ชื่อเรื่อง	การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำ จาก *Bacillus subtilis* สำหรับประยุกต์ใช้ใน อุตสาหกรรมแปรรูปยางพารา
ชื่อผู้เขียน	นางสาวอัจฉรารัตน์ คล่องแคล้ว
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน

บทคัดย่อ

เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ที่คัดแยกจากอาหารหมักทางภาคเหนือของประเทศไทย มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา โดยพบว่าน้ำยางพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ที่หลากหลาย เช่น ถุงมือผ่าตัด ถุงยางอนามัย สายยางให้อาหารสำหรับผู้ป่วย เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตเอนไซม์โปรติเอสนี้ยังมีต้นทุนที่สูงไม่เหมาะกับการผลิตเพื่อใช้งานในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้มีต้นทุนต่ำลง โดยในขั้นตอนแรกได้ทำการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อทดแทนอาหารสูตร Nutrient broth (NB) ที่เป็นอาหารสูตรมาตรฐาน โดยใช้วิธีการทางสถิติได้แก่ Plackettt and Burman Design และ Central Composite Design (CCD) ร่วมกับ response surface methodology ผลการทดลองพบว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับ NB นอกจากนี้ K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเวลาในการเพาะเลี้ยง มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคือ กากถั่วเหลือง 10 g K_2HPO_4 0.71 กรัม/ลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0.72 กรัม/ลิตร ปรับความเป็นกรด- ด่าง เริ่มต้นเท่ากับ 7.6 และใช้เวลาเพาะเลี้ยงเท่ากับ 21 ชั่วโมง ซึ่งสามารถทำนายได้ว่าจะสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เท่ากับ 54 Unit/ml และจากการเพาะเลี้ยงจริงภายใต้สภาวะดังกล่าวพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เท่ากับ 61.67 Unit/ml ซึ่งสูงกว่าการทำนายขณะที่การผลิตโปรติเอสในอาหารที่ประกอบไปด้วยกากถั่วเหลืองเพียงอย่างเดียวสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เพียง 17 Unit/ml และอาหารสูตร NB ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 37.83 Unit/ml การเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นอีกประเด็นในการศึกษาเพื่อลดต้นทุนการผลิต ผลการทดลองพบว่าการใช้สารละลายอะซิโตนความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในการตกตะกอนเอนไซม์

มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้เท่ากับ 57.63 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งอะซิโตนสามารถถูกนำมาเวียนใช้ใหม่ได้อีกด้วย และสุดท้ายในขั้นตอนการศึกษากระบวนการเก็บรักษาสภาพเอนไซม์เพื่อยืดอายุการใช้งานโดยใช้เทคนิค Central Composite Design (CCD) ร่วมกับ response surface methodology พบว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4.6 M และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.03 M สามารถใช้เป็นสารรักษาสภาพเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 1 เดือน โดยพบว่าภายใต้สภาวะการเก็บรักษาดังกล่าวเป็นเวลา 4 สัปดาห์ กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงมีค่าคงที่ แต่ในขณะที่ไม่พบการหลงเหลืออยู่ของกิจกรรมเอนไซม์ในชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารรักษาสภาพ โดยสรุปแล้วกระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่พัฒนาขึ้นนี้ พบว่าสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิตได้ถึง 29.19 เท่า ในขณะที่ลดต้นทุนเวลาลงได้ 28.05 เปอร์เซ็นต์

Title Development of Low Cost Process for Protease Production from *Bacillus subtilis* to Apply in Para Rubber Manufacturing

Author Miss Augchararat Klongklaew

Degree of Master of Science in Biotechnology

Advisory Committee Chairperson Dr. Pairote Wongputtisin

ABSTRACT

Protease enzyme produced from *Bacillus subtilis* MR 10, isolated from northern Thai fermented food, is able to degrade allergic proteins in Para rubber latex. Deproteinized rubber latex can be applied in the production of several medical devices, i.e surgery glove, condom, feeding tube, etc. However, the production cost of protease enzyme is high; which is not suitable for applying in rubber latex manufacturing. Therefore, the aim of this study was to develop low cost process for protease production. First step was to develop culture broth for protease production instead of nutrient broth (NB), a commercial culture medium, by using statistical methodology, i.e. Plackettt and Burman Design and Central Composite Design (CCD) associate with response surface methodology. Results showed that soybean meal could be used as a main raw material for culture medium. Furthermore, K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, initial pH of the culture medium and cultivation time had a significant effect to protease production ($p<0.05$). The optimal compositions of culture medium to produce protease enzyme were 10 g of soybean meal, supplemented with 0.71 g/l K_2HPO_4 and 0.72 g/l $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0.72 g/l, initial pH at 7.6 and cultivated for 21 hr. The predicted protease enzyme produced according to above conditions was 54 unit/ml, while the obtained protease was 61.67 Unit/ml in validation experiment. This yield was higher than that in a sole soybean meal medium that gave only 17 Unit/ml, whereas 37.83 Unit/ml was obtained when cultured in NB. Protease harvesting from culture broth was the next experiment to be studied for production cost reduction. It was found that enzyme precipitation by acetone at the final concentration of 60 % by vol. was effective similar to precipitation by ammonium sulfate. About 57.63 % yield of protease was recovered. Moreover, acetone could be recycled. Finally, to prolong the activity of protease during storage time was investigated using Central Composite Design (CCD) associated with response surface methodology. It was found that glycerol and potassium metabisulfite with final concentration at 4.6 M and 0.03 M, respectively, were able to maximize the enzyme stability when stored at 4 $^{\circ}C$ for 1 month, while no remaining of enzyme activity was found in enzyme without both chemicals. It was concluded that according to these developed processes, production cost could be reduced 29.19 times and time consumption was reduced approximately 28.05 %.