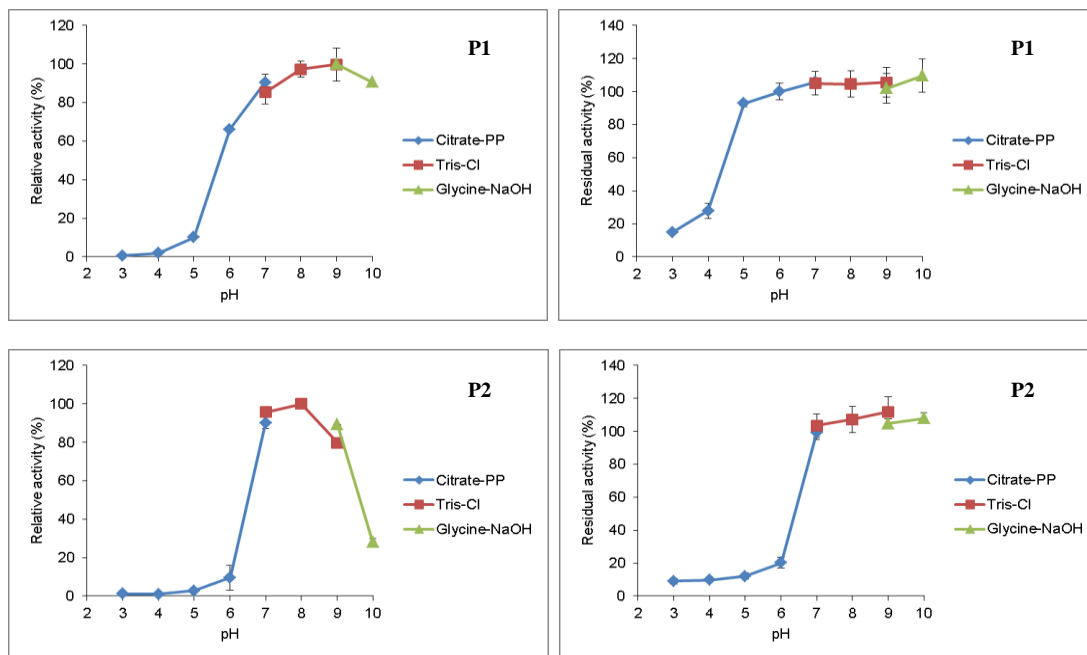


ภาพที่ 50 SDS-PAGE ของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ P1 และ P2

### 3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์

#### 3.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส

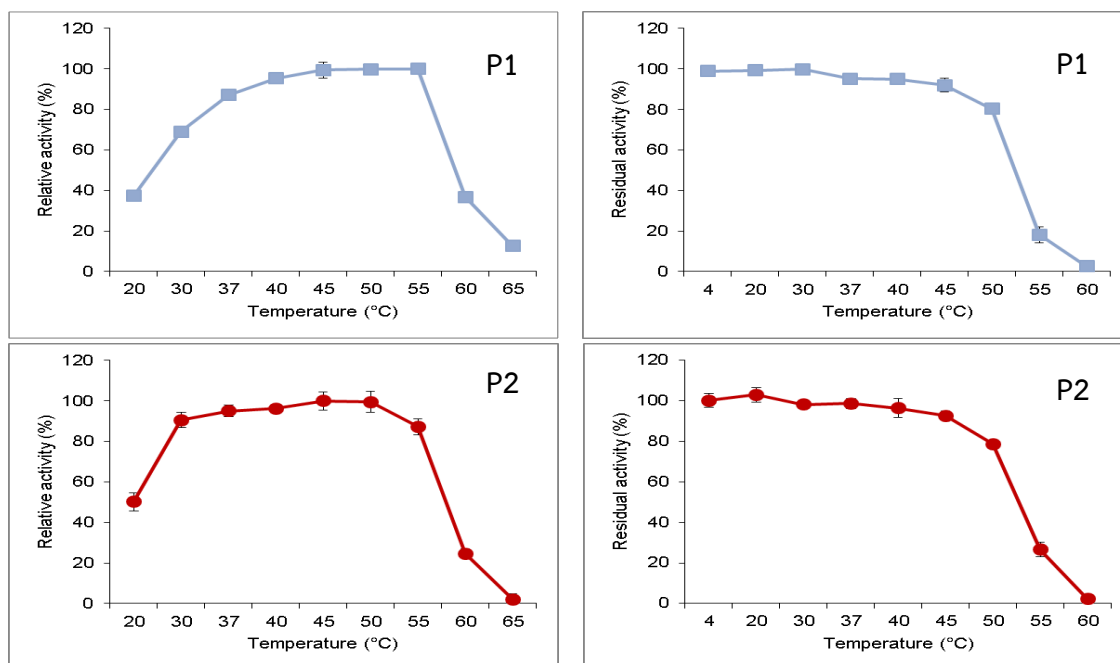
ทำการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ P1 และ P2 ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 10 นาที) พบว่า เอนไซม์ P1 ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7-10 โดยแสดงค่ากิจกรรมสัมพันธ์มากกว่า 80% และทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 9 ส่วนเอนไซม์ P2 ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่แคบกว่าคือ พีเอช 7-9 และทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 8 ดังนั้นเอนไซม์ P1 และ P2 น่าจะจัดให้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline protease และ neutral protease ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ P1 ยังแสดงเสถียรภาพที่ดีในช่วงพีเอชที่กว้างระหว่างพีเอช 5-10 ส่วนเอนไซม์ P2 ทนพีเอชได้ดีในช่วง 7-10 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cho และคณะ (2003) ที่พบ alkaline protease และ neutral protease จาก *B. amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักถั่วเหลือง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าอาจพบแหล่งของจุลินทรีย์อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพราะในกรณีของ *B. subtilis* MR10 ก็เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วหมัก (ถั่วเน่า) เช่นกัน (Wongputtisint et al., 2012)



ภาพที่ 51 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน (ซ้าย) และเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส (ขวา) P1 และ P2

### 3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส

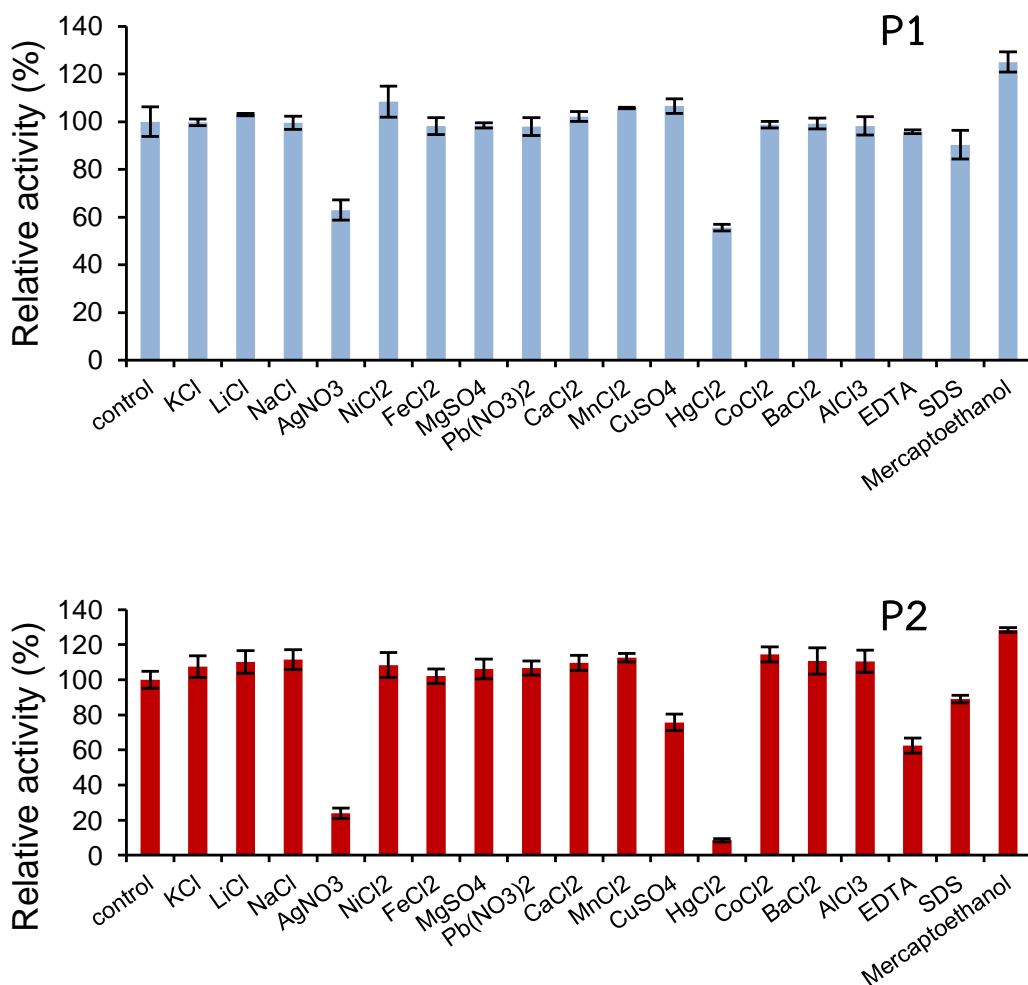
ทำการศึกษาค้นหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ P1 และ P2 ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (พีเอช 7.0 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ P1 และ P2 คือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Sathishkumar และคณะ 2015; Uttaree และ Charoenpanich 2016; Wang และคณะ 2013; Ghafoor และ Hasnain 2010) และเอนไซม์ทั้งสองมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิใกล้เคียงกันคือ สามารถทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เสถียรภาพของเอนไซม์จะลดลงมากกว่า 50% และไม่สามารถกลับมาทำงานได้อีกหากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 52 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน (ซ้าย) และเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส (ขวา) P1 และ P2

### 3.3 ผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อเอนไซม์โปรติเอส

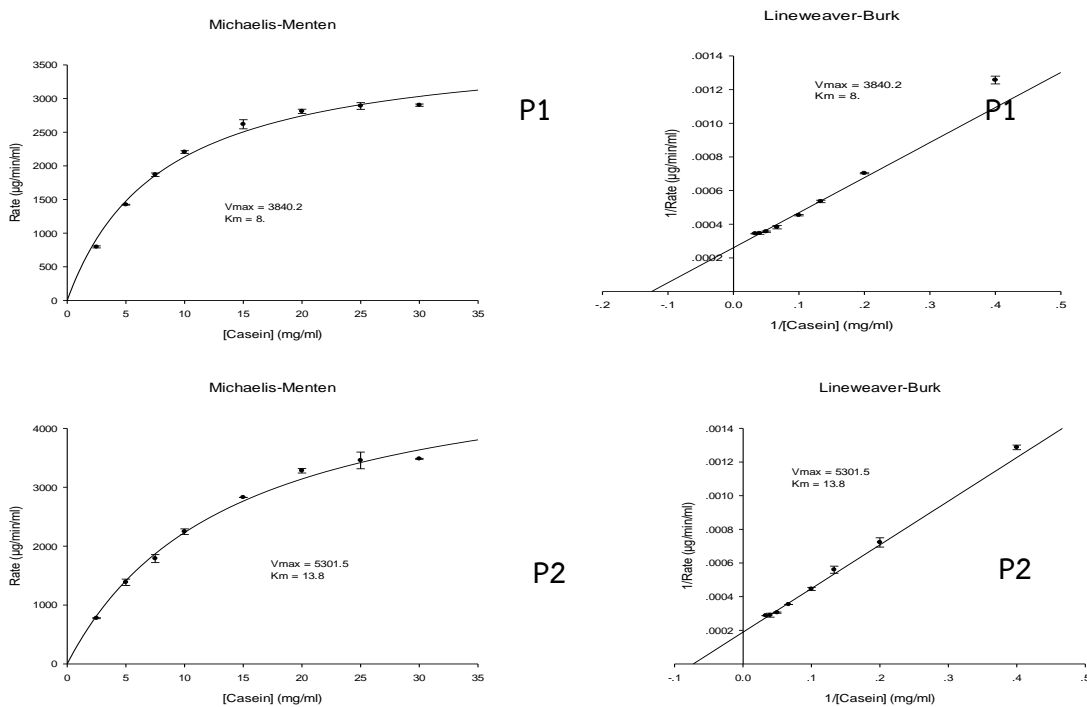
เอนไซม์ P1 สามารถทำงานได้ดีในสถานะที่มีไอออนประจุบวก ได้แก่ +1 +2 และ +3 ยกเว้น  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P1 ได้ประมาณ 50% (ภาพที่ 53) เปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ปกติ ทั้ง SDS EDTA และ mercaptoethanol ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ P2 มีความไวต่อ  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS เพราะไอออนและสารเคมีเหล่านี้มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ P1 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากถึง 80% เอนไซม์โปรติเอส P2 น่าจะถูกจัดให้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม metalloenzyme เนื่องจากผลจากการยับยั้งโดย EDTA (Orhan และคณะ 2005) Ellalah และคณะ (2002) กล่าวว่าผลของไอออนในการยับยั้งเอนไซม์จะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเอนไซม์ ความต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำปฏิกิริยา และธรรมชาติของบริเวณเร่งของเอนไซม์



ภาพที่ 53 ผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์ P1 (บน) และ P2 (ล่าง)

### 3.4 ความจำเพาะต่อซับสเตรทและค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ P1 และ P2

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์ P1 และ P2 กับซับสเตรท 3 ชนิดได้แก่ เคซีน เจลาตินและอัลบูมิน (BSA) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้งเอนไซม์ P1 และ P2 มีความจำเพาะเจาะจงกับเคซีนเหมือนกัน แต่ไม่จำเพาะกับอัลบูมินและไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลาติน เลือกเคซีนเป็นซับสเตรทสำหรับทดลองเพื่อวิเคราะห์ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทั้งสองโดยใช้แบบจำลองของ Michaelis-Menten (ภาพที่ 54) พบว่า ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของเอนไซม์ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ



ภาพที่ 54 กราฟของ Michaelis-Menten แสดงการหาค่าทางจลนพลศาสตร์  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  ของ เอนไซม์โปรติเอส P1 (ชาย) และ P2 (หญิง)

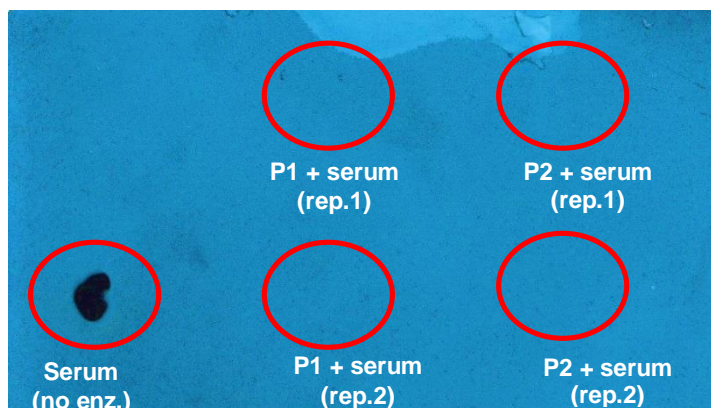
ภายหลังการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสทั้งสองชนิดจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ข้อมูลที่ได้รับเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอสเพื่อผลิตน้ำยาล้างจานที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ โดยเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดของเอนไซม์นั้น กระบวนการผลิตจำเป็นต้องถูกกำหนดไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์และหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น ทั้งนี้จากการวิเคราะห์กระบวนการที่เป็นไปได้ในการผลิตน้ำยาล้างจานที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสนั้น เราสามารถเติมโปรติเอสได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ การเติมทันทีในน้ำยาล้างจานจากเกษตรกร (เติมสารรักษาสภาพมาแล้ว) แล้วบ่มตามเวลาที่กำหนดและปั่นเหวี่ยงให้น้ำยาล้างจาน และวิธีที่สองคือนำน้ำยาล้างจานขั้นตอนต่างๆ ของโรงงานให้เรียบร้อยแล้วจนกระทั่งได้น้ำยาล้างจาน แล้วจึงเติมเอนไซม์ลงไปบ่มตามระยะเวลาที่กำหนด ทั้งสองรูปแบบกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ทั้งสองรูปแบบจะมีการเติมแอมโมเนียในปริมาณ 0.6-0.8% ซึ่งค่า pH ของน้ำยาล้างจานจะเพิ่มขึ้นจาก 7 ไปเป็น 10-11 ได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ P2 เป็นอย่างมาก โดยประสิทธิภาพการทำงานเหลือเพียง 20% เท่านั้น แต่ไม่กระทบต่อการทำงานของ P1 แต่คาดว่าประเด็นนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ P2 เนื่องจากแม้ทำงานได้ต่ำลง แต่เสถียรภาพของโครงสร้างเอนไซม์ที่ pH 10 ยังคงเท่าเดิม ดังนั้นเราสามารถเพิ่มระยะเวลาการบ่มน้ำยาล้างจานร่วมกับเอนไซม์ให้นานขึ้นได้ เพื่อให้ได้ผลการย่อยโปรตีนโดย P2 เทียบเท่าสภาวะปกติ

อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้น พบว่า P2 ทำงานได้ดีในช่วงกว้างกว่า P1 ซึ่งหากต้องการให้เอนไซม์ทั้งสองทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด อาจจำเป็นต้องให้ความร้อนแก่น้ำยางพาราและควบคุมไว้ที่ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจกระทบต่อต้นทุนด้านพลังในการผลิตได้บ้าง ความร้อนที่ใช้ส่งผลต่อแอมโมเนียซึ่งสามารถระเหยได้ดีที่อุณหภูมิสูง แต่อาจไม่กระทบต่อสมบัติของน้ำยางชั้น เพราะแม้แต่กระบวนการผลิตน้ำยางชั้นจากการระเหยด้วยความร้อนก็ไม่กระทบต่อสมบัติของน้ำยางธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตาม การบ่มเอนไซม์ร่วมกับน้ำยางที่อุณหภูมิปกติ (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ก็น่าจะเพียงพอสำหรับให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถทำงานได้

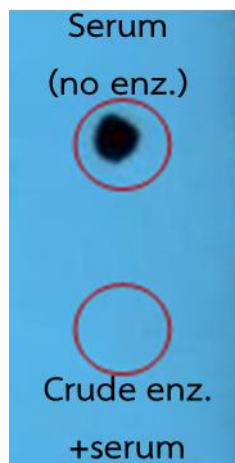
กระบวนการในการแยกเอนไซม์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เดิมใช้การตกตะกอนด้วยสารอะซิโตนจากนั้นกรองเอาตะกอนเอนไซม์ออกมาแล้วละลายกลับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ แต่ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าเอนไซม์โปรตีเอสมีขนาดโมเลกุลประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตันตามลำดับ ทำให้สามารถออกแบบกระบวนการแยกเอนไซม์จากอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีกโดยใช้เยื่อกรองที่มีขนาดรูพรุนเหมาะสม เช่น เล็กกว่า 45 กิโลดาลตัน เป็นต้น แล้วทำการกรองแบบ ultrafiltration กระบวนการนี้เป็นขั้นตอนที่ง่าย สามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว แต่มีข้อเสียคือเครื่องมือ ultrafiltration มีราคาค่อนข้างสูง แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับการตัดสินใจของผู้ประกอบการ

#### 4. การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้

ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ของเอนไซม์บริสุทธิ์โปรตีเอส P1 และ P2 พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor (ภาพที่ 55) เช่นเดียวกับโปรตีเอสชนิดหยาบที่ผลิตจาก *B. subtilis* MR10 (ภาพที่ 56) ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดล้วนมีบทบาทสำคัญในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้ การประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เชิงปริมาณด้วยเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือการใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันยังไม่สามารถทำได้ในการวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากข้อจำกัดด้านเทคนิคและเครื่องมือ ซึ่งวิเคราะห์ได้เพียงเชิงคุณภาพเท่านั้น อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติก็ได้ใช้เอนไซม์โปรตีเอสในรูปแบบเอนไซม์หยาบสำหรับการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราอยู่แล้ว



ภาพที่ 55 फिल्म X-ray ที่ได้จากการตรวจวัดโปรตีนภูมิแพ้โดยการวิเคราะห์ dot blot ภายหลังจากการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์ P1 และ P2



ภาพที่ 56 फिल्म X-ray ที่ได้จากการตรวจวัดโปรตีนภูมิแพ้โดยการวิเคราะห์ dot blot ภายหลังจากการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสหลาย

## สรุปผลการวิจัย

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% ตามด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-Sephadex C-50) และเจลฟิลเทรชัน (Sephacryl S-100) ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรตีเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรตีเอส 2 (P2) เอนไซม์บริสุทธิ์ P1 และ P2 มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 3,950 และ 3,238 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์โปรตีเอส P1 และ P2 มีความเสถียรในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรตีเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของโลหะ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 เอนไซม์โปรตีเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เช่นเดียวกับโปรตีเอสหยาบ เอนไซม์บริสุทธิ์ทั้งสองชนิดสามารถย่อยหรือกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราดิบได้เหมือนกัน

## ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

มีข้อเสนอแนะว่าในการเตรียมเอนไซม์จากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เพื่อจะนำเอนไซม์ไปใช้งานจริง หากสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ P1 ออกมามากกว่า P2 ก็จะเป็นสิ่งที่ดี เพราะเอนไซม์ P1 มีความเสถียรและไม่เสียสภาพเมื่อมีไอออนโลหะ  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  และ  $Ag^+$  หรือหากต้องการให้แบคทีเรียสามารถผลิต P1 ได้มากเป็นกรณีพิเศษอาจต้องเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ในการเพิ่มปริมาณการผลิต ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ

## ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิชาการเรื่อง “Capability of purified protease from *Bacillus subtilis* MR10 in rubber allergic protein degradation”

## เอกสารอ้างอิง

- ปราณี อ่านเปื้อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ.
- พัชรา วีระกะลัส. 2541. เอนไซม์. ด้านอุตสาหกรรมพิมพ์: กรุงเทพฯ.
- Alirezaei, M., Aminlari, M., Gheisari, H.R. and Tavana, M. 2011. Actinidin: A promising milk coagulating enzyme. *European Journal of Food Research & Review* 1: 43-51.
- Amid, M., Tan, C.P., Mirhosseini, H., Aziz, N.A. and Ling, T.C. 2011. Optimization of serine protease extraction from mango peel (*Mangifera indica* CV. Chokanan). *Food Chemistry* 124: 666-671.
- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M. and Kalaichelvan, P.T. 2007. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 475-481.
- Asker, M.M.S., Mahmound, M.G., Shebwy, K.E. and Aziz, M.S.A.E. 2013. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 11: 103-109.
- Chaurasiya, R.S. and Hebbar, H.U. 2013. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Separation and Purification Technology* 111: 90-97.
- Cho, S. J., Oh, S. H., Pridmore, D., Juillerat, M. A., and Lee, C. H. 2003. Purification and characterization of proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from traditional soybean fermentation starter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7664-7670.
- Deutscher, M, P. 1990. Guide to Protein Purification. Academic press, INC. London
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., and Adinarayana, K. 2002. A review on microbial alkaline proteases. *Journal of Scientific and Industrial Research* 61: 690-704.
- Farhadian, S., Asoodeh, A., Lagzian, M. 2015. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115: 51-58.
- Ferrareze, P.A.G., Correa, A.P.F., and Brandelii, A. 2016. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7: 102-109.

- Ghafoor, A. , and Hasnain, S. Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 strain isolated from ornamental plant nursery. *Extremophiles* 20: 115-123.
- Ha, M., Bekhit, A.E-D.A., Carne, A. and Hopkins, D.L. 2012. Characterization of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry* 134: 95-105.
- Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C.W., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A., Huerta-Ochoa, S., Regalado-González, C. and Prado-Barragán, L.A. 2011. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry* 2001-2006.
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Wongputtisin, P., Haltrich, D., Nguyen, T-H. and Khanongnuch, C. 2015. Efficient secretory expression of gene encoding a broad pH-stable maltose-forming amylase from *Lactobacillus plantarum* S21 in food-grade lactobacilli host. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58: 901-908.
- Kudryavtseva, O.A., Dunaevsky, Y.E., Kamzolkina, O.V. and Belozersky, M.A. 2008. Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylophilic Basidiomycetes. *Microbiology* 77: 643-653.
- Kumar, S., Sharma, N.S., Saharan, M.R. and Singh, R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry* 40: 1701-1705.
- Niyonzima, F.N. and More, S.S. 2014. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. *Biotechnology*. DOI 10.1007/s13205-014-0200-6.
- Orhan, E., Omay, D., and Guvenilir, Y. 2005. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121: 183-194.
- Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.
- Piero, A.R.L., Puglisi, I. and Petrone, G. 2011. Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *Eur Food Res Technol* 233: 517-524.
- Sathishkumar, R. , Ananthan, G. , and Arun J. 2015. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA

- CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4: 214-220.
- Soares, P.A.G., Vaz, A.F.M., Correia, M.T.S., Pessoa, A., Carneiro-da-Cunha, M.G. 2012. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and Purification Technology* 98: 389-395.
- Sumatha, A., Larroche, C. and Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial biotechnology of food-grade protease: A perspective. *Food Technol Biotechnol* 44: 211-220.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy: historical perspective. *Methods* 27: 3-9.
- Uchida, H., Kondo, D., Yamashita, S., Tanaka, T., Tran, L.H., Nagano, H. and Uwajima, T. 2004. Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN2 isolated from Vietnamese fish sauce. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 579-582.
- Uhlir, H. Industrial enzymes and their applications. USA. : John Wiley & Sons, Inc., 1998.
- Uttatree, S., and Charoenpanich, J. 2016. Isolation and characterization of a broad pH- and temperature- active solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8: 32-38.
- Wang, J., Xu, A., Wan, Y., and Li, Q. 2013. Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for beer brewing from *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170: 2021-2033.
- Wen, L., Zhu, W., Lu, Yanling, Kong, J. and Ma, G. 1998. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum*. *Process Biochemistry* 33: 331-336.
- Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Khongbantad, W., Niamsup, P. and Lumyong, S. 2012. Screening and selection of *Bacillus* spp. for fermented corticate soybean Meal production. *Journal of Applied Microbiology* 113, 798-806.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก 1

## ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผน กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับ

**แผนงานวิจัย** การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาล้างพารา

**โครงการย่อยที่ 1** การขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ในการเตรียมน้ำยาล้างพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร	หาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการผลิตขนาดใหญ่ - ผลของอุณหภูมิ - ผลของปริมาณออกซิเจน - ผลของอัตราการกวน	ดำเนินการตามแผนที่วางไว้ โดยทำการทดลองในถังหมักขนาด 20 ลิตร	สภาวะที่เหมาะสมในการหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร คือ ที่อุณหภูมิ 28-30 °C ให้อากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm <sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 150 rpm
เพื่อศึกษารูปแบบการหมักที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 20 ลิตร เพื่อเพิ่มค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	ศึกษารูปแบบการหมักแบบต่างๆ เพื่อเพิ่มค่า Productivity - การหมักแบบกะ - การหมักแบบต่อเนื่อง - การหมักแบบ Fed batch	ดำเนินการตามแผนที่วางไว้ อีกทั้งทดสอบในถังหมักขนาด 50 ลิตร ซึ่งมีระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมสภาวะของการหมัก	การหมักรูปแบบกึ่งกะให้ค่าผลได้ (productivity) สูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 20% ต้นทุนการผลิตเอนไซม์จากการหมักแบบกึ่งกะต่ำกว่าการหมักแบบกะประมาณ 3 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่า มีค่าผลได้ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาจากโครงการ RDG5650081 ประมาณ 3-3.8 เท่า
เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของกระบวนการขึ้นรูปลูกมืออย่างทางการแพทย์	การทดลองผลิตลูกมืออย่างทางการแพทย์ด้วยน้ำยาล้างที่กำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส	ดำเนินงานตามแผน โดยปฏิบัติงาน ณ โรงงานในพื้นที่ อ.สะเดา จ.สงขลา	พบว่า การเติมเอนไซม์โปรติเอสร่วมในกระบวนการผลิตลูกมืออย่างทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน

จากน้ำยางที่กำจัดโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย รวมถึงการศึกษาสมบัติของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐาน ISO	รติเอส จากงานวิจัยและภายใต้สภาวะจริงของโรงงานฯ และทำการตรวจสอบคุณภาพทั้งทางด้านชีวภาพและกายภาพ		ส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง โดยค่าแรงดึงและค่า stress at 300% ไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้วโรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์ยาง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน
---	--	--	---

**โครงการย่อยที่ 2** การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> MR10 ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา	ศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> MR10	ได้ทำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแล้วทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จากศึกษาขนาดโมเลกุล ค่า $k_m$ $V_{max}$ ผลของตัวยับยั้ง cofactor และ ความจำเพาะต่อ สับสเตรท	-เอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรติเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรติเอส 2 (P2) -น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ -โปรติเอส P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 -อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

			<p>-P1 และ P2 มีความเสถียรที่ช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ</p> <p>-ค่าจลนพลศาสตร์ <math>K_m</math> และ <math>V_{max}</math> ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที</p> <p>-โปรตีนทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน</p> <p>-ไอออนของโลหะ <math>Ag^+</math> และ <math>Hg^{2+}</math> มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่ <math>Ag^+</math> <math>Cu^{2+}</math> <math>Hg^{2+}</math> EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2</p>
	<p>ทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนบริสุทธิ์ในการกำจัดโปรตีนภูมิต้านทานในน้ำยาล้างจาน โดยตรวจสอบในรูปทั้งน้ำยาล้างและฟิล์มล้าง</p>	<p>ทดสอบประสิทธิภาพของโปรตีนบริสุทธิ์ในการกำจัดโปรตีนภูมิต้านทานในน้ำยาล้างจาน โดยตรวจสอบในรูปน้ำยาล้าง</p>	<p>เอนไซม์บริสุทธิ์โปรตีน P1 และ P2 ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิต้านทานชนิด rubber elongation factor เช่นเดียวกับโปรตีนชนิดหายากที่ผลิตจาก <i>B. subtilis</i> MR10</p>

ภาคผนวก 2  
บทความ

การขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ใน  
การเตรียมน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้  
Semi-pilot up-scaling process of protease production for applying in allergic  
protein-free rubber latex preparation

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน\* และ ฉันทนา สุโพ

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

\*corresponding author: [pairote@mju.ac.th](mailto:pairote@mju.ac.th)

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและรูปแบบของการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักในถังหมักขนาด 20 ลิตร อีกทั้งเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในการผลิตถุงมือยางที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ภายใต้สภาวะการผลิตของโรงงาน ผลการศึกษพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตรคือการหมักที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 kg/cm<sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดที่อัตราเร็ว 150 rpm ซึ่งเมื่อทำการหมักแบบกะ (batch fermentation) ทำให้ได้ค่า productivity เท่ากับ 1.21 unit/ml-hr แต่ค่า productivity จะสามารถเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ หากทำการเพาะเลี้ยงในรูปแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่มีการเติมอาหารใหม่ 1 ลิตรในทุก 12 ชั่วโมงภายหลังการเพาะเลี้ยงแบบกะไปแล้ว 24 ชั่วโมง และค่า productivity จะเพิ่มขึ้นกว่า 10 เท่าหากทำการหมักในถังหมักที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมของการหมักให้คงที่ เช่นการใช้ถังหมัก stirred tank reactor (STR) ขนาด 50 ลิตร เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ครั้งนี้ เมื่อนำมากำจัดโปรตีนในน้ำยางข้นแล้วนำไปผลิตเป็นถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน พบว่าส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือ ได้แก่ ค่า tensile และค่า stress at 500% จึงไม่ผ่านมาตรฐาน ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

### คำสำคัญ:

น้ำยางโปรตีนต่ำ, น้ำยางปราศจากโปรตีนภูมิแพ้, บาซิลลัส ซับติลิส, โปรติเอส, การขยายกำลังการผลิต

## ABSTRACT

This research aimed to investigate the optimal conditions and fermentation mode of 20 L fermenter for the production of protease enzyme from *Bacillus subtilis* MR10 cultured in low-cost liquid medium containing soybean meal as a main composition. Moreover, possibility in applying of protease in the manufacturing of rubber examination glove was investigated. It was found that the optimal conditions for protease production in 20 L fermenter are cultivation at 28-30 °C, aeration rate at 1.0 kg/cm<sup>2</sup> and agitation rate at 150 rpm. When batch fermentation mode was operated, the productivity of protease at 1.21 unit/ml-hr was obtained. The productivity was approximately 20% increased, when fed-batch fermentation was operated with the addition of 1 L of fresh liquid medium every 12 hr after 24 hr of batch fermentation mode. Ten times higher of productivity could also be obtained when the batch fermentation was conducted in 50 L stirred tank bioreactor (STR). The protease produced in this research was applied in the deproteination of concentrated rubber latex and subjected to the manufacturing of rubber examination glove. It was found that enzyme might affect to the vulcanization of rubber. The physical properties; i.e. tensile and stress at 500% were then lower than those of the standard of rubber examination glove (ASTM D3578-05). Therefore, it was suggested that the formula development or optimization for vulcanization process need to be investigated, if protease will be applied in allergic protein-free glove manufacturing.

**Keywords:**

deproteinized rubber latex, allergic protein – free rubber latex, protease, *Bacillus subtilis*, up scaling process

**บทนำ**

โปรตีนในน้ำยางพาราสดบางชนิดจัดเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergen) ทั้งนี้มีชนิดของโปรตีนประมาณ 25 เพอร์เซ็นต์จากทั้งหมดที่สามารถจับกับแอนติบอดีชนิด IgE ที่อยู่ในซีรัมของมนุษย์ และพบว่าอีกประมาณ 75 เพอร์เซ็นต์สามารถจับได้กับ IgG (Sussaman et al., 2002) โปรตีนก่อภูมิแพ้เหล่านี้จะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นในขั้นตอนการทำน้ำยางข้นสำหรับกระบวนการผลิตถุงมือยาง และโปรตีนก่อภูมิแพ้จะกระจายอยู่ทั่วไปบนพื้นผิวของถุงมือหลังจากกระบวนการทำแห้งและ heat vulcanization (นุชนาฏ และ วราภรณ์, 2539;

Perraella and Gaspari, 2002) แม้จะใช้การล้างด้วยน้ำเปล่าแต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปได้หมดเสียทีเดียว แต่ก็มีรายงานว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำยางธรรมชาติสามารถถูกทำลายได้โดยการปรับสภาพให้เป็นต่างแก่ เช่นการเติมแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำยางจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณสมบัติกายภาพของน้ำยางได้ (Moris and Lakin, 1995 อ้างโดย Perrella and Gaspari, 2002)

ภายหลังจากศึกษาการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสผงจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อใช้ย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งได้รับทุนสนับสนุน

ภายใต้โครงการ “การคัดเลือกโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027)” และ “การเตรียมโปรตีนในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยางสด (สัญญาเลขที่ RDG5350029)” พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสในรูปแบบผงที่สะดวกต่อการเก็บรักษาและใช้งานได้ ทั้งยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในน้ำยางพาราสดได้ ดังผลการศึกษาจากโครงการ “การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045)” แต่อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยตระหนักดีว่า กระบวนการเตรียมโปรตีนเอสดังกล่าว นั้น ใช้ต้นทุนค่อนข้างสูง จึงได้พัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์ด้วยต้นทุนที่ต่ำลง โดยเน้นปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและกระบวนการตกตะกอนโปรตีนที่มีค่าใช้จ่ายลดลง ซึ่งเป็นสิ่งที่กำลังดำเนินการศึกษาในโครงการวิจัยหัวข้อ “การพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรตีนต้นทุนต่ำสำหรับผลิตน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้” (สัญญาเลขที่ RDG5650081) อย่างไรก็ตาม ในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสให้เพียงพอต่อการใช้งานระดับอุตสาหกรรมนั้น จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงในขนาดการผลิตที่ใหญ่ขึ้น โดยอย่างน้อยต้องมากกว่าระดับกึ่งอุตสาหกรรม (Semi pilot scale) (มากกว่า 20 ลิตร) แต่การเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป ไม่ว่าจะเป็นการถ่ายเทออกซิเจน สารอาหาร และความร้อนที่ลดลง และแรงดันภายในถังหมักที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร ซึ่งก็คาดว่าจะทำให้อัตราการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้ออยู่ในระดับเป็นที่น่าพอใจได้ นอกจากนี้ ปัจจัยเรื่องระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ก็เป็นหนึ่งต้นทุนของการผลิตเช่นกัน โดยกระบวนการหมักแต่ละรูปแบบจะส่งผลต่อระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อเมื่อเทียบต่อหน่วยผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาเปรียบเทียบและคัดเลือกรูปแบบของกระบวนการหมักที่เหมาะสมในถัง

หมักขนาด 20 ลิตร ขึ้นไป เพื่อให้ได้ค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 สูงเป็นที่น่าพอใจจะได้ทำการศึกษาด้วยเช่นกัน ผู้วิจัยคาดว่า ด้วยการศึกษและพัฒนาดังรายละเอียดที่เสนอมารั้งนี้ จะช่วยให้เกิดความเป็นไปได้ที่สูงขึ้นในการนำเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 มาใช้งานจริงในภาคอุตสาหกรรม

## วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง

### 1. แบคทีเรีย

*Bacillus subtilis* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA)

### 2. น้ำยางพารา

น้ำยางพาราชั้น 60% DRC ชนิด high ammonia จากบริษัททดลองอุตสาหกรรมน้ำยางชั้นจำกัด จ.สงขลา

### 3. การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

หัวเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ถูกเตรียมขึ้นในอาหารเหลวสูตร Nutrient broth โดยทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไปด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุด

### 4. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำปริมาณ 15 ลิตรลงในถังหมักขนาด 20 ลิตร (Nalgene®) ที่มีองค์ประกอบเป็น กากถั่วเหลือง (100 กรัม/ลิตร)  $K_2HPO_4$  (0.7 กรัม/ลิตร)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.7 กรัม/ลิตร) กลูโคส (1.1 กรัม/ลิตร)  $(NH_4)_2SO_4$  (0.275 กรัม/ลิตร) และ  $NH_4Cl$  (0.275 กรัม/ลิตร) ปรับ pH เริ่มต้นที่ 6.0 ข่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงไป ใน ประกอบถังหมักเข้ากับ อุปกรณ์จ่ายอากาศ ที่มีชุดแผ่นกรองอากาศขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน และใบกวน

ดำเนินการหมักเพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่ออัตราการเจริญและอัตราการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของแบคทีเรีย ได้แก่ อุณหภูมิ (30-55 องศาเซลเซียส) อัตราการให้อากาศ (1.0-3.0 kg/cm<sup>2</sup>) และ อัตราการกวน (50-150 rpm)

เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อทำการวิเคราะห์ การเจริญของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค spread plate โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Nutrient agar และทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Wongputtisin et al. (2012) จากนั้น คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย ( $\mu$ ) ผลได้ ( $Y_{p/x}$ ) และ Productivity ของเอนไซม์โปรตีนเอส และคัดเลือกระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะถังหมักขนาด 10 ลิตร (ซ้าย) 20 ลิตร (ขวา) ที่ผลิตจากวัสดุ polypropylene

### 5. การศึกษารูปแบบการหมักที่เหมาะสม

ดำเนินการหมัก 3 รูปแบบ ได้แก่ การหมักแบบกะ (Batch fermentation) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) และการหมักแบบ Fed-batch fermentation ใน ถังหมักขนาด 20 ลิตร (ปริมาตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำ 15 ลิตร) โดยใช้สภาวะการหมัก (อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวน) จากการศึกษาในหัวข้อก่อนหน้านี้ ในกรณีการ

หมักแบบ fed-batch ได้เลือกศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเติมอาหารที่ระดับ 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตร/12 ชั่วโมง ส่วนการหมักแบบต่อเนื่อง ทำการศึกษาที่อัตราการจ่ายอาหารเข้า-ออกที่ระดับ 1.5 มิลลิลิตร/นาที่ ซึ่งระหว่างดำเนินการหมัก ทำการศึกษา จลนพลศาสตร์ (Kinetics) ของการหมัก โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 6 หรือ 12 ชั่วโมงขึ้นกับรูปแบบการหมัก เพื่อวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย ( $\mu$ ) ผลได้ ( $Y_{p/x}$ ) และ Productivity ของเอนไซม์โปรตีนเอส เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแล้วคัดเลือกรูปแบบการหมักที่ให้ค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสที่ดีที่สุด

### 6. การทดสอบขยายการผลิตในถังหมักขนาด 50 ลิตร

ทำการทดสอบการหมักในถังหมักสแตนเลสชนิด STR (stirred tank reactor) ขนาด 50 ลิตร (ปริมาตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำ 30 ลิตร) ยี่ห้อ Applikon® รุ่น NAT'L BD 828 ต่อกับระบบควบคุม BIOCONTROLLER ADI1030 (Applikon®) และ อุปกรณ์ตรวจวัดอุณหภูมิและค่า pH นอกจากนี้ยังมีระบบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ TREVIL® ภายหลังจากฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ทำการเติมหัวเชื้อเชื้อปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ที่เตรียมในอาหารเหลว Nutrient broth ควบคุมอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนที่ระดับจากการศึกษาในการทดลองก่อนหน้านี้ และทำการหมักในรูปแบบกะ ดำเนินการหมักและทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ (Kinetics) ของการหมัก โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส จากนั้น คำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย ( $\mu$ ) ผลได้ ( $Y_{p/x}$ ) และ Productivity ของเอนไซม์โปรตีนเอส

## 7. การทดสอบผลิตถุงมืออย่างทางการแพทย์ด้วยน้ำ ยาล้างที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอส

ทำการทดสอบผลิตถุงมืออย่างทางการแพทย์ภายใต้สภาวะและสูตรการผลิตของโรงงานผลิตถุงมืออย่างพาราซึ่งมีสูตรโดยทั่วไปดังแสดงดังต่อไปนี้

**ตารางที่ 1** แสดงสูตรพื้นฐานของการผลิตถุงมือ  
อย่างพาราทางการแพทย์ของโรงงาน

องค์ประกอบ	phr
Latex	100
Stabilizer	1.2
Sulphur	1.0
Accelerator	1.2
Activator	0.5
Antioxidant	1.5
Pigment	0.4

\*หมายเหตุ: ชื่อบริษัทและรายละเอียดสารเคมีในแต่ละองค์ประกอบไม่ได้รับอนุญาตให้เปิดเผยและเผยแพร่

ขั้นตอนโดยย่อของการผลิตถุงมืออย่างในครั้งนี่คือ บ่มน้ำยาล้างชั้นชนิด high ammonia (กวนทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง) ที่มี DRC ประมาณ 60% ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในอัตราส่วน 200-300 ยูนิต/น้ำยาล้าง 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ผสมส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำยาล้าง ปรับให้ได้ค่า %TSC อยู่ที่ประมาณ 30% บ่มน้ำยาล้างร่วมกับสารเคมีตามสูตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (มีการกวนตลอดเวลา) ในส่วนของแม่พิมพ์ (Former) นั้น ทำการล้างให้สะอาดแล้วอบให้แห้งและให้ได้อุณหภูมิพื้นผิวประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วจุ่มสารเร่งการจับตัวในกลุ่ม Ca-nitrate ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนแห้ง ก็จะพร้อมสำหรับการนำไปจุ่มน้ำยาล้าง โดยจุ่มเป็นเวลา 15 วินาทีทิ้งไว้ให้แห้งสักเล็กน้อย แล้วแช่ในอ่างน้ำอุ่นประมาณ 40 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยการอบที่อุณหภูมิ 125 องศาเซลเซียส 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงนำมาแช่ในสารละลายคลอรีนและกรด สุดท้ายล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาดและอบให้แห้ง ก็จะได้ถุงมืออย่างทางการแพทย์ตามกระบวนการของโรงงาน

ทั้งนี้ ได้ทำการผลิตถุงมือทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัย สูตรที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า และสูตรที่ไม่บ่มกับเอนไซม์ (สูตรทั่วไปของโรงงาน) ถุงมือที่ผลิตได้ครั้งนี้ จะถูกนำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพตามมาตรฐาน ASTM D3578-05 (standard specification for examination gloves) ได้แก่ ค่าความหนา ค่า tensile (ก่อน-หลังบ่มเร่ง) และค่าความยืดเมื่อขาด (ก่อน-หลังบ่มเร่ง) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ STATISTIX<sup>®</sup> นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor ด้วย

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิต เอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตร

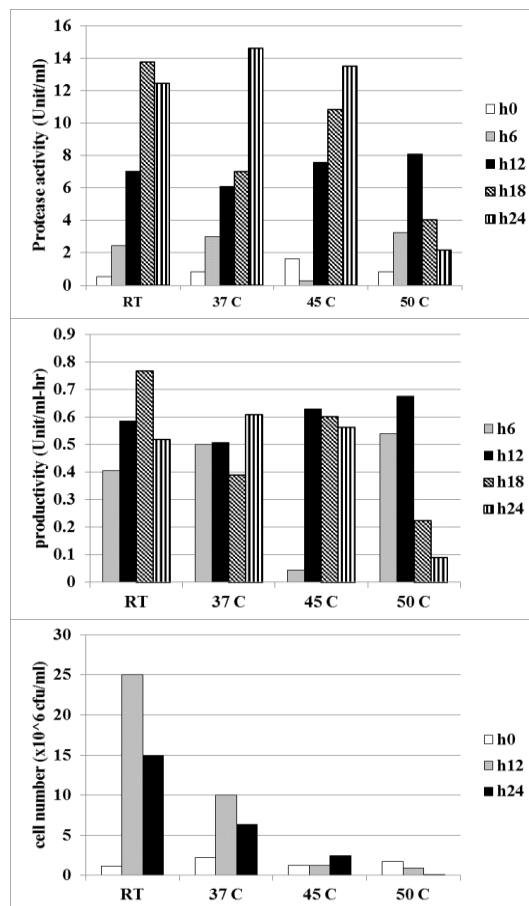
##### (1) ผลของอุณหภูมิ

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบหมักที่อุณหภูมิ 4 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 24 เพื่อวัดการเจริญของเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ และพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2 พบว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสค่อนข้างใกล้เคียงกันในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง 37 และ 45 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Gouda (2006) Abusham et al. (2009) และ Chantawannakul et al. (2002) ที่พบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ที่คัดเลือกสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 37 และ 42 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า Productivity ซึ่งหมายถึงการผลิตเอนไซม์ต่อหนึ่งหน่วยเวลา ก็จะเห็นว่าเอนไซม์ถูกผลิตมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องชั่วโมงที่ 18 สอดคล้องกับการเจริญของเชื้อที่พบว่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนั้น จะ

สังเกตได้ว่าพบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อน้อยมาก ซึ่งถึงแม้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การผลิตผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเซลล์ที่เจริญ (Product yield coefficient,  $Y_{p/x}$ ) แล้วได้ค่าค่อนข้างสูง แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอสสุทธิที่ผลิตขึ้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมินี้จึงไม่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตและการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียสแล้ว ก็พบว่าสูงค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว การให้ความร้อนเพื่อควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสถือเป็นอีกหนึ่งต้นทุนของการผลิต ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่จะใช้อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ในการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ภายในถังหมักที่มีการเจริญของจุลินทรีย์อยู่นั้น ความร้อนที่ได้รับนอกจากจะมาจากระบบให้ความร้อนแล้ว ยังสามารถมาได้จากความร้อนจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic heat) ของเซลล์ได้อีกด้วย หากกระบวนการระบายความร้อนทำไม่ได้ดีแล้ว จะกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Abusham et al., 2009) และที่สำคัญที่สุดคือความร้อนที่สูงเกินไปจะทำให้โครงสร้างเอนไซม์เสียสภาพได้ (denaturation)

## (2) ผลของอัตราการให้อากาศ

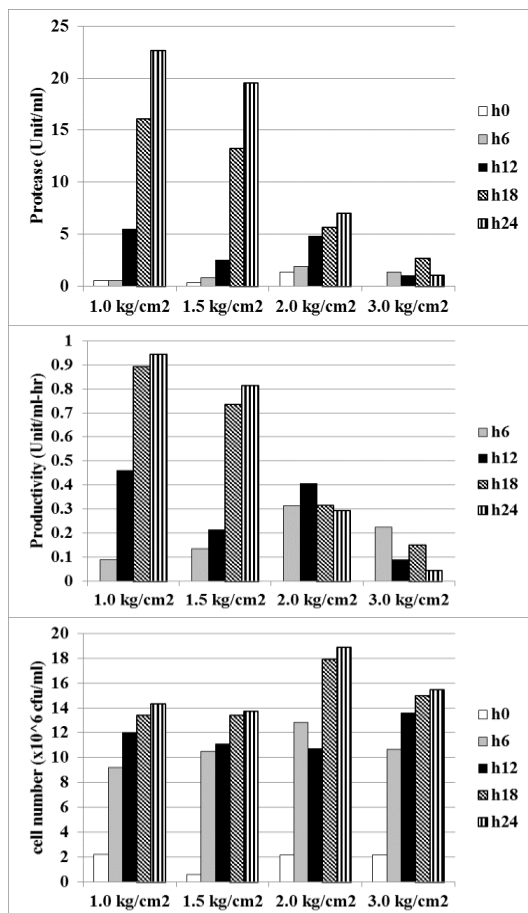
เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ในอาหารเหลวจากถั่วเหลืองที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม ( $1-3 \text{ kg/cm}^2$ ) โดยควบคุมอัตราการกวนอยู่ที่ 100 rpm แล้วเปรียบเทียบผลผลิตและการเจริญของเชื้อ ก็พบว่าเชื้อผลิตโปรติเอสและให้ค่า Productivity ได้สูงเมื่อให้อากาศที่ระดับ 1 และ  $1.5 \text{ kg/cm}^2$  (ภาพที่ 3) แต่ที่  $1 \text{ kg/cm}^2$  มีค่าสูงกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตแล้ว กลับพบว่าการให้อากาศที่ระดับ 2 และ  $3 \text{ kg/cm}^2$  มีค่าสูงกว่าการให้อากาศที่ระดับต่ำ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเป็นหลักไม่ใช่ชีวมวล ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศที่ระดับ  $1 \text{ kg/cm}^2$  สำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 2 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

ในระบบการหมักที่ออกแบบครั้งนี้ มีการให้อากาศผ่านทางปั๊มลมที่จ่ายอากาศเข้าสู่ถังหมักผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นอากาศจะแตกตัวเป็นฟองละเอียดด้วยหัวทรายภายในถังหมัก เพื่อให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากขึ้น ทั้งนี้อัตราการให้อากาศที่เพิ่มขึ้น ควรให้ออกซิเจนละลายในอาหารเหลวเพิ่มขึ้นและเชื้อสามารถเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์สูงขึ้นไปด้วย แต่ผลการทดลองครั้งนี้กลับพบว่าที่อัตราการให้อากาศระดับ  $2 \text{ kg/cm}^2$  เป็นต้น เชื้อผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ลดลง เหตุการณ์นี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Abusham et al. (2009) ที่เพิ่มอัตราการให้อากาศด้วยการเขย่าแล้วพบว่าเชื้อ *B. subtilis* มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลง ทั้งนี้ได้มีการอธิบายเหตุผล โดยอ้างอิงจาก Roychoudhury et al. (1988) ที่ระบุว่าอัตราการให้

อากาศที่สูงเกินไปอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง

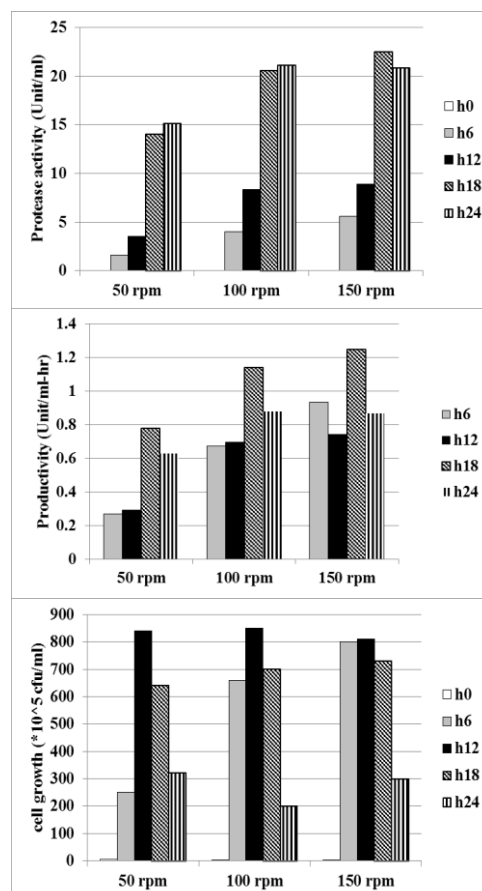


ภาพที่ 3 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงที่การให้อากาศระดับต่างๆ

(3) ผลของอัตราการกวน

ในระบบถังหมักที่ออกแบบนี้ นอกจากมีการให้อากาศด้วยปั๊มลมแล้ว ยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพการละลายของออกซิเจนในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อโดยการกวนด้วยใบกวน (impeller) อีกทั้งการกวนยังช่วยป้องกันการนอนกันของกากแก้วเหลืองที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการศึกษ้อัตราการกวน 3 ระดับ ตั้งแต่ 50-150 rpm โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้อากาศที่ระดับ 1.5 kg/cm² ผลการทดลองพบว่าอัตราการกวนที่สูงขึ้น มีแนวโน้มให้ผลิตเอนไซม์โปรติเอส การ

เจริญของเซลล์ และค่า productivity สูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยที่อัตราการกวน 100 และ 150 rpm ให้ผลใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าการให้อากาศและการกวนในระดับที่สูงทำให้เกิดฟองขึ้นในถังหมักที่เลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวต้นทุนต่ำซึ่งมีกากแก้วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลัก แต่เกิดฟองเล็กน้อยในถังหมักที่ใช้อาหารเหลว nutrient broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในระหว่างการหมักจำเป็นต้องเติมสารลดการเกิดฟอง (antifoam) เป็นระยะ ซึ่งฟองที่เกิดขึ้นนี้จะก่อผลเสียแก่การหมัก โดยทำให้อัตราการถ่ายเทแก๊สลดลงโอกาสปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกเพิ่มสูงขึ้น และยังทำให้เกิดการชะเอาเชื้อแบคทีเรียในถังหมักออกไปด้วย ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เลือกอัตราการกวนที่ระดับ 150 rpm แม้จะพบว่าเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและค่า productivity เพียงเล็กน้อย แต่สามารถช่วยเพิ่มการผสมและลดการนอนกันของกากแก้วเหลืองในถังหมักได้ดีกว่า



ภาพที่ 4 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* เมื่อเพาะเลี้ยงที่อัตราการกวนระดับต่างๆ

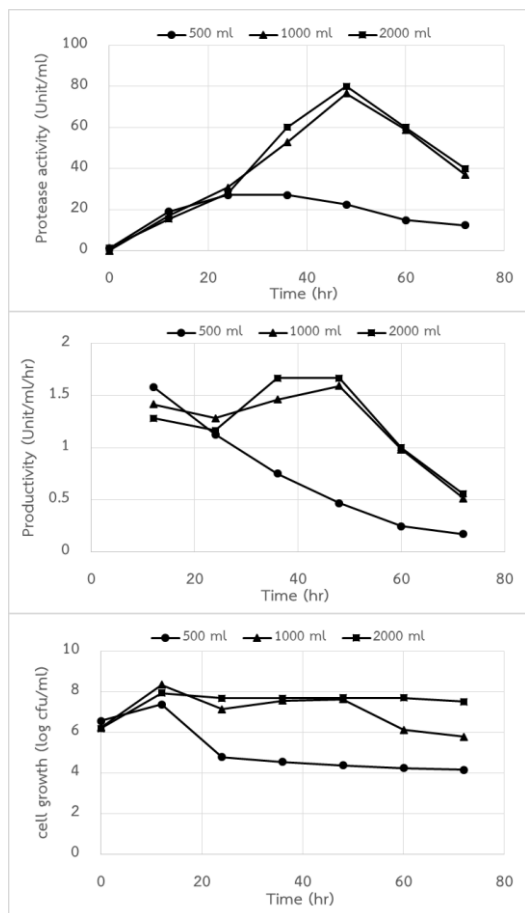
## 2. การศึกษารูปแบบการหมักที่เหมาะสม

ภายหลังทำการศึกษาหาสภาวะการหมักที่เหมาะสมเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ซึ่งพบว่าอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนที่เหมาะสมได้แก่ 28-30 องศาเซลเซียส 1 kg/cm<sup>2</sup> และ 150 rpm ตามลำดับ สภาวะดังกล่าวนี้ถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อในรูปแบบกึ่งกะและแบบต่อเนื่อง แต่เบื้องต้นพบปัญหาและข้อจำกัดในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยใช้ระบบถังหมักที่ออกแบบนี้ ที่ต้องมีการนำอาหารเข้า-ออกจากถังหมักตลอดเวลาโดยใช้ปั๊มไม่สามารถทำได้ เนื่องจากอนุภาคของกากถั่วเหลืองที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเหลือต้นทุนดำทำให้เกิดอุดตันในท่อส่งอาหาร อีกทั้งเมื่อทำการหมักเป็นเวลานาน กากถั่วเหลืองเกิดการบวมพอง (swelling) ก็ยิ่งทำให้ปัญหาการอุดตันเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงยังคงเหลือเพียงการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบกะและแบบกึ่งกะ

ในการหมักแบบกึ่งกะซึ่งจะมีการถ่ายอาหารเก่าออกจากถังหมักและเติมอาหารใหม่เข้าไปซึ่งจะเริ่มทำหลังชั่วโมงที่ 24 และทำทุก 12 ชั่วโมง ในอัตราที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 500 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตรต่อครั้ง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 5 จะเห็นว่าภายหลังจากถ่ายอาหารเก่าและเติมอาหารใหม่ลงไป ปริมาณ 1,000 และ 2,000 มิลลิลิตรแล้วเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นมาได้อีก ในขณะที่การถ่ายอาหารในอัตรา 500 มิลลิลิตรนั้น แม้เชื้อจะไม่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงชันอย่างชัดเจน แต่ก็พบว่าเอนไซม์ยังคงพบได้ในปริมาณที่ค่อนข้างคงที่เป็นเวลานานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามหลังจากชั่วโมงที่ 48 ก็พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดต่ำในทุกการทดลอง ค่า Productivity ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการทดลองถ่ายอาหาร 500 มิลลิลิตรลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วินาที 12 ในขณะที่อีกสองชุดการทดลองนั้น มีค่า productivity ที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน อีกทั้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและคงที่จนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นจึงลดลงอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้ ทั้งนี้ การถ่ายอาหารเก่าออกจากถังหมักนั้น

นอกจากจะถือเป็นการเก็บผลิตภัณฑ์ ยังสามารถช่วยลดการสะสมของของเสียจากระบบการหมักแบบอิมเมอร์สชันที่ จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Moon and Parulekar, 1990; Tabandeh et al., 2011) ส่วนการเติมอาหารใหม่ลงไป ก็เป็นกระตุ้นให้เชื้อสามารถเจริญมากขึ้นได้อีกจากสารอาหารใหม่ที่เติมลงไป ดังนั้นเราจึงเราสามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเติมและถ่ายอาหารต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม หากสูงเกินไป เชื้อก็จะเจริญเติบโตไม่ทัน ก็อาจจะถูกชะออกจากถังหมักไปได้ ทำให้การผลิตผลิตภัณฑ์ลดลง อีกหนึ่งประเด็นที่ต้องให้ความสำคัญในการหมักแบบนี้คือปัญหาการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์จากภายนอกในระหว่างกระบวนการถ่ายอาหารเข้า-ออก จากผลการทดลองในครั้งนี้ แม้อัตราการถ่ายอาหารเก่าออกจากถังหมักและการเติมอาหารใหม่เข้าไปในอัตรา 2,000 มิลลิลิตรจะให้ประสิทธิภาพการผลิตโปรติเอสสูงกว่าอัตรา 1,000 มิลลิลิตร แต่ผู้วิจัยเห็นว่าควรเลือกอัตรา 1,000 มิลลิลิตรในทุกๆ 12 ชั่วโมง เนื่องจากการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่ออาหารถูกเติมเพิ่มขึ้น 2 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตโปรติเอสในถังหมักขนาด 20 ลิตรในครั้งนี้ ระหว่างการหมักแบบกะและกึ่งกะแล้ว ก็จะพบว่าประสิทธิภาพที่แตกต่างกันดังสรุปในตารางที่ 2 การหมักแบบกะให้ผลผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 ส่วนการแบบกึ่งกะให้ผลผลิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 (เติมอาหารใหม่ 2 ครั้ง) จะเห็นว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและ product yield coefficient ที่ผลิตได้จากการหมักแบบกะต่ำกว่าการหมักแบบกึ่งกะอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แต่ค่า productivity ระหว่างการหมักแบบกะและกึ่งกะในชั่วโมงที่ 24 แตกต่างอย่างไม่มีความนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์การหมักแบบกึ่งกะ เมื่อใช้อัตราการถ่ายอาหารเข้า-ออกในระดับที่แตกต่างกัน

### 3. การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมักขนาด 50 ลิตร

จากข้อมูลในการทดลองก่อนหน้านี้ทำให้ทราบสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการนี้ผู้วิจัยได้ทดลองขยายการหมักในถังหมักขนาด 50 ลิตร (working volume 30 ลิตร) ซึ่งเป็นถังหมักชนิด stirred tank bioreactor (STR) มีระบบตรวจวัดและควบคุมอุณหภูมิ pH และปริมาณออกซิเจนแบบอัตโนมัติ (ภาพที่ 6) แต่ด้วยข้อจำกัดของอุปกรณ์ถังหมักทำให้สามารถทดลองเพาะเลี้ยงได้เพียงการหมักแบบกะเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก็ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 7 ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการหมักในถังขนาด 20 ลิตร โดยสามารถผลิตได้สูงสุดถึงกว่า 175

unit/ml ในเวลาเพียง 9 ชั่วโมง ทำให้ค่า productivity สูงถึง 13.47 unit/ml-hr การเจริญของเชื้อก็เช่นกันที่พบว่าค่อนข้างรวดเร็วและสามารถสูงได้ถึงกว่า 9 log cfu/ml จากกราฟแสดงการเจริญของ *Bacillus* แสดงให้เห็นว่าการเจริญในระยะ log phase สิ้นสุดในเวลาเพียงประมาณ 6 ชั่วโมงหลังเริ่มการหมัก แล้วจึงเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเมื่อพิจารณากลับไปยังกราฟแสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จะเห็นว่าเชื้อผลิตโปรติเอสได้สูงมากหลังชั่วโมงที่ 6 แล้วสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 9 ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Mosavian et al. (2012) ที่ระบุว่า *Bacillus* จะผลิต extracellular protease หลังการเจริญในระยะ log phase ประสิทธิภาพการหมักที่ได้จากถังหมักชนิดนี้ ถือว่าสูงกว่าประสิทธิภาพจากถังหมัก 20 ลิตรที่ออกแบบในงานวิจัยครั้งนี้มาก ดังตารางที่ 2 ซึ่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในถังหมัก 20 ลิตรและ 50 ลิตร ปัจจัยที่ทำให้ประสิทธิภาพการหมักสูงน่าจะมาจากประสิทธิภาพการควบคุมสภาวะคงการหมักให้คงที่ ทั้งอุณหภูมิและ pH แต่อย่างไรก็ตาม การควบคุมปริมาณออกซิเจนนั้น ทำได้ยากมากเนื่องจากปัญหาการเกิดฟองโดยปรกติแล้วหากพบว่าออกซิเจนลดลงจนอาจเป็นอันตรายต่อการเจริญของเซลล์ ระบบจะสั่งการให้เพิ่มการจ่ายอากาศหรือเพิ่มอัตราการกวนให้สูงขึ้น แต่ในกรณีอาหารเหลวที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบนี้ การเพิ่มอากาศหรือการกวนในอัตราเร็วที่สูงมักทำให้เกิดฟองขึ้นและล้นออกจากถังหมัก ในทางปฏิบัติจึงจำเป็นต้องเติมสารกำจัดฟองเป็นระยะเช่นเดียวกับการหมักในถังหมัก 20 ลิตร

ค่า pH ของอาหารเลี้ยง ถือเป็นปัจจัยที่สำคัญมากในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดย pH มีผลต่อการขนส่งสารอาหารและโมเลกุลหลายๆ ชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การเปลี่ยนแปลงค่า pH จะทำให้สมดุลของกรด-เบส และฟลักซ์ (fluxes) การถ่ายเทมวลของสารอาหารตัวกระตุ้น (inducers) และ growth factors หลายชนิดเปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งโครงรูป (conformation) ของโมเลกุลเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตออกมาแล้วก็อาจเปลี่ยนแปลงทำให้ไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวต้นทุนต่ำที่ใช้ใน

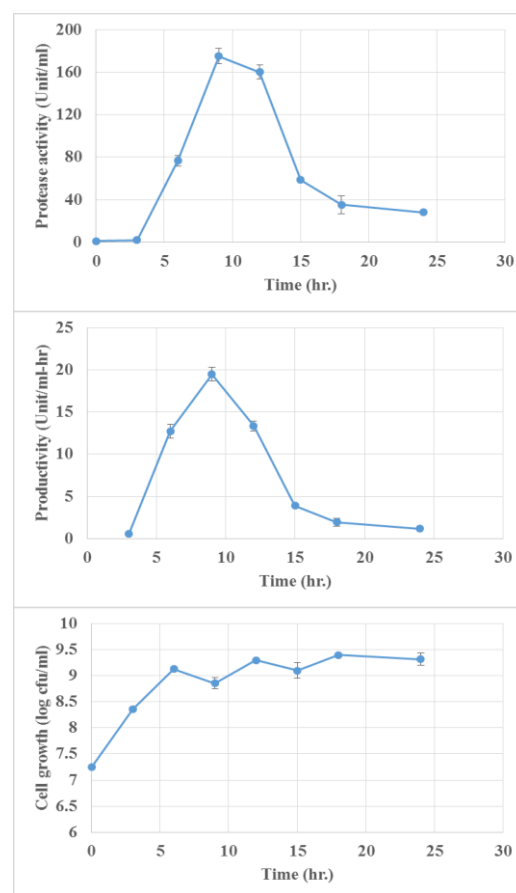
การศึกษาค้นคว้านี้มีแหล่งไนโตรเจนทั้งอินทรีย์ ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) และอนินทรีย์ (โปรตีนถั่วเหลือง) ดังนั้นในช่วงที่มีการนำไนโตรเจนอินทรีย์เข้าไปใช้ประโยชน์ในเซลล์ อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่า pH ที่ลดลง แต่หากมีการใช้ประโยชน์ไนโตรเจนอินทรีย์ ค่า pH จะสูงขึ้น (Bhunia et al., 2012) Moon and Parulekar (1990) ได้เปรียบเทียบการหมักแบบกะทั้งควบคุมและไม่ควบคุม pH เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสชนิด alkaline protease จาก *B. firmus* ผลการทดลองพบว่าเมื่อการหมักเสร็จสิ้น ถึงหมักที่ไม่ได้ควบคุม pH จะมีค่า pH ที่ลดต่ำลง และทำให้ค่า productivity ลดลงเช่นกัน โดยการผลิตโปรติเอสจะลดลงอย่างมากเมื่อ pH ลดต่ำกว่า 7.0 ดังนั้นการที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในถังหมัก 20 ลิตรได้ไม่สูงเท่าในถัง 50 ลิตรครั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป

Abusham et al. (2009) รายงานโดยอ้างอิงจาก Frankena et al. (1986) และ Rahman et al. (2005) เกี่ยวกับผลของอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่มีต่อประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน *Bacillus* โดยพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์เอนไซม์และพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่ซึ่งถูกควบคุมได้ด้วยอุณหภูมิและการนำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ในกลุ่ม extracellular enzyme (เช่นโปรติเอสจากงานวิจัยนี้) ที่อุณหภูมิส่งผลต่อการขับเอนไซม์ออกจากเซลล์ไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นอุณหภูมิของการหมักควรเปลี่ยนแปลงให้น้อยที่สุด

โดยสรุปแล้ว การหมักโดยมีการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงให้คงที่ น่าจะเป็นแนวทางที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้ได้ผลผลิตสูงสุด อาจจะไม่สำคัญว่าจะต้องเป็นถังหมักขนาดใดหรือทำจากวัสดุชนิดใด ระบบการควบคุมอัตโนมัติก็เป็นอีกหนึ่งอุปกรณ์ในการเฝ้าระวัง ควบคุมการหมักให้เกิดอย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะของถังหมักชนิด stirred tank bioreactor ขนาด 50 ลิตร ที่ใช้การทดลองหมักแบบกะ



ภาพที่ 7 ค่าจลนพลศาสตร์การหมักแบบกะเมื่อทำการหมักในถังหมัก STR ขนาด 50 ลิตร และมีการควบคุมสภาวะการหมักด้วยระบบควบคุมอัตโนมัติ

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ของการหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตรและ 50 ลิตร

พารามิเตอร์	แบบกะ (20L) 18 hr	แบบกึ่งกะ (20 L)		แบบกะ (50L) 9 hr
		24 hr	48 hr	
โปรตีนเอส (unit/ml)	22.42 ± 1.30	29.83 ± 1.76	76.0 ± 5.00	175.2 ± 7.41
Productivity (unit/ml/hr)	1.21 ± 0.45	1.28 ± 0.03	1.55 ± 0.13	13.47 ± 0.82
Product yield coefficient ( $Y_{p/x}$ )	2.8 ± 0.13	4.27 ± 0.55	10.07 ± 0.46	17.28 ± 0.59

#### 4. การผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยน้ำยางที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรตีนเอส

การทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์สารเคมี สูตร อุปกรณ์และเทคนิคการทำถุงมือจากบริษัทผู้ผลิตถุงมือยางแห่งหนึ่งในจังหวัดสงขลา ทำการผลิตทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่ สูตรมาตรฐานของโรงงาน สูตรเติมเอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้า (6L) และสูตรเติมเอนไซม์โปรตีนเอสจากงานวิจัย (MR10) โดยเอนไซม์จากงานวิจัยนี้ ผลิตมาจากการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว ต้นทุนต่ำที่มีกากแก้วเหลือเป็นส่วนประกอบและหมักในถังหมักขนาด 20 ลิตร ผลการทดลองพบว่าถุงมือสูตร MR10 มีลักษณะปรากฏที่ใกล้เคียงกับสูตรมาตรฐานของโรงงานทั้งในด้านความหนา สี และผิวสัมผัส ในขณะที่สูตร 6L ที่เติมเอนไซม์ทางการค้านั้นมีลักษณะแตกต่าง โดยมีผิวที่บางกว่าและขาดง่าย อีกทั้งพื้นผิวของถุงมือค่อนข้างเหนียว ทำให้ต้องใช้แปรงในปริมาณมากเพื่อลดการเกาะตัวของถุงมือ ความหนาของถุงมือแต่ละสูตรแสดงดังตารางที่ 3 นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่าการบ่มน้ำยางร่วมกับเอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้าทำให้น้ำยางบางส่วนเสียสภาพและจับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากสารรักษาสภาพเอนไซม์ที่ถูกผสมในสารละลายเอนไซม์ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของอนุภาคยาง

ผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของถุงมือทั้งสามสูตรทั้งก่อนและหลังการบ่มเร่ง พบว่าถุงมือที่เติมเอนไซม์โปรตีนเอสทั้งสองสูตรมีความแข็งแรงในรูปของค่า Tensile และ stress at 500% ที่ต่ำกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน (ตารางที่ 4-5) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตร 6L มีเพียงค่าความยืดเมื่อขาด (elongation at break) เท่านั้นที่มีค่าสูงกว่าสูตรมาตรฐานของโรงงาน ดังแสดงผลในตารางที่ 5 และเมื่อเปรียบเทียบสมบัติของถุงมือยางที่ผลิตครั้งนี้กับข้อกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ Rubber examination glove (ASTM D3578-05) type II แล้ว พบว่าความหนาของถุงมือทุกสูตรผ่านมาตรฐาน ส่วนค่า Tensile นั้นพบว่าสูตรของโรงงานผ่านมาตรฐาน แต่สูตรที่เติมเอนไซม์ไม่ผ่านมาตรฐาน แต่อย่างไรก็ตาม ภายหลังการบ่มเร่งแล้ว พบว่าสูตร MR10 มีค่าสูงขึ้นและผ่านมาตรฐานได้ในขณะที่ค่า Stress at 500% elongation ก็พบว่ามีเพียงสูตรของโรงงานเท่านั้นที่ผ่านมาตรฐาน

เป็นที่น่าสังเกตว่าถุงมือยางสูตรที่เติมเอนไซม์โปรตีนเอสแล้วนำมาผลิตถุงมือตามกระบวนการของโรงงานน่าจะเกิดการวัลคาไนซ์ (vulcanization) ที่ไม่สมบูรณ์ สังเกตได้จากภายหลังการบ่มเร่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแล้วพบว่าสมบัติเชิงกลด้านต่างๆ ดีขึ้น ทั้งนี้สันนิษฐานว่าการดอมีโนที่เกิดจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรตีนเอสอาจทำให้สภาพความเป็นกรดส่วนผสมยางสูงขึ้น ลักษณะเช่นนี้มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดการเชื่อมขวาง (cross-link) ของยางได้ ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Perrella and Gasperi (2002) ที่รายงานว่าการผลิตถุงมือยางจากน้ำยางที่มีการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรตีนเอสชนิด alkaline protease ในปริมาณ 0.025% เป็นเวลา 1-2 วัน ถุงมือที่ได้ยังคงผ่านมาตรฐาน ASTM3578 แต่ในรายงานไม่ได้ระบุสถานะในการวัลคาไนซ์น้ำยาง ดังนั้นหากจะมีเอนไซม์โปรตีนเอสมาใช้ในกระบวนการผลิตถุงมือแล้ว จำเป็นต้องมีการศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมของการวัลคาไนซ์น้ำยางเพื่อให้ได้ถุงมือยางที่มีคุณภาพต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงความหนาโดยเฉลี่ยของถุงมือ

สูตรถุงมือ	ความหนาเฉลี่ย (มิลลิเมตร) $\pm$ SD		
	ก่อนบ่ม แรง	หลังบ่มแรง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	0.143 $\pm$ 0.003	0.144 $\pm$ 0.002	0.08
สูตรโรงงาน + เอนไซม์การค้า 6L	0.128 $\pm$ 0.002	0.133 $\pm$ 0.003	
สูตรโรงงาน + เอนไซม์จาก งานวิจัย MR10	0.145 $\pm$ 0.002	0.146 $\pm$ 0.005	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น

ตารางที่ 4 แสดงค่า Tensile ของถุงมือสูตรต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการบ่มแรง

สูตรถุงมือ	ค่า Tensile (MPa) $\pm$ SD		
	ก่อนบ่มแรง	หลังบ่มแรง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	15.56 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>	15.91 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	14 (ก่อน- หลังบ่มแรง)
สูตรโรงงาน + เอนไซม์การค้า 6L	4.55 $\pm$ 0.42 <sup>c</sup>	7.55 $\pm$ 0.61 <sup>c*</sup>	
สูตรโรงงาน + เอนไซม์จาก งานวิจัย MR10	8.47 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>	14.7 $\pm$ 1.71 <sup>b*</sup>	

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น
- ตัวอักษร a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- \* คือค่าเฉลี่ยของก่อนและหลังบ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 แสดงค่า stress at 500% ของถุงมือสูตรต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการบ่มแรง

สูตรถุงมือ	Stress at 500% $\pm$ SD		
	ก่อนบ่ม แรง	หลังบ่ม แรง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	2.84 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	3.67 $\pm$ 0.19 <sup>a*</sup>	2.8 (ก่อนบ่มแรง)
สูตรโรงงาน + เอนไซม์การค้า 6L	1.19 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	1.53 $\pm$ 0.19 <sup>c*</sup>	
สูตรโรงงาน + เอนไซม์จาก งานวิจัย MR10	1.51 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	2.36 $\pm$ 0.33 <sup>b*</sup>	

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น
- ตัวอักษร a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- \* คือค่าเฉลี่ยของก่อนและหลังบ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 แสดงค่าความยืด ณ จุดขาดของถุงมือสูตรต่างๆ ทั้งก่อนและหลังการบ่มแรง

สูตรถุงมือ	ความยืด ณ จุดขาด (เปอร์เซ็นต์) $\pm$ SD		
	ก่อนบ่ม แรง	หลังบ่ม แรง	มาตรฐาน ASTM D3578-05
สูตรโรงงาน	808.7 $\pm$ 44.5 <sup>b</sup>	739.3 $\pm$ 31.4 <sup>b*</sup>	650% (ก่อน บ่มแรง)
สูตรโรงงาน + เอนไซม์การค้า 6L	853.4 $\pm$ 47.3 <sup>b</sup>	862.6 $\pm$ 56.9 <sup>a</sup>	500% (หลัง บ่มแรง)
สูตรโรงงาน + เอนไซม์จาก งานวิจัย MR10	910.8 $\pm$ 76.9 <sup>a</sup>	821.8 $\pm$ 42.2 <sup>a*</sup>	

หมายเหตุ

- ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น
- ตัวอักษร a, b ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
- \* คือค่าเฉลี่ยของก่อนและหลังบ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยที่ได้รับในครั้งนี้นำมาทำให้สามารถสรุปได้ว่า สภาพที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 ด้วยอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่มีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักในถังหมักขนาด 20 ลิตร คือการหมักที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 kg/cm<sup>2</sup> และมีการกวนด้วยใบพัดที่อัตราเร็ว 150 rpm ภายใต้สภาวะดังกล่าวและมีการหมักในรูปแบบกะ (batch fermentation) จะสามารถทำให้ได้ค่า productivity เท่ากับ 1.21 unit/ml-hr แต่ค่า productivity จะสามารถเพิ่มขึ้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ หากทำการเพาะเลี้ยงในรูปแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่มีการเติมอาหารใหม่ 1 ลิตรในทุก 12 ชั่วโมงภายหลังการเพาะเลี้ยงแบบกะไปแล้ว 24 ชั่วโมง และค่า productivity จะเพิ่มขึ้นกว่า 10 เท่า หากทำการหมักในถังหมักที่มีการควบคุมสภาวะแวดล้อมของการหมักให้คงที่ ดังเช่นการใช้ถังหมัก STR ขนาด 50 ลิตร เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ครั้งนี้ เมื่อนำมากำจัดโปรตีนในน้ำยางข้นแล้วนำไปผลิตเป็นถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน พบว่าส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง สมบัติเชิงกลของถุงมือได้แก่ ค่า tensile และค่า stress at 500% จึงไม่ผ่านมาตรฐาน ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากจะมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยางอีกครั้ง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

## เอกสารอ้างอิง

นุชนาฏ ฌ ระนอง และ วราภรณ์ ขจรไชยกูล.

“เทคโนโลยีการลดโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ”.วารสาร  
 ยางพารา, 16(2539): 81-90.

Abusham, R.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B.

and Basri, M. 2009. Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent-tolerant protease from a newly isolated halo tolerant *Bacillus subtilis* strain Rand. *Microbial Cell Factories* 8: 1-9.

Bhunja, B., Basak, B. and Dey, A. 2012. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. *Journal of Biochemical Technology* 3(4): 448-457.

Chang, Y-H., Chang, K-S., Huang, C-W., Hsu, C-L. and Jang, H-D. 2012. Comparison of Batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. *Fuel* 97: 166-173.

Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote., and Lumyong, S. (2002). Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia* 28: 241-245.

Frankena, J., Koningsstein, G.M., Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 24: 106-112.

Gouda, M.K. 2006. Optimization and purification of alkaline protease produced by marine *Bacillus* sp. MIG newly isolated from eastern harbor of Alexandria. *Polish Journal of Microbiology* 55: 119-126.

Moon, S-H and Parulekar, S.J. 1991. A

- parametric study of protease production in batch and fed-batch culture of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 467-483.
- Mosavian, M.T.H., Sargolzaei, J., Tabandeh, F., Moghaddam, H.R.H. and Yakhchali, B. 2012. Examining kinetic parameters of fermentation process and batch cultures on the production of alkaline protease. *African Journal of Biotechnology* 11: 6335-6344.
- Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.
- Roychoudhury, S., Parulekar, S.J., Weigand, W.A. 1988. Cell Growth and  $\alpha$ -amylase production characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnol Bioeng* 33: 197-206.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy: historical perspective. *Methods* 27: 3-9.
- Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Khongbantad, W., Niamsup, P. and Lumyong, S. 2012. Screening and selection of *Bacillus* spp. for fermented corticate soybean Meal production. *Journal of Applied Microbiology* 113, 798-806.
- Yeang, H.-Y. 2004. Natural rubber latex allergen: new developments. *Current Opinion In Allergy and Clinical Immunology* 4: 99-104.
- Yeang, H.Y., Arif, S.R.M., Yudof, F., and Sunderasan, E. 2002. Allergenic proteins of Natural rubber latex. *Methods* 27: 32-45.

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10  
เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา  
Purification and characterization of protease from *Bacillus subtilis* MR10 for  
degradation of allergenic protein in rubber latex

ชาติชาย โชนงนุช และ กวีวัฒน์ บุญคาน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

*Bacillus subtilis* MR10 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทยและมีรายงานว่าสามารถผลิตโปรตีโอสไลติกเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง โปรตีเอสหยาบที่ผลิตโดย *B. subtilis* MR10 สามารถย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราได้ ทำให้เกิดแนวความคิดในการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราติดก่อนการนำไปแปรรูป การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีเอสสามารถทำบริสุทธิ์ได้โดยเริ่มจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-Sephadex C-50) และเจลฟิลเทรชัน (Sephacryl S-100) ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรตีเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรตีเอส 2 (P2) เอนไซม์บริสุทธิ์ P1 และ P2 มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3950 และ 3238 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ P1 และ P2 เสถียรในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรตีเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของโลหะ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 เอนไซม์โปรตีเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เช่นเดียวกับโปรตีเอสหยาบ

ABSTRACT

*Bacillus subtilis* MR10 isolated from Tua-nao, a traditional Thai fermented soybean food, was previously reported to be highly produced proteolytic enzymes. Crude protease from *B. subtilis* MR10 could degrade allergenic proteins in rubber latex serum and it was proposed to be used in allergenic proteins removal from rubber latex before processing. Proteases from *B. subtilis* MR10 was purified by ammonium sulphate precipitation, ion exchange chromatography (CM-Sephadex C-50) and gel filtration (Sephacryl S-100) techniques, respectively. It was found that crude protease was consisted of two proteases, Protease 1 (P1) and Protease 2 (P2). The purified P1 and P2 had a specific activity 3950 and 3238 U/ mg protein, with a purification fold of 26.6 and 21.8, respectively. The molecular weights of P1 and P2 were approximately 45 and 30 kDa. The optimal pH for the P1 and P2 activity was 9.0 and 8.0 while the optimal temperatures were 45-55 and 45-50°C, respectively. P1 and P2 were stable at pH range of 5.0-10.0 and 7.0-10.0, respectively. Kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  of P1 were 8.0 mg·ml<sup>-1</sup> and 3840 μg·ml<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup> respectively, while those of P2 were 13.8 mg·ml<sup>-1</sup> and 5302 μg·ml<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>. Two proteases showed the same in substrate specific against casein. In addition,  $Ag^+$  and  $Hg^{2+}$  were found to inhibit the enzyme activity of P1, while  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , EDTA and SDS were found to inhibit the enzyme activity of P2. Both P1 and P2 proteases demonstrated the capability to degrade allergenic protein as found in crude enzyme.

## บทนำ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ส่วนใหญ่น้ำยางจะถูกแปรรูปเป็นบล็อกหรือแผ่นยางสำหรับส่งออกไปยังประเทศในเอเชีย เช่น จีน มาเลเซีย และญี่ปุ่น สำหรับเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ลูกโป่ง ถุงมือ ถุงยางอนามัย จุกนมทารก และสายสวนปัสสาวะ ซึ่งใช้น้ำยางเป็นสารตั้งต้น ปัจจุบันราคาน้ำยางลดลงเมื่อเทียบกับไม่กี่ปีที่ผ่านมา เพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ที่ทำจากยางจึงจำเป็นต้องปรับปรุงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพยิ่งขึ้น ซึ่งในน้ำยางมีโปรตีนจำนวนมากที่สามารถทำให้เกิดโรคภูมิแพ้กับคนที่ใช้ผลิตภัณฑ์ยางได้โดยเฉพาะถุงมือยาง การแพ้ยางได้รับการจัดอันดับว่าทำให้เกิดอาการอักเสบของผิวหนัง ระบายเคือง และเกิดภูมิแพ้ที่เป็นอันตรายต่อชีวิตมนุษย์ (Sussman et al., 2002) ดังนั้นกระบวนการที่สำคัญในการแปรรูปยาง โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์คือ การกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ งานวิจัยรายงานว่าการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในซีรัมยางสามารถกำจัดโดยแอมโมเนีย แต่วิธีนี้อาจกระทบกับคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำยาง (Perrella และ Gaspari, 2002) การศึกษาก่อนหน้านี้มีพบว่าโปรตีนเฮยาบจาก *Bacillus subtilis* MR10 สามารถย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางได้ อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลที่ชัดเจนของเอนไซม์และกลไกการทำงานของโปรตีนดังกล่าว มีการศึกษาศึกษาการเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *B. subtilis* MR10 เพื่อใช้ย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนภายใต้โครงการ “การคัดเลือกโปรตีนเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027)” และ “การเตรียมโปรตีนเอสในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยางสด (สัญญาเลขที่ RDG5350029)” พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสในรูปแบบผงที่สะดวกต่อการเก็บรักษาและใช้งานได้ ทั้งยังพบว่าโปรตีนดังกล่าวสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้บางชนิดในน้ำยางพาราสดได้ ดังผลการศึกษาจากโครงการ “การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045)” แต่อย่างไรก็ตาม

เอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีความหลากหลาย ทั้งในแง่ของโครงสร้าง และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ แม้ว่าเอนไซม์โปรตีนเฮยาบที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 จะแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ได้ แต่เพื่อให้การนำเอนไซม์โปรตีนเอสมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดว่าเอนไซม์ที่ *B. subtilis* MR10 มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาอย่างไร รวมทั้งต้องทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เพื่อการยืนยันความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา

ผู้วิจัยคาดว่า การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์เฮยาบไปใช้ประโยชน์ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ และสามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา

## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย และการผลิตเอนไซม์

เตรียมกล้าเชื้อโดยการถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 จาก stock culture ลงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้อากาศโดยทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหาร NB หรือสูตรกากถั่วเหลืองปรับปรุง ปริมาตร 3.5 ลิตรที่บรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ตามวิธีของไพโรจน์ (2552) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียครบ 24 ชั่วโมง เก็บ

เกี่ยวผลผลิตเอนไซม์โดยการเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของสารละลายใสเพื่อตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และใช้เป็นเอนไซม์หยาบในการทดลองขั้นต่อไป

## 2. ศึกษาการทำ Salt fractionation (Deutscher, 1990)

นำส่วนของสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการแยกเซลล์ออกแล้วมาศึกษาถึงการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 20-40, 40-60, 60-80% แยกตะกอนด้วยการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากนั้นนำไปทำไดแอไลซิสเพื่อกำจัดเกลือออกจากสารละลายเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 จนกว่าจะเกิดสมดุระหว่างเอนไซม์และบัฟเฟอร์ ตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของแต่ละช่วงการตกตะกอน คัดเลือกช่วงของการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำให้ได้ปริมาณค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

## 3. การทำบริสุทธิ์โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) (Deutscher, 1990)

เตรียมคอลัมน์ที่บรรจุ CM-sephadex C-50 ที่ทำให้สมดุด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 จากนั้นผ่านเอนไซม์เข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ไซโปรตีนที่ไม่จับกับ CM-sephadex C-50 ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมแล้วเริ่มชะเพื่อเก็บเอนไซม์โปรตีนเอสสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ ความเข้มข้น 0.1-0.5 โมลาร์ สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ขั้นตอนนี้จะเก็บเอนไซม์ในหลอดๆ ละ 20 มิลลิลิตร ซึ่งนับเป็น 1 แฟร็กชัน (fraction) เพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) แล้วสร้างโครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสและค่า A280 กับจำนวนแฟร็กชัน ทำการรวม

แฟร็กชันที่มีพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดเข้าด้วยกัน และทำการกำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ด้วยวิธีการผ่านเยื่อกรองขนาด 10 กิโลดาลตัน และล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิม โดยเอนไซม์ที่สนใจจะไม่สามารถผ่านเยื่อกรองได้ ด้วยวิธีนี้จะทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นขึ้นและสามารถลดความเข้มข้นของเกลือได้ นำเอนไซม์ที่เข้มข้นแล้วผ่านคอลัมน์ที่บรรจุ Sephacryl S-100 ทำให้สมดุด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 และค่อยๆ ชะเอาโปรตีนอื่นออก รวมถึงเอนไซม์โปรตีนเอสด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จนกว่าจะพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ เทคนิคนี้จะเก็บสารละลายที่ชะออกมาแฟร็กชันละ 2 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A280) แล้วสร้างโครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสและค่า A280 กับจำนวนแฟร็กชัน พร้อมกับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในแต่ละแฟร็กชันด้วย SDS-PAGE

## 4. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดย Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

ใช้วิธีของ Kanpiengjai และคณะ (2015) โดยใช้เจลอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 12% ในการแยกชนิดและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน

## 5. ศึกษาสมบัติของเอนไซม์

### 5.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสตามวิธีมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรม (พีเอช 7.5 เวลา 10 นาที) โดยใช้อุณหภูมิ 20-65 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ค่าร้อยละกิจกรรมสัมพันธ์ (%relative activity) อุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น 100% สำหรับผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ

เอนไซม์ สามารถทำได้โดยการนำเอนไซม์บ่มที่อุณหภูมิ 20-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นภายใต้อุณหภูมิน้ำแข็งแล้วจึงวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมที่มีอยู่ตอนเริ่มต้น (คิดเป็น 100%) และคำนวณหาค่าร้อยละกิจกรรมสัมพัทธ์ (%relative activity)

## 5.2 การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธี

มาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ค่ากิจกรรม (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที) ภายใต้ระบบบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 3-10 แล้ววิเคราะห์ค่าร้อยละกิจกรรมสัมพัทธ์ (% relative activity) พีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคิดเป็น 100% สำหรับผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ สามารถทำได้โดยการนำเอนไซม์บ่มกับเคซีนที่มีพีเอชแตกต่างกันระหว่าง 3-10 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้เปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมที่มีอยู่ตอนเริ่มต้น (คิดเป็น 100%) และคำนวณหาค่าร้อยละกิจกรรมสัมพัทธ์ (% relative activity)

## 5.3 การตรวจสอบผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีมาตรฐานที่มีไอออนและสารเคมีบางชนิดความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ได้แก่ KCl LiCl NaCl AgNO<sub>3</sub> NiCl<sub>2</sub> FeCl<sub>2</sub> MgSO<sub>4</sub> Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CaCl<sub>2</sub> MnCl<sub>2</sub> CuSO<sub>4</sub> HgCl<sub>2</sub> CoCl<sub>2</sub> BaCl<sub>2</sub> AlCl<sub>3</sub> EDTA SDS และ Mercaptoethanol คำนวณค่าร้อยละกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ไม่เติมไอออนหรือสารเคมี

## 5.4 การวิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์กับซับสเตรทและค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธี

มาตรฐานโดยใช้ซับสเตรทที่แตกต่างกันได้แก่ เคซีน เจลาติน และอัลบูมิน ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อซับสเตรท

โดยแสดงเป็นค่าร้อยละกิจกรรมสัมพัทธ์เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อทำปฏิกิริยากับเคซีน สำหรับการวิเคราะห์ค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทำได้โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีมาตรฐาน โดยแปรผันความเข้มข้นของเคซีนให้อยู่ในช่วง 5-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้วิเคราะห์หาค่าทางจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ด้วยโปรแกรม Sigma plot เวอร์ชัน 12.0 ซึ่งเป็นไปตามสมการของ Lineweaver-Burk ดังนี้

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

## 6. การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor ด้วยเทคนิค dot blot

เตรียมน้ำยาราดำพร้าโปรตีนต่ำสำหรับใช้ใน

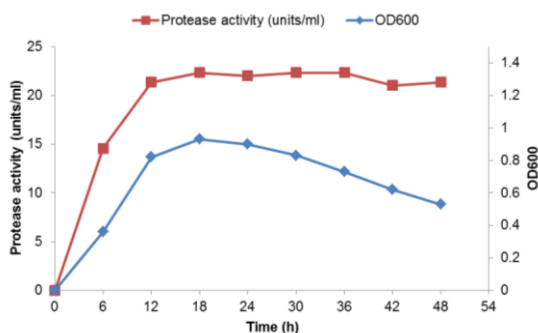
งานวิจัย ผสมน้ำยาราดำพร้าสดกับน้ำกลั่นในสัดส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นเติมโปรติเอสในสัดส่วนโปรติเอส 500 ยูนิตต่อ น้ำยาราดำพร้า 100 ml พร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ นำน้ำยาราดำพร้าโปรตีนต่ำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูเฉพาะส่วนของเหลวชั้นกลางออกมาก ใช้ของเหลวดังกล่าวเป็นตัวอย่างของซีรัมในการวิเคราะห์หาโปรตีนภูมิแพ้ต่อไป

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 1. การเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เพื่อผลิตเอนไซม์

พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จากถังหมักแบบกวนผสมได้ โดยสามารถผลิตเอนไซม์เท่ากับ 22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอในการนำมาใช้ศึกษาครั้งนี้ สารละลายเอนไซม์ที่ได้มีลักษณะสี

อมเหลือและไม่มีความชุ่ม แต่อย่างไรก็ตาม สารละลาย เอนไซม์ที่ผลิตได้นี้จำเป็นต้องนำไปผ่านขั้นตอนการทำ ให้บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น เพื่อสามารถศึกษาคุณสมบัติ ด้านอื่นๆ ของเอนไซม์ต่อไป



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและเซลล์ของ *B. subtilis* MR10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร nutrient broth ที่ 37 องศาเซลเซียส

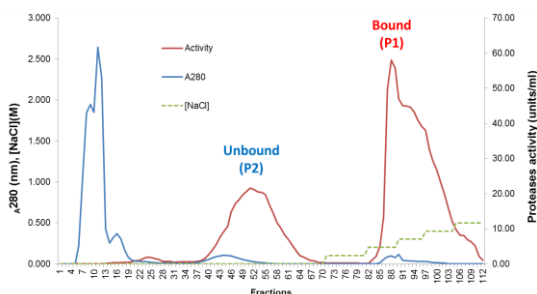
## 2. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 โดยการตกตะกอนเอนไซม์โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแบบลำดับส่วน (salt fractionation) พบกิจกรรมของเอนไซม์ปริมาณมากกว่า 60% ในช่วงการใช้เกลือความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตระหว่าง 40-80% ทั้งนี้ หากเลือกตกตะกอนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 40% จะทำให้ได้เอนไซม์เพียง 4% เท่านั้น และหากใช้ความเข้มข้นมากกว่า 80% ก็เป็นการสิ้นเปลืองและยังพบว่ามีโปรตีนชนิดอื่นตกตะกอนลงมาเพิ่มด้วย ส่งผลต่อความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิต จึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในขั้นต้น ตารางที่ 1 ตารางสรุปผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 เริ่มทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสด้วยกิจกรรมของเอนไซม์อย่างหยาบจำนวน 44,500 ยูนิต ซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 148.3 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ภายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 1.1 เท่า และได้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกลับคืนมาจำนวน 30,000 ยูนิต นำเอนไซม์จำนวนนี้ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cation exchange chromatography โดยใช้ตัวกลางประจุ

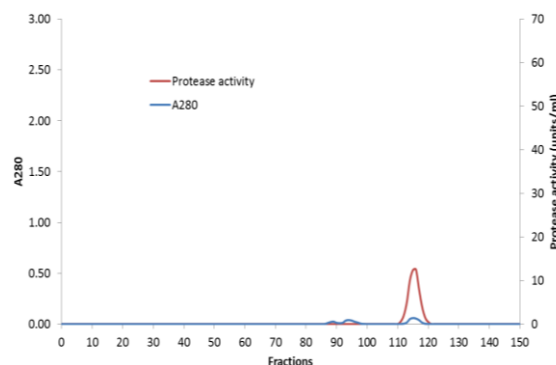
คงที่คือ CM-sephadex C-50 ในสภาวะที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ หลังจากผ่านเอนไซม์เข้าไปยังตัวกลางและทำการชะด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-0.5 โมลาร์ ทำให้ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 2 พบว่าโครมาโทกราฟีสามารถแยกเอนไซม์โปรติเอสอย่างหยาบออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ P1 และ P2 และ P1 ให้ค่ากิจกรรมหลักของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดประมาณ 10,000 ยูนิต เอนไซม์นี้แสดงประจุโมเลกุลเป็นประจุบวกภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ ในขณะที่ P2 เป็นกิจกรรมรองของเอนไซม์โปรติเอสและมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 4,900 ยูนิต และแสดงประจุลบโมเลกุลเป็นประจุลบทำให้ถูกชะออกมาได้อย่างง่ายโดยปราศจากการชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ด้วยวิธีการทำบริสุทธิ์ด้วย CM-sephadex C-50 ทั้ง P1 และ P2 มีความบริสุทธิ์ขึ้นถึง 22.8 และ 11.1 เท่า เปรียบเทียบกับเอนไซม์อย่างหยาบ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* MR10 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างน้อย 2 ชนิด อย่างไรก็ตามการบ่งชี้ชนิดของเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนภูมิแพ้น้ำยาพาราจิงจำเป็นต้องทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสองชนิดต่อไปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิลเทรชัน โดยใช้ตัวกลางคงที่คือ sephacryl S-100 ที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 7.5 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงเป็นโครมาโทแกรมในภาพที่ 3 และ 4 จากการทดลองได้เอนไซม์ P1 และ P2 ที่บริสุทธิ์ขึ้น ถึง 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ และเอนไซม์ทั้งสองมีความบริสุทธิ์เมื่อวิเคราะห์ดูความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังภาพที่ 5 และสามารถประมาณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีทั้งสองเป็น 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โปรติเอสที่พบใน *Bacillus* sp. (Farhadian และคณะ 2015; Uttatree; Ferrareze et al., 2016) โดยเฉพา เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. amyloliquefaciens* FSE-68 ที่พบว่าเป็น neutral metalloprotease (32 กิโลดาลตัน) และ alkaline serine protease (27 กิโลดาลตัน) (Cho et al., 2003)

ตารางที่ 1 สรุปผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

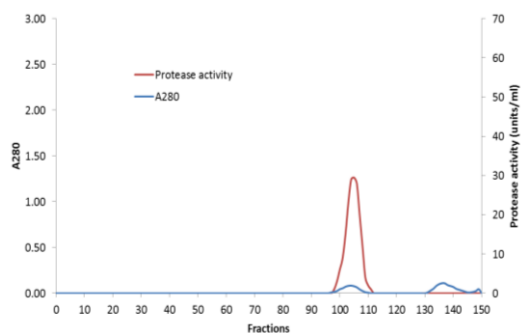
Step		Total activity	Total protein	Specific activity	Purification	Recovery
		(Units)	(mg)	(U/mg)	(fold)	(%)
Crude enzyme		44,500	300	148.3	1.0	100.0
Precipitation		30,100	188	160.1	1.1	67.6
CM-Sephadex	P1	10,162	12	846.8	5.7	22.8
	P2	4,922	6	820.3	5.5	11.1
Sephacryl S-100	P1	5,530	1.4	3,950.0	26.6	12.4
	P2	2,590	0.8	3,237.5	21.8	5.8



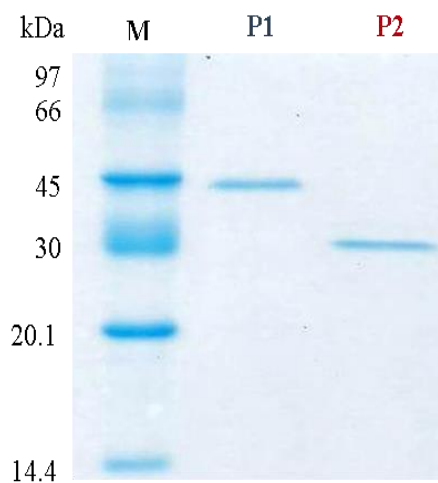
ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ด้วย CM-Sephadex C-50 ภายใต้สภาวะที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตพีเอช 7.5 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์พีเอช 7.5



ภาพที่ 4 โครมาโทแกรมของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอส P2 จาก *B. subtilis* MR10 ด้วย Sephacryl S-100 ภายใต้อุณหภูมิที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอส P1 จาก *B. subtilis* MR10 ด้วย Sephacryl S-100 ภายใต้อุณหภูมิที่สมดุลด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5



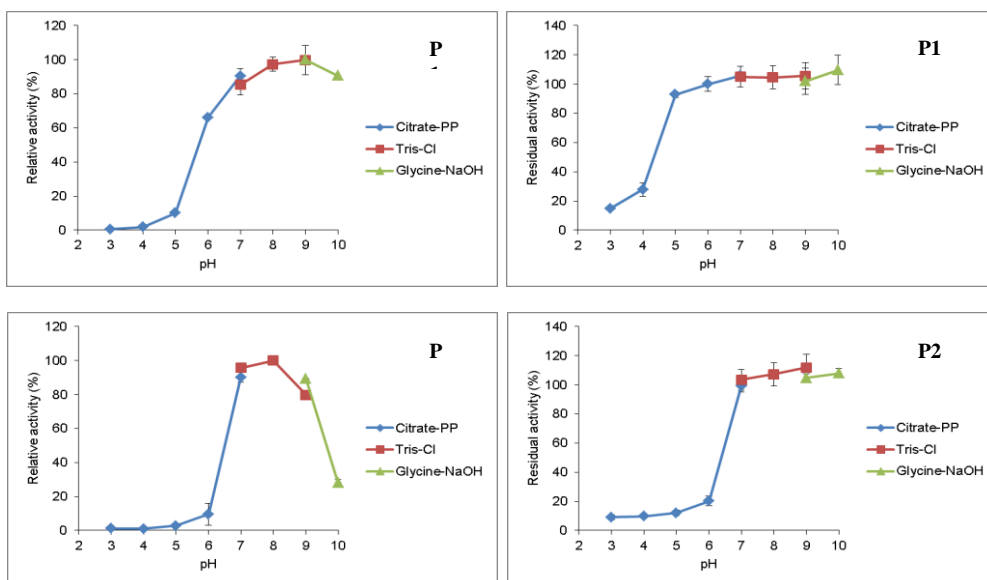
ภาพที่ 5 SDS-PAGE ของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ P1 และ P2

### 3. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์

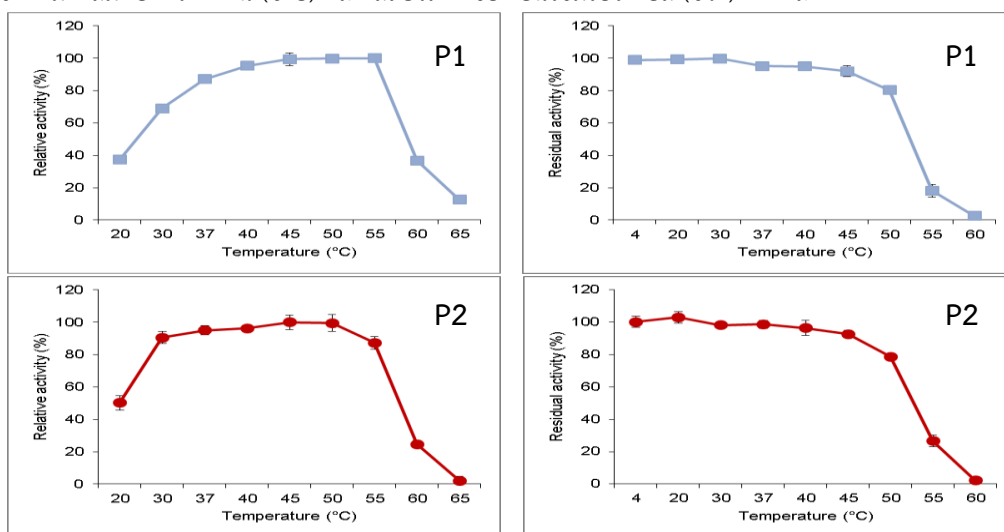
#### 3.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส

ทำการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ P1 และ P2 ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 10 นาที) พบว่าเอนไซม์ P1 ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7-10 โดยแสดงค่ากิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่า 80% และทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 9 ส่วนเอนไซม์ P2 ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่แคบกว่าคือ พีเอช 7-9 และทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 8 ดังนั้นเอนไซม์ P1 และ P2 น่าจะจัดให้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline

protease และ neutral protease ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ P1 ยังแสดงเสถียรภาพที่ดีในช่วงพีเอชที่กว้างระหว่างพีเอช 5-10 ส่วนเอนไซม์ P2 ทนพีเอชได้ดีในช่วง 7-10 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cho และคณะ (2003) ที่พบ alkaline protease และ neutral protease จาก *B. amyloliquefaciens* ที่แยกได้จากกระบวนการหมักกล้วยเหลือ ซึ่งนั่นจึงเป็นไปได้ว่าอาจพบแหล่งของจุลินทรีย์อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เพราะในกรณีของ *B. subtilis* MR10 ก็เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากกล้วยหมัก (ถั่วเน่า) เช่นกัน (Wongputtisin et al., 2012)



ภาพที่ 6 พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน (ซ้าย) และเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส (ขวา) P1 และ P2



ภาพที่ 6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน (ซ้าย) และเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส (ขวา) P1 และ P2

### 3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส

ทำการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ P1 และ P2 ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (พีเอช 7.0 ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ P1 และ P2 คือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี (Sathishkumar และคณะ 2015; Uttaree และ Charoenpanich 2016; Wang และคณะ 2013; Ghafoor และ Hasnain 2010) และเอนไซม์ทั้งสองมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิใกล้เคียงกันคือ สามารถทนอุณหภูมิได้ตั้งแต่ 4 ถึง 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เสถียรภาพของเอนไซม์จะลดลงมากกว่า 50% และไม่สามารถกลับมาทำงานได้อีกหากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

### 3.3 ผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์ P1 สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีไอออนประจุบวก ได้แก่  $+1$   $+2$  และ  $+3$  ยกเว้น  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ P1 ได้ประมาณ 50% (ภาพที่ 6) เปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ปกติ ทั้ง SDS EDTA และ mercaptoethanol ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ P2 มีความไวต่อ  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS เพราะไอออนและสารเคมีเหล่านี้มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ P1 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้มากถึง 80% เอนไซม์โปรติเอส P2 น่าจะถูกจัดให้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม metalloenzyme เนื่องจากผลจากการยับยั้งโดย EDTA (Orhan และคณะ 2005) Ellaiyah และคณะ (2002) กล่าวว่าผลของไอออนในการยับยั้งเอนไซม์จะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับธรรมชาติของเอนไซม์ ความต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำปฏิกิริยาและธรรมชาติของบริเวณเร่งของเอนไซม์

### 3.4 ความจำเพาะต่อซับสเตรทและค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ P1 และ P2

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์ P1 และ P2 กับซับสเตรท 3 ชนิดได้แก่ เคซีน เจลาติน และอัลบูมิน (BSA) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้งเอนไซม์ P1 และ P2 มีความจำเพาะเจาะจงกับเคซีนเหมือนกัน แต่ไม่จำเพาะกับอัลบูมินและไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเจลาติน เลือกเคซีนเป็นซับสเตรทสำหรับทดลองเพื่อวิเคราะห์ค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทั้งสองโดยใช้แบบจำลองของ Michaelis-Menten (ภาพที่ 7) พบว่า ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของเอนไซม์ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

ภายหลังการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสทั้งสองชนิดจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ข้อมูลที่ได้รับเหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอสเพื่อผลิตน้ำยาล้างจานที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ โดยเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดของเอนไซม์นั้น กระบวนการผลิตจำเป็นต้องถูกกำหนดไว้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์และหลีกเลี่ยงสารเคมีที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เป็นต้น ทั้งนี้จากการวิเคราะห์กระบวนการที่เป็นไปได้ในการผลิตน้ำยาล้างจานที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรติเอส นั้น เราสามารถเติมโปรติเอสได้ 2 รูปแบบ ได้แก่ การเติมทันทีในน้ำยาล้างจานโดยตรง (เติมสารรักษาสภาพมาแล้ว) แล้วบ่มตามเวลาที่กำหนดและปั่นเหวี่ยงให้ได้น้ำยาล้าง และวิธีที่สองคือนำน้ำยาล้างผ่านขั้นตอนต่างๆ ของโรงงานให้เรียบร้อยแล้วจึงเติมน้ำยาล้างแล้วจึงเติมเอนไซม์ลงไปบ่มตามระยะเวลาที่กำหนด ทั้งสองรูปแบบกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ทั้งสองรูปแบบจะมีการเติมแอมโมเนียในปริมาณ 0.6-0.8% ซึ่งค่า pH ของน้ำยาล้างจะเพิ่มขึ้นจาก 7 ไปเป็น 10-11 ได้ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

P2 เป็นอย่างมาก โดยประสิทธิภาพการทำงานเหลือเพียง 20% เท่านั้น แต่ไม่กระทบต่อการทำงานของ P1 แต่คาดว่า ประเด็นนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ P2 เนื่องจากแม่ทำงานได้ดีต่ำลง แต่เสถียรภาพของโครงสร้างเอนไซม์ที่ pH 10 ยังคงเท่าเดิม ดังนั้นเราสามารถเพิ่มระยะเวลาการบ่มน้ำยางร่วมกับเอนไซม์ให้นานขึ้นได้ เพื่อให้ได้ผลการย่อยโปรตีนโดย P2 เทียบเท่าสภาวะปกติ

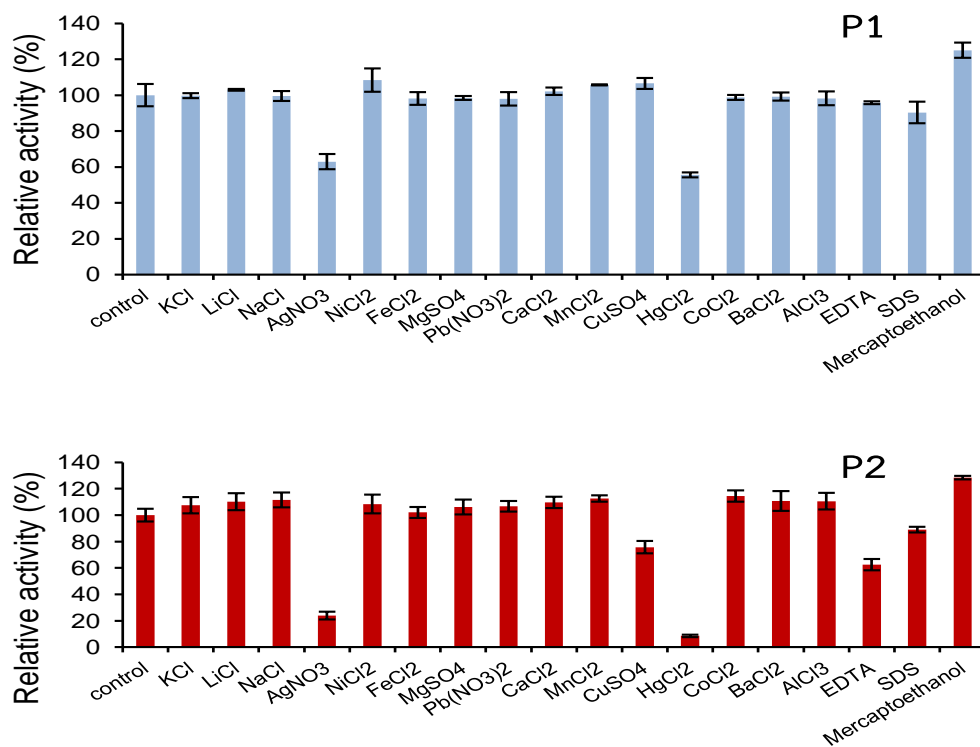
อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้น พบว่า P2 ทำงานได้ดีในช่วงกว้างกว่า P1 ซึ่งหากต้องการให้เอนไซม์ทั้งสองทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด อาจจำเป็นต้องให้ความร้อนแก่ตัวอย่างพาราและควบคุมไว้ที่ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจกระทบต่อต้นทุนด้านพลังในการผลิตได้บ้าง ความร้อนที่ใช้ส่งผลต่อแอมโมเนียซึ่งสามารถระเหยได้ดีที่อุณหภูมิสูง แต่อาจไม่กระทบต่อสมบัติของน้ำยางชั้น เพราะแม้แต่กระบวนการผลิตน้ำยางชั้นจากการระเหยด้วยความร้อนก็ไม่กระทบต่อสมบัติของน้ำยางธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตาม การบ่มเอนไซม์ร่วมกับน้ำยางที่อุณหภูมิปกติ (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ก็น่าจะเพียงพอสำหรับให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถทำงานได้

กระบวนการในการแยกเอนไซม์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เดิมใช้การตกตะกอนด้วยสารอะซิโตนจากนั้นกรองเอาตะกอนเอนไซม์ออกมาแล้วละลายกลับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ แต่ผลจากการศึกษาใน

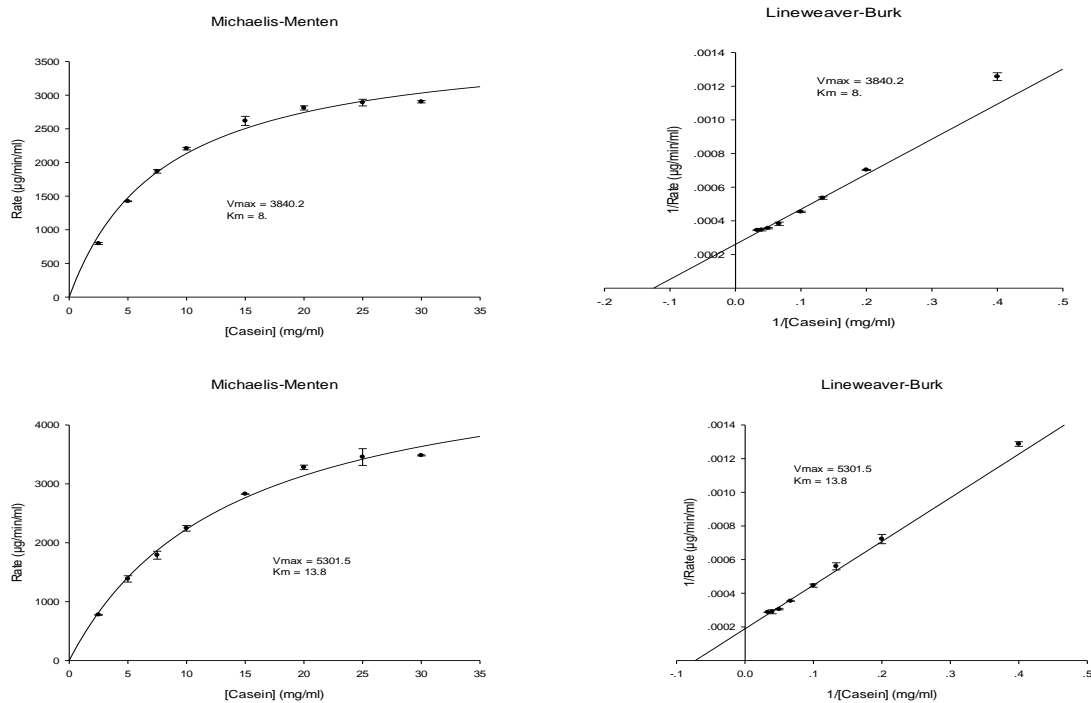
ครั้งนี้ ซึ่งพบว่าเอนไซม์โปรตีเอสมีขนาดโมเลกุลประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ทำให้สามารถออกแบบกระบวนการแยกเอนไซม์จากอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีกโดยใช้เยื่อกรองที่มีขนาดรูพรุนเหมาะสม เช่น เล็กกว่า 45 กิโลดาลตัน เป็นต้น แล้วทำการกรองแบบ ultrafiltration กระบวนการนี้เป็นขั้นตอนที่ง่ายสามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว แต่มีข้อเสียคือเครื่องมือ ultrafiltration มีราคาค่อนข้างสูง แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับ การตัดสินใจของผู้ประกอบการ

#### 4. การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้

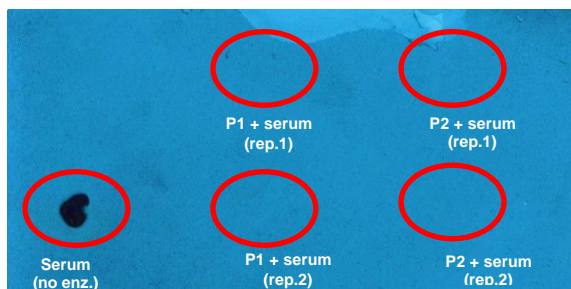
ผลการทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ของเอนไซม์บริสุทธิ์โปรตีเอส P1 และ P2 พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor (ภาพที่ 9) เช่นเดียวกับโปรตีเอสชนิดหยาบที่ผลิตจาก *B. subtilis* MR10 (ภาพที่ 10) ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดล้วนมีบทบาทสำคัญในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้ การประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เชิงปริมาณด้วยเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือการใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกันยังไม่สามารถทำได้ในการวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากข้อจำกัดด้านเทคนิคและเครื่องมือ ซึ่งวิเคราะห์ได้เพียงเชิงคุณภาพเท่านั้น อย่างไรก็ตาม ในทางปฏิบัติก็ได้ใช้เอนไซม์โปรตีเอสในรูปแบบเอนไซม์หยาบสำหรับการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราอยู่แล้ว



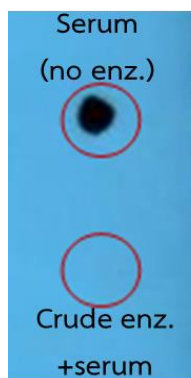
ภาพที่ 7 ผลของไอออนและสารเคมีบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์ P1 (บน) และ P2 (ล่าง)



ภาพที่ 8 กราฟของ Michaelis-Menten แสดงการหาค่าทางจลนพลศาสตร์  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  ของเอนไซม์โปรตีนเอส P1 (ซ้าย) และ P2 (ขวา)



ภาพที่ 9 फिल्म X-ray ที่ได้จากการตรวจวัดโปรตีนภูมิแพ้โดยการวิเคราะห์ dot blot ภายหลังจากการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์ P1 และ P2



ภาพที่ 10 फिल्म X-ray ที่ได้จากการตรวจวัดโปรตีนภูมิแพ้โดยการวิเคราะห์ dot blot ภายหลังจากการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสหยาบ

### สรุปผลการวิจัย

ผลการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-80% ตามด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-Sephadex C-50) และเจลฟิลเทรชัน (Sephacryl S-100) ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรตีนเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรตีนเอส 2 (P2) เอนไซม์บริสุทธิ์ P1 และ P2 มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 3,950 และ 3,238 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 26.6 และ 21.8 เท่า ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีค่าประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์โปรตีนเอส P1 และ P2 มีความเสถียรในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-

10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3,840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5,302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรตีนเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไอออนของโลหะ  $Ag^+$  และ  $Hg^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของ P1 ในขณะที่  $Ag^+$   $Cu^{2+}$   $Hg^{2+}$  EDTA และ SDS มีผลยับยั้งการทำงานของ P2 เอนไซม์โปรตีนเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้เช่นเดียวกับโปรตีนเอสหยาบ เอนไซม์บริสุทธิ์ทั้งสองชนิดสามารถย่อยหรือกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยาล้างพาราดีปได้เหมือนกัน

### เอกสารอ้างอิง

Alirezai, M., Aminlari, M., Gheisari, H.R. and Tavana, M. 2011. Actinidin: A promising

- milk coagulating enzyme. *European Journal of Food Research & Review* 1: 43-51.
- Amid, M., Tan, C.P., Mirhosseini, H., Aziz, N.A. and Ling, T.C. 2011. Optimization of serine protease extraction from mango peel (*Mangifera indica* CV. Chokanan). *Food Chemistry* 124: 666-671.
- Arulmani, M., Aparanjini, K., Vasanthi, K., Arumugam, P., Arivuchelvi, M. and Kalaichelvan, P.T. 2007. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 475-481.
- Asker, M.M.S., Mahmound, M.G., Shebwy, K.E. and Aziz, M.S.A.E. 2013. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 11: 103-109.
- Chaurasiya, R.S. and Hebbar, H.U. 2013. Extraction of bromelain from pineapple core and purification by RME and precipitation methods. *Separation and Purification Technology* 111: 90-97.
- Cho, S.J., Oh, S.H., Pridmore, D., Juillerat, M.A., and Lee, C.H. 2003. Purification and characterization of proteases from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from traditional soybean fermentation starter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7664-7670.
- Deutscher, M, P. 1990. Guide to Protein Purification. Academic press, INC. London
- Ellaiah, P., Srinivasulu, B., and Adinarayana, K. 2002. A review on microbial alkaline proteases. *Journal of Scientific and Industrial Research* 61: 690-704.
- Farhadian, S., Asoodeh, A., Lagzian, M. 2015. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 115: 51-58.
- Ferrareze, P.A.G., Correa, A.P.F., and Brandelii, A. 2016. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 7: 102-109.
- Ghafoor, A., and Hasnain, S. Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 strain isolated from ornamental plant nursery. *Extremophiles* 20: 115-123.
- Ha, M., Bekhit, A.E-D.A., Carne, A. and Hopkins, D.L. 2012. Characterization of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food Chemistry* 134: 95-105.
- Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C.W., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A., Huerta-Ochoa, S., Regalado-González, C. and Prado-Barragán, L.A. 2011. Purification and

- characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry* 2001-2006.
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Wongputtisin, P., Haltrich, D., Nguyen, T-H. and Khanongnuch, C. 2015. Efficient secretory expression of gene encoding a broad pH-stable maltose-forming amylase from *Lactobacillus plantarum* S21 in food-grade lactobacilli host. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58: 901-908.
- Kudryavtseva, O.A., Dunaevsky, Y.E., Kamzolkina, O.V. and Belozersky, M.A. 2008. Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylophilic Basidiomycetes. *Microbiology* 77: 643-653.
- Kumar, S., Sharma, N.S., Saharan, M.R. and Singh, R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry* 40: 1701-1705.
- Niyonzima, F.N. and More, S.S. 2014. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. *Biotechnology*. DOI 10.1007/s13205-014-0200-6.
- Orhan, E., Omay, D., and Guvenilir, Y. 2005. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121: 183-194.
- Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.
- Piero, A.R.L., Puglisi, I. and Petrone, G. 2011. Characterization of the purified actinidin as a plant coagulant of bovine milk. *Eur Food Res Technol* 233: 517-524.
- Sathishkumar, R., Ananthan, G., and Arun J. 2015. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 4: 214-220.
- Soares, P.A.G., Vaz, A.F.M., Correia, M.T.S., Pessoa, A., Carneiro-da-Cunha, M.G. 2012. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. *Separation and Purification Technology* 98: 389-395.
- Sumatha, A., Larroche, C. and Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial biotechnology of food-grade protease: A perspective. *Food Technol Biotechnol* 44: 211-220.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy: historical perspective. *Methods* 27: 3-9.
- Uchida, H., Kondo, D., Yamashita, S., Tanaka, T., Tran, L.H., Nagano, H. and Uwajima, T. 2004. Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN2 isolated from Vietnamese fish sauce. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 579-582.
- Uhlig, H. Industrial enzymes and their applications. USA. : John Wiley & Sons, Inc., 1998.

- Uttatree, S., and Charoenpanich, J. 2016. Isolation and characterization of a broad pH- and temperature-active solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8: 32-38.
- Wang, J., Xu, A., Wan, Y., and Li, Q. 2013. Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for beer brewing from *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170: 2021-2033.
- Wen, L., Zhu, W., Lu, Yanling, Kong, J. and Ma, G. 1998. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum*. *Process Biochemistry* 33: 331-336.
- Wongputtisiri, P., Khanongnuch, C., Khongbantad, W., Niamsup, P. and Lumyong, S. 2012. Screening and selection of *Bacillus* spp. for fermented corticate soybean Meal production. *Journal of Applied Microbiology* 113, 798-806.