วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.2) May – August 2021 บทความวิจัย

การขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้

Up-Scaling Process of Protease Production for Applying in the Manufacturing of Allergic Protein – Free Medical Glove

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน* และ ฉันทนา สุโพ

Pairote Wongputtisin* and Chantana Supo

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University

Received : 22 May 2020

Revised : 22 July 2020

Accepted : 8 September 2020

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย แต่พบว่าน้ำยางพาราธรรมชาติมีโปรตีนภูมิแพ้หลายชนิดเป็นองค์ประกอบและมักตกค้างอยู่ในวัสดุทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางพารา ก่อให้เกิดอันตรายต่อทั้งผู้ป่วยและบุคลากรทางการแพทย์ได้ ในการนี้ผู้วิจัยได้พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราได้ แต่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก จึงเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร และทดสอบความเป็นไปได้ในการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์จากน้ำยางพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสคือการ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 kg/cm^2 และมีการกวนผสมด้วยใบพัดที่อัตราเร็ว 150 rpm ทำให้ได้ค่า productivity ของการผลิตโปรติเอสเท่ากับ 1.21 unit/ml-hr เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้นี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b1 และ Hev b2 ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค dot blot ถุงมือยางที่ผลิตได้จากน้ำยางชนิดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้นี้ พบว่ามีความหนา สี และพื้นผิวไม่แตกต่างจากที่ผลิตจากน้ำยางทั่วไป แต่เอนไซม์โปรติเอสทำให้ค่าความเค้นดึงสูงสุดต่อหน่วยพื้นที่ (tensile strength) ลดต่ำลง ดังนั้นในการผลิตถุงมือยางชนิดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้จึงจำเป็นต้องมีการปรับสูตรอีกครั้งรวมถึงหาสภาวะที่เหมาะสมของการคงรูปยางเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติตรงตามมาตรฐาน

คำสำคัญ : เอนไซม์โปรติเอส ; แบคทีเรียบาซิลลัส ; การขยายกำลังการผลิต ; โปรตีนภูมิแพ้ ; ถุงมือยางทางการแพทย์

Abstract

Para rubber (*Hevea brasiliensis*) is an important economic crop of Thailand. However, natural Para rubber latex (NPRL) contains several allergic proteins and remained in medical devices which made from NPRL. Patients and medical staff are harmed by these allergens. Our research group has found that protease from *Bacillus* sp. bacterium is able to eliminate these allergic proteins in NPRL. However, large quantity of protease is required for using in the industrial scale. This research was subsequently aimed to study the optimal conditions for protease production by *Bacillus subtilis* MR10 in the 20 L fermenter and the possibility of medical glove production by allergic protein-free NPRL. It was found that the optimal condition for protease production was cultivation at 28-30 ^{o}C, aeration rate at 1.0 kg/cm^{2} and agitation rate at 150 rpm, leading to 1.21 unit/ml-hr of protease productivity. The obtained protease could eliminate allergic proteins, i.e. Hev b1 and Hev b2, when dot bot technique was carried out. The medical gloves produced from allergic protein free-NPRL exhibited similar thickness, color and surface to those from NPRL, however protease decreased tensile strength of gloves. Therefore, the formula development and optimization for vulcanization process need to be investigated prior application in allergic protein-free glove manufacturing.

Keywords : protease ; *Bacillus* sp. ; up-scaling process ; allergic protein ; latex medical glove

***Corresponding author. E-mail** : pairotewong@gmail.com

บทนำ

น้ำยางพาราธรรมชาติ (natural Para rubber latex, NPRL) มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณ 1-2% โดยสามารถพบได้ในส่วนของชั้นซีรั่ม (serum) และบนอนุภาคเนื้อยาง (rubber particles) ประมาณ 75 และ 25% ตามลำดับ ทำให้แม้การนำน้ำยางมาปั่นเหวี่ยง (centrifugation) เพื่อกำจัดซีรั่มออกและผลิตเป็นน้ำยางข้น (concentrated latex) ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนส่วนที่เกาะกับอนุภาคยางได้ อีกทั้งทำให้โปรตีนเหล่านี้มีความเข้มข้นสูงขึ้นภายหลังขั้นตอนการปั่นเหวี่ยง นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนในน้ำยางพาราบางชนิดจัดเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergen) เช่น โปรตีนชนิด rubber elongation factor (REF, Hev b1) และ small rubber particle protein (SRPP, Hev b3) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงและพบได้บนพื้นผิวอนุภาคยาง (Yeang *et al*., 2002; Yeang, 2004; Xiang *et al*., 2012) ทั้งนี้มีชนิดของโปรตีนประมาณ 25% ที่สามารถจับกับแอนติบอดี้ชนิด IgE ของซีรัมของมนุษย์และอีกประมาณ 75% สามารถจับได้กับ IgG (Sussaman *et al*., 2002) เมื่อน้ำยางข้นถูกแปรรูปด้วยกระบวนการทางเคมี การทำแห้ง และการทำให้ยางคงตัวด้วยความร้อน (heat vulcanization) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ถุงมือยางการแพทย์หรือแม้กระทั่งวัสดุทางการแพทย์ที่สัมผัสกับผิวหนังมนุษย์ชนิดอื่นๆ แล้ว พบว่าโปรตีนมีการกระจายตัวบนพื้นผิวของผลิตภัณฑ์ (Na Ranong & Kajornchaiyakul, 1996; Perraella & Gaspari, 2002) สร้างปัญหาด้านสุขภาพต่อผู้ป่วยและบุคลากรทางการแพทย์ได้ โดยอาการมีตั้งแต่อาการคัน ระคายเคือง จนกระทั่งรุนแรงด้วยอาการ anaphylaxis ในกรณีของถุงมือยางนั้น ผู้ผลิตบางรายได้มีการแก้ปัญหาโดยการล้างด้วยน้ำเปล่าหรือเคลือบผิวด้วยผงแป้งเพื่อลดการสัมผัสระหว่างผิวหนังกับถุงมือ แต่ก็เป็นเพียงการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ ในขณะที่ได้มีรายงานว่าการปรับสภาวะน้ำยางให้เป็นด่างแก่ด้วยสารแอมโมเนียสามารถช่วยกำจัดโปรตีนบางชนิดได้ แต่การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบโปรตีนในน้ำยางอาจจะกระทบต่อสมบัติกายภาพของยางได้ (Perrella & Gaspari, 2002)

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้พบว่าเอนไซม์โปรติเอส (protease) จากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Nanti *et al*., 2014) ซึ่งอาจเรียกน้ำยางพาราที่ผ่านกระบวนกำจัดโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสนี้ว่าน้ำยางพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ (allergic protein – free NPRL) ซึ่งจะเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตเป็นวัสดุทางการแพทย์ที่สัมผัสกับผิวหนังมนุษย์ได้ เช่น ถุงมือยาง แผ่นปิดแผล ท่ออาหาร เป็นต้น ดังนั้นจึงมีแนวคิดขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้เพียงพอต่อการใช้งานระดับกึ่งอุตสาหกรรมขึ้นไป โดยคำนึงถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ ประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจน การถ่ายเทสารอาหาร และการถ่ายเทความร้อนที่ลดลง และแรงดันภายในถังหมักที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรีย จึงเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้ ที่มุ่งศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร (ปริมาตรอาหาร 15 ลิตร) และเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปถุงมือยางทางการแพทย์จากน้ำยางพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ที่ผลิตได้ ผลจากงานวิจัยนี้คาดว่าจะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับน้ำยางพาราซึ่งเป็นผลผลิตการเกษตรที่สำคัญของประเทศไทยและส่งผลต่อเนื่องมายังรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราทั่วประเทศได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียและการเตรียมหัวเชื้อ

ใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ซึ่งแยกได้จากถั่วเน่า (Wongputtisin *et al*., 2012) โดยหัวเชื้อถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร nutrient broth (NB) เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลือง (100 g/L) K_2HPO_4 (0.7 g/L) $MgSO_4.7H_2O$ (0.7 g/L) กลูโคส (1.1 g/L) $(NH_4)_2SO_4$ (0.275 g/L) และ NH_4Cl (0.275 g/L) ปริมาณ 15 ลิตรลงในถังหมักขนาด 20 ลิตร (Nalgene®) ปรับ pH เริ่มต้นที่ 6.0 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงไปประมาณ 10^9 CFU ประกอบถังหมักเข้ากับอุปกรณ์จ่ายอากาศที่มีชุดแผ่นกรองอากาศขนาดรูพรุน 0.2 µm (Midisart®) และใบกวน ดำเนินการหมักเพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่ออัตราการเจริญและอัตราการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย ได้แก่ อุณหภูมิ (30 37 45 และ 50 องศาเซลเซียส) อัตราการให้อากาศ (1.0 1.5 2.0 และ 3.0 kg/cm^2) และอัตราการกวนผสมด้วยใบพัด (50 100 และ 150 rpm) เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อทำการวิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารวุ้นสูตร nutrient agar (NA) และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease activity) ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Wongputtisin *et al*. (2012) โดยเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต (unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) 1 µg ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด จากนั้นคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย (specific growth rate, µ) ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตผลิตภัณฑ์ต่อจำนวนเซลล์ที่เจริญ (product yield coefficient, $Y_{p/x}$) และ productivity ของเอนไซม์โปรติเอส และคัดเลือกระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยเพื่อใช้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

ทำการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสแบบบริสุทธิ์บางส่วน (partial purified protease) ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Nanti *et al*. (2014) โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (80% saturation) ตั้งทิ้งไว้ 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนโปรตีนภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เติมละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM pH 7.0 เพื่อละลายตะกอนโปรตีนด้วยปริมาตรที่น้อยที่สุด และกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตด้วยถุงไดอะไลซีส (dialysis bag) ชนิด 12 kDa (MW cut off) นำเอนไซม์ที่เตรียมได้มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้จากน้ำยางพารา โดยผสมน้ำยางข้นปริมาณ 100 กรัม และเอนไซม์โปรติเอส 100 ยูนิต จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำตัวอย่างน้ำยางข้นมาทดสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b1 และ Hev b3 ด้วยเทคนิค dot blot โดยอาศัยความสามารถในการจับแบบจำเพาะของ monoclonal antibody สองชนิดได้แก่ anti-rubber elongation factor protein antibody (Pierce®) และ anti-small rubber particle protein antibody (Pierce®) ตามลำดับ (Nanti *et al*., 2014)

3. การทดสอบผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยน้ำยางที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้

ใช้น้ำยางพาราข้น 60% DRC (dry rubber content) ชนิด HA (high ammonia) จากบริษัทฉลองอุตสาหกรรมน้ำยางข้น จำกัด จ.สงขลา ทำการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ 2 ชนิดจากน้ำยางข้น 2 ประเภท คือน้ำยางข้นทั่วไปและน้ำยางข้นที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ โดยใช้สูตรและกระบวนการผลิตของโรงงานผลิตถุงมือยางพารา (ตารางที่ 1) ถุงมือที่ผลิตได้นี้ จะถูกนำมาทดสอบและเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพตามมาตรฐาน ASTM D3578-05 (standard

specification for examination gloves) ได้แก่ ค่าความหนาและค่าความเค้นดึงสูงสุดต่อหน่วยพื้นที่ (tensile strength) ทั้งก่อนและหลังบ่มเร่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 แสดงสูตรพื้นฐานของการผลิตถุงมือยางพาราทางการแพทย์ของโรงงาน

องค์ประกอบ	**part per hundred of rubber (phr)**
Latex	100
Stabilizer	1.2
Sulphur	1.0
Accelerator	1.2
Activator	0.5
Antioxidant	1.5
Pigment	0.4

**หมายเหตุ* : ไม่มีการเปิดเผยรายละเอียดสารเคมีในแต่ละองค์ประกอบเนื่องจากเป็นสูตรของโรงงานถุงมือยาง

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำเป็นอย่างน้อย ค่าที่ตรวจวัดได้มีการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยโปรแกรมสำเร็จรูป STATISTIX ©

ผลการวิจัย

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสและการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์

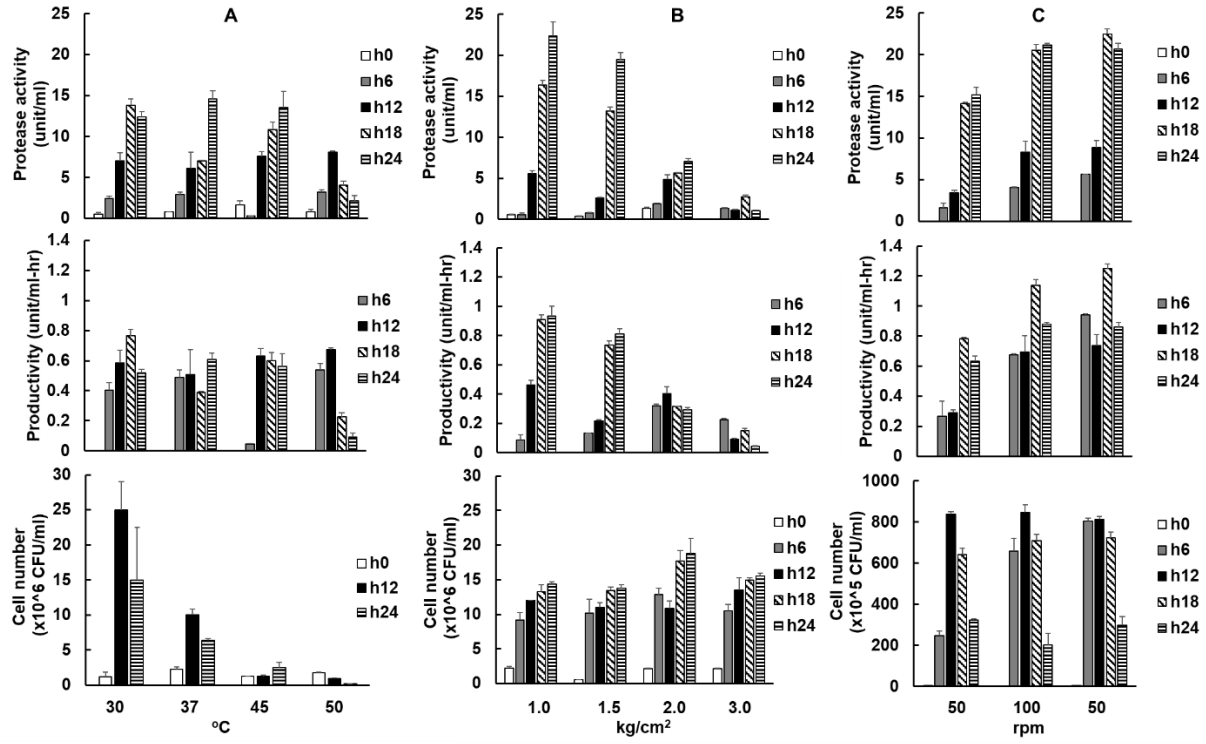
จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลวปริมาณ 15 ลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 1 โดยพบว่ามีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใกล้เคียงกัน (13-15 unit/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1A) ดังนั้นจึงได้เลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เทียบเท่ากับอุณหภูมิห้องในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งใช้พลังงานต่ำกว่าในการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ผลการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมพบว่าแบคทีเรียผลิตโปรติเอสและให้ค่า productivity ได้สูงเมื่อให้อากาศที่ระดับ 1 และ 1.5 kg/cm^2 (ภาพที่ 1B) อย่างไรก็ตาม ที่ 1 kg/cm^2 มีค่าสูงกว่าเล็กน้อยประมาณ 0.1 unit/ml-hr และเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตแล้ว กลับพบว่าการให้อากาศที่ระดับ 2 และ 3 kg/cm^2 มีค่าสูงกว่าการให้อากาศที่ระดับต่ำ แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเป็นหลักไม่ใช่ชีวมวล ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศที่ระดับ 1 kg/cm^2 สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 และปัจจัยสุดท้ายที่ทำการศึกษาอัตราการกวนผสม ซึ่งได้ศึกษาอัตราการกวน 3 ระดับตั้งแต่ 50-150 rpm โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องและให้อากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm^2 ผลการทดลองพบว่าอัตราการกวนที่สูงขึ้น มีแนวโน้มให้แบคทีเรียเจริญ ผลิตเอนไซม์โปรติเอส และให้ค่า productivity สูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 1C โดยที่อัตราการกวน 100 และ 150 rpm ให้ผลใกล้เคียงกัน แต่ได้เลือกใช้การกวนที่ระดับ 150 rpm แม้จะใช้พลังงานเพิ่มขึ้นและเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและค่า productivity เพียงเล็กน้อย แต่สามารถช่วยเพิ่มการผสมและลดการนอนก้นของกากถั่วเหลืองในถังหมักได้ดีกว่า และเมื่อย้อนพิจารณาข้อมูลการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการ

กวนที่ระดับ 150 rpm แล้ว พบว่าการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมงมีค่า productivity สูงที่สุด ในขณะที่ข้อมูลการเพาะเลี้ยงเมื่อให้อากาศระดับ 1 kg/cm^2 นั้น ค่า productivity จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สูงกว่าที่ 18 ชั่วโมงเพียงเล็กน้อย ทำให้เลือกเพาะเลี้ยง *B. subtilis* MR10 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส

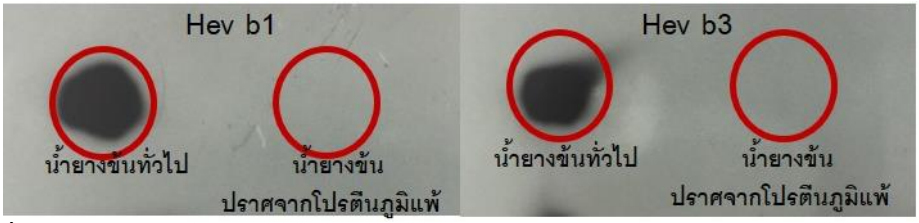
ดังนั้นจึงได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ภายใต้สภาวะดังกล่าวและได้นำเอนไซม์โปรติเอสมาทดสอบยืนยันประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 2 ซึ่งพบว่าตรวจไม่พบโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Hev b1 และ Hev b3 หลงเหลือในน้ำยางที่บ่มร่วมกับเอนไซม์ แต่ยังคงพบโปรตีนทั้งสองในน้ำยางพาราทั่วไป โดยปรากฏเป็นแถบดำบนแผ่นฟิล์ม

2. การผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยน้ำยางที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้และการทดสอบสมบัติ

การทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ สารเคมี สูตร อุปกรณ์และเทคนิคการทำถุงมือยางจากบริษัทผู้ผลิตถุงมือยางแห่งหนึ่งในจังหวัดสงขลา ทำการผลิตถุงมือยางทั้งสิ้น 2 ชนิด คือจากน้ำยางข้นทั่วไปและน้ำยางข้นที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ ผลการทดลองพบว่าถุงมือชนิดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้มีลักษณะปรากฏที่ใกล้เคียงกับชนิดน้ำยางทั่วไปตามมาตรฐานของโรงงานทั้งในด้านความหนา สี และผิวสัมผัส (ภาพที่ 3) ทั้งนี้ค่าความหนาของถุงมือและค่า tensile strength แสดงดังตารางที่ 2 โดยพบว่าถุงมือชนิดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้มีความแข็งแรงในรูปของค่า Tensile ต่ำกว่าชนิดน้ำยางทั่วไป และยังต่ำกว่าข้อกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ Rubber examination glove (ASTM D3578-05) type II ด้วย แต่เมื่อทำการบ่มเร่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแล้ว ค่า tensile strength ของถุงมือชนิดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้เพิ่มสูงขึ้นกว่า 40% และเป็นไปตามมาตรฐานซึ่งกำหนดไว้ที่ไม่น้อยกว่า 14 MPa



ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ (A) อัตราการให้อากาศ (B) และ อัตราการกวนผสม (C)



ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ Hev b1 และ Hev b3 ด้วยเทคนิค dot blot

ภาพที่ 3 ลักษณะของถุงมือยางทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางข้นทั่วไปและน้ำยางข้นชนิดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้

ตารางที่ 2 แสดงค่าความหนาและค่า tensile strength ของถุงมือยางทางการแพทย์ที่ผลิตได้จากงานวิจัย

ถุงมือ	ความหนาเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ± SD		ค่า Tensile (MPa) ± SD	
	ก่อนบ่มเร่ง	หลังบ่มเร่ง	ก่อนบ่มเร่ง	หลังบ่มเร่ง
น้ำยางทั่วไป	0.143 ± 0.003	0.144 ± 0.002	15.56 ± 1.95 ^{a}	15.91 ± 2.03 ^{a}
น้ำยางปราศจากโปรตีนภูมิแพ้	0.145 ± 0.002	0.146 ± 0.005	8.47 ± 1.08 ^{b}	14.7 ± 1.71 ^{b*}

หมายเหตุ

- มาตรฐานความหนาเฉลี่ยและค่า Tensile strength ของถุงมือยางตามมาตรฐาน ASTM D3578-05 คือ 0.08 มิลลิเมตร และ 14 MPa (ทั้งก่อนและหลังบ่มเร่ง) ตามลำดับ
- ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 9 ชิ้น
- ตัวอักษร a, b, c ในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- * คือค่าเฉลี่ยของก่อนและหลังบ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

วิจารณ์ผลการวิจัย

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อทำการขยายขนาดกำลังการผลิตนั้นมีความจำเป็น เพื่อให้จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ได้มีประสิทธิภาพสูงสุดตามต้องการ

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของ *B. subtilis* MR10 สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Gouda (2006) Abusham *et al*. (2009) และ Chantawannakul *et al*. (2002) ที่พบว่า *Bacillus* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่อุณหภูมิ 30 37 และ 42 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า productivity ซึ่งหมายถึงการผลิตเอนไซม์ต่อหนึ่งหน่วยเวลา ก็จะเห็นว่าเอนไซม์ถูกผลิตมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องชั่วโมงที่ 18 สอดคล้องกับการเจริญของเชื้อที่พบว่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนั้น สังเกตได้ว่าพบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อน้อยมาก ซึ่งถึงแม้คำนวณค่า $Y_{p/x}$ แล้วได้ค่าค่อนข้างสูง แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอสสุทธิที่ผลิตขึ้นค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมินี้จึงไม่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตและการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิห้องและ 37 องศาเซลเซียสแล้ว ก็พบว่าสูงค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว การให้ความร้อนเพื่อควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ถือเป็นอีกหนึ่งต้นทุนของการผลิต ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกที่ใช้อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ในการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ภายในถังหมักที่มีการเจริญของจุลินทรีย์อยู่นั้น ความร้อนที่ได้รับนอกจากจะมาจากระบบให้ความร้อนแล้ว ยังสามารถมาได้จากความร้อนจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic heat) ของเซลล์ได้อีกด้วย หากกระบวนการระบายความร้อนทำได้ไม่ดีแล้ว จะกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง (Abusham *et al*., 2009) และที่สำคัญที่สุดคือความร้อนที่สูงเกินไปจะทำให้โครงสร้างเอนไซม์เสียสภาพได้ (denaturation)

ในระบบการหมักที่ออกแบบครั้งนี้ มีการให้อากาศผ่านทางปั๊มลมที่จ่ายอากาศเข้าสู่ถังหมักผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.2 µm จากนั้นอากาศจะแตกตัวเป็นฟองละเอียดด้วยหัวทรายภายในถังหมัก เพื่อให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้มากขึ้น ทั้งนี้อัตราการให้อากาศที่เพิ่มขึ้น ควรทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารเหลวเพิ่มขึ้นและเชื้อสามารถเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์สูงขึ้นตามไปด้วย แต่ผลการทดลองครั้งนี้กลับพบว่าที่อัตราการให้อากาศระดับ 2 kg/cm^2 ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ลดลง เหตุการณ์นี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Abusham *et al*. (2009) ที่เพิ่มอัตราการให้อากาศด้วยการเขย่า แล้วพบว่าเชื้อ *B. subtilis* มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลง ทั้งนี้ได้มีการอธิบายเหตุผล โดยอ้างอิงจาก Roychoudhury *et al*. (1988) ที่ระบุว่าอัตราการให้อากาศที่สูงเกินไปอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ในงานวิจัยนี้นอกจากมีการให้อากาศด้วยปั๊มลมแล้ว ยังมีการเพิ่มประสิทธิภาพการละลายของออกซิเจนในอาหารเหลวโดยการกวนด้วยใบกวนด้วย อีกทั้งการกวนยังช่วยป้องกันการนอนก้นของกากถั่วเหลืองที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผู้วิจัยยังพบว่าการให้อากาศและการกวนในระดับที่สูงทำให้เกิดฟองขึ้นในถังหมักที่เลี้ยงแบคทีเรียด้วยอาหารเหลวต้นทุนต่ำซึ่งมีกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลัก แต่เกิดฟองเล็กน้อยเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลว NB ดังนั้นในระหว่างการหมักจำเป็นต้องเติมสารลดการเกิดฟอง (antifoam) เป็นระยะ ซึ่งฟองที่เกิดขึ้นนี้จะก่อผลเสียแก่การหมัก โดยทำให้อัตราการถ่ายเทแก๊สลดลง โอกาสปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์จากภายนอกเพิ่มสูงขึ้น และยังทำเกิดการชะเอาเชื้อแบคทีเรียในถังหมักออกไปด้วย

เป็นที่น่าสังเกตว่าถุงมือยางสูตรที่เติมเอนไซม์โปรติเอส แล้วนำมาผลิตถุงมือตามกระบวนการของโรงงานน่าจะเกิดการวัลคาไนซ์ที่ไม่สมบูรณ์ สังเกตได้จากภายหลังการบ่มเร่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสแล้วพบว่าค่า tensile strength สูงขึ้น ทั้งนี้สันนิษฐานว่ากรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้สภาพความเป็นกรดส่วนผสมยางสูงขึ้น ลักษณะเช่นนี้มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการเกิดการเชื่อมขวาง (cross-link) ของอนุภาคยางได้ ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Perrella & Gasperi (2002) ที่รายงานว่าการผลิตถุงมือยางจากน้ำยางที่มีการบ่มร่วมกับ

เอนไซม์โปรติเอสชนิด alkaline protease ในปริมาณ 0.025% เป็นเวลา 1-2 วัน ถุงมือที่ได้ยังคงผ่านมาตรฐาน ASTM3578 แต่ในรายงานไม่ได้ระบุสภาวะในการวัลคาไนซ์น้ำยาง ดังนั้นหากจะมีนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ในกระบวนการผลิตถุงมือยางแล้ว จำเป็นต้องมีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัลคาไนซ์น้ำยางเพื่อให้ได้ถุงมือยางที่มีคุณภาพต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ผลการงานวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ด้วยอาหารเหลวในถังหมักขนาด 20 ลิตรคือ การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) การให้อากาศที่ระดับ 1 kg/cm^2 มีอัตราการกวนผสม 150 rpm และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิสามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ทำให้ได้น้ำยางชนิดปราศจากโปรตีนภูมิแพ้สำหรับการทดสอบผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ ซึ่งถุงมือที่ผลิตขึ้นนี้มีคุณลักษณะปรากฏไม่แตกต่างกับที่ผลิตด้วยน้ำยางทั่วไป แต่มีค่า tensile strength ก่อนการบ่มเร่งลดต่ำลง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์จากน้ำยางพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ประจำปี 2557 ขอขอบคุณการสนับสนุนอุปกรณ์วิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และจากภาคเอกชนที่ช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Abusham, R.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., & 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 R. *Microbial Cell Factories, 8*, 1-9.

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

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.

Na Ranong, N., & Kajornchaiyakul, V. (1996). Decrement of water soluble protein in natural rubber products. *Para Rubber Bulletin, 16*(2), 81-90. (in Thai)

Nanti, S., Wongputtisin, P., Sakulsingharoj, C., Klongklaew, A., & Chomsri, N. (2014). Removal of allergenic protein in natural rubber latex using protease from *Bacillus* sp. *Food and Applied Bioscience Journal, 2*, 216-223.

Perrella, F.W., & 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 □-amylase production characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology and Bioengineering, 33*, 197-206.

Sussman, G.L., Beezhold, D.H., & Liss, G. (2002). Latex allergy: historical perspective. *Methods, 27*, 3-9.

Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Khongbantad, W., Niamsup, P., & 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., & Sunderasan, E. (2002). Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods, 27*, 32-45.

Xiang, Q, Xia, K., Dai, L., Kang, G., Li, Y., Nie, Z., Duan, C., & Zeng, R. (2012). Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasilliensis* using 2D-DIGE. *Plant Physiology and Biochemistry, 60*, 207-213