การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำจาก *Bacillus subtilis* สำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปยางพารา

อัจฉรารัตน์ คล่องแคล้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2558

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำจาก *Bacillus subtilis*

สำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปยางพารา

โดย

อัจฉรารัตน์ คล่องแคล้ว

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ....

(อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)

วันที่ 30 เดือน เม.ย. พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 21 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2558

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์)

วันที่ 21 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2558

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ภูมิสุทธาผล)

วันที่ 21 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2558

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จาตุพงศ์ วาฤทธิ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 23 เดือน ก.ค. พ.ศ. 2558

ชื่อเรื่อง	การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำ จาก *Bacillus subtilis* สำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปยางพารา
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 โดยใช้วิธีการทางสถิติ ได้แก่ 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 %.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำ และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ในระหว่างการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนการช่วยตรวจสอบแก้ไขจนกระทั่งงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาติชาย โขนงนุช อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อำนวยความสะดวก สถานที่ วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการดำเนินการทดลอง ที่ช่วยสนับสนุนทุนการศึกษาและวัตถุดิบในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวข้าพเจ้าที่ได้ส่งเสริมสนับสนุนทุนการศึกษา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือที่ดีเสมอมา และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีมาตลอดการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา

อัจฉรารัตน์ คล่องแคล้ว

กรกฎาคม 2558

สารบัญ

หน้า

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

สารบัญตารางภาคผนวก

สารบัญภาพผนวก

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยได้มีการใช้ประโยชน์จากยางพาราอย่างแพร่หลายยกตัวอย่างเช่น การผลิตยางรถยนต์ พื้นรองเท้า สายพานลำเลียง ยางยืด รวมทั้งผลิตเป็นอุปกรณ์ทางการแพทย์ ยกตัวอย่างเช่น ถุงมือยาง และถุงยางอนามัย เป็นต้นซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสกับผิวหนังมนุษย์โดยตรง และปัจจุบันมูลค่าการตลาดของผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้มีแนวโน้มเติบโตอย่างต่อเนื่อง ผู้ผลิตภาคอุตสาหกรรมจึงให้ความสนใจผลิตผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้กันมากขึ้น แต่พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำยางพาราเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้แก่ผู้ใช้งาน เนื่องจากโปรตีนภูมิแพ้หลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในน้ำยางพาราสด เช่น Hev b1 (Rubber elongation factor) Hev b3 (Small rubber particles) Hev b5 (Acidic protein) และ Hev b6 (Hevein protein) (Hamilton, 2002) ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการใช้เอนไซม์โปรติเอส ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ที่อยู่ในน้ำยางพาราสดได้ (Nanti et al., 2014) โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* MR10 นี้ถือว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนสูง โดยยืนยันผลได้จากการใช้วิธีการทาง Immunobloting ในการตรวจสอบ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสนั้นถือว่าใช้ต้นทุนที่สูงไม่เหมาะกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ทั้งในส่วนของอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีราคาแพง และกระบวนเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่แม้มีประสิทธิภาพแต่ก็มีขั้นตอนที่ซับซ้อน และต้นทุนที่สูงเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสต้นทุนต่ำจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อให้เหมาะสมกับกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยให้ความสำคัญในประเด็นเกี่ยวกับการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส และกระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพแต่ไม่ซับซ้อน และนอกจากนี้ยังจะได้ทำการศึกษากระบวนการยืดอายุการเก็บรักษาของเอนไซม์โปรติเอสอีกด้วย ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อภาคอุตสาหกรรมที่ทำการผลิตผลิตภัณฑ์จากยางพารา ผู้ประกอบการสามารถลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับใช้เตรียมน้ำยางพาราที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ ลดการใช้สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิต นอกจากนั้นยังเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้งานผลิตภัณฑ์ยางพาราในด้านความปลอดภัยอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10

2. เพื่อศึกษากระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสม

3. เพื่อศึกษากระบวนการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10

2. ได้กระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสม

3. ได้กระบวนการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสม

4. สามารถลดต้นทุนกระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ทำให้มีความเป็นไปได้ในการผลิตเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมมากยิ่งขึ้น

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

อุตสาหกรรมยางพาราในประเทศไทย

อุตสาหกรรมยาง และการผลิตยางเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศทั้งในด้านของการจ้างงาน และการส่งออก ซึ่งประเทศไทยเป็นทั้งผู้ผลิต และผู้ส่งออกยางธรรมชาติ หรือยางแปรรูปขั้นต้นรายใหญ่ที่สุดคิดเป็น 1 ใน 3 ของการผลิตยางพาราในตลาดโลก โดยในปี 2554 มีปริมาณการผลิต 3.57 ล้านตัน ซึ่งผลผลิตยางธรรมชาติของประเทศไทยส่งออกในรูปของยางแปรรูปขั้นต้น คิดเป็นปริมาณร้อยละ 83 ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 17 ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมยางกลุ่มปลายน้ำ เช่น ยางล้อ รองเท้ายาง ยางอุตสาหกรรม ถุงมือ และเส้นด้ายยางยืด ทั้งนี้การส่งออกยางพารา และผลิตภัณฑ์ยาง มีมูลค่ารวมทั้งสิ้น 21,565.20 ล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งยางพาราและผลิตภัณฑ์ยางเป็นสินค้าส่งออกที่มีมูลค่ามากเป็นอันดับที่ 1 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าทั้งหมดของไทย

ประเทศไทยผลิตยางธรรมชาติได้มากเป็นอันดับ 1 ของโลก ในช่วงปี 2551 - 2554 มีการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2554 สามารถผลิตยางธรรมชาติได้ 3,569,033 ตัน สำหรับผลิตภัณฑ์ยางที่สำคัญ เช่น ยางรถยนต์ ยางรถบรรทุก ยางรถโดยสาร ยางรถแทรกเตอร์ ยางล้อรถจักรยาน ถุงมือยาง ในช่วงปี 2551 - 2554 มีทิศทางเพิ่มขึ้น แต่ในปี 2554 ผลกระทบจากน้ำท่วมทำให้ส่งผลกระทบต่อผู้ผลิตยางรถยนต์ สำหรับในส่วนของการจำหน่ายถุงมือยาง/ถุงมือตรวจโรคได้มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง แม้ว่าจะอยู่ในช่วงภาวะเศรษฐกิจซบเซา เนื่องจากเป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้ในทางการแพทย์ และใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร และบริการ และถือได้ว่ายังมีความต้องการอย่างต่อเนื่องในตลาดโลก ตามกระแสความวิตกกังวลการรักษาสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค นอกจากนั้นยังพบว่าในประเทศมาเลเซียมีอุตสาหกรรมด้านการผลิตยางโดยเฉพาะถุงมือยางได้มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากข้อมูลด้านการผลิตผลิตภัณฑ์ยางชนิด ถุงมือยาง/ถุงมือตรวจโรค ในประเทศไทยนั้นมีอัตราเพิ่มขึ้นจากในปี พ.ศ. 2551 ผลิต 10,158.08 ล้านชิ้น เป็น 11,835.02 ล้านชิ้น ในปี 2554 (อุตสาหกรรมยางและผลิตภัณฑ์ยาง, 2554)

น้ำยางธรรมชาติ

น้ำยางสด (fresh or field latex) มีแหล่งที่มาจากต้นยางพารา *Hevea brasiliensis* โดยน้ำยางจะมีลักษณะเป็นของเหลวสีขาวหรือสีครีม น้ำยางอยู่ในท่อน้ำยางซึ่งเรียงตัวกันอยู่ในเปลือกของต้นยางโดยเฉพาะอย่างยิ่งเปลือกด้านในซึ่งอยู่กับเยื่อเจริญ น้ำยางสดที่กรีดได้จากต้นยางพารามีเนื้อยางแห้งประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) แขวนลอยอยู่ในน้ำ ปริมาณของเนื้อยางแห้งขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์ยาง อายุต้นยาง และฤดูกาลน้ำยางเป็นสารผสมที่ประกอบด้วยอย่างน้อยสองส่วนคือ ส่วนของสารแขวนลอย (disperse phase) กับส่วนที่เป็นตัวกลาง (disperse medium) โดยความเป็นของเหลวมาจากสถานะของตัวกลางซึ่งโดยทั่วไปเป็นน้ำ โดยจะใช้คำว่า “เซรุ่ม” (serum) ส่วนของสารแขวนลอยจะกระจัดกระจายในตัวกลาง ประกอบด้วย อนุภาคขนาดเล็กจำนวนมาก ที่มีรูปร่างค่อนข้างเป็นทรงกลมแยกกัน (วราภรณ์, 2549)

1. สมบัติ และองค์ประกอบของน้ำยาง

น้ำยางสดมีความหนาแน่น 0.975-0.980 mg m^{-3} มีความเป็นกรด- ด่าง (pH) ประมาณ 6.0 -7.0 และมีความหนืดไม่แน่นอน (วราภรณ์, 2555) โดยองค์ประกอบของน้ำยางแสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 องค์ประกอบของน้ำยาง

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก
ส่วนที่เป็นของแข็ง	36
เนื้อยางแห้ง	33
โปรตีน	1 - 1.5
สารเรซิน	1 - 2.5
เถ้า	สูงถึง 1
น้ำตาล	1
น้ำ (ในปริมาณที่รวมกับยางและสารอื่นๆ)	100

ที่มา: วราภรณ์ (2549)

สารต่างๆ ที่อยู่ในน้ำยางสดกระจายอยู่ในส่วนหรือเฟส (phase) แบ่งเป็นส่วนหลักๆ 3 ส่วน คือ

1. อนุภาคยาง (rubber particles) ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำยาง
2. ส่วนที่เป็นน้ำ (aqueous phase) ประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำยาง
3. ส่วนของลูทอยด์ (lutoid phase) ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำยาง

2. อนุภาคยาง

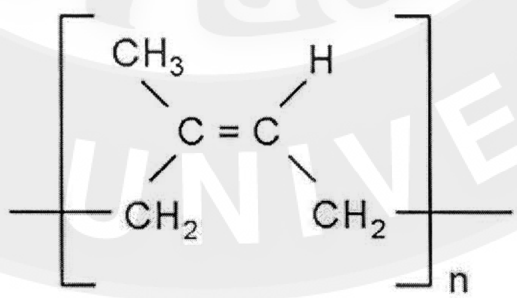
อนุภาคยางส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นทรงกลม หรืออาจเป็นรูปลูกแพรบ้าง โดยมีขนาดตั้งแต่ 200 - 500 nm องค์ประกอบของส่วนอนุภาคยางประกอบดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดงองค์ประกอบของส่วนอนุภาคยาง

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์ ของน้ำยาง
ยางไฮโดรคาร์บอน	86
น้ำ	10
โปรตีน	1
ไลปิด	3

ที่มา: วราภรณ์ (2555)

โดยธรรมชาติไฮโดรคาร์บอนของน้ำยางประกอบด้วยคาร์บอน 5 และไฮโดรเจน 8 อะตอม (C_5H_8) ที่มีชื่อทางเคมีว่า ไอโซพรีน (isoprene) หน่วยย่อยดังกล่าว เมื่อเกิดการเชื่อมโยงเป็นโมเลกุลจะเรียงตัวกันแบบซิส 1, 4 พอลิไอโซพรีนสายตรง (linear cis-1, 4 - polyisoprene) ดังแสดงในภาพ 1



cis-1,4-polyisoprene

ภาพ 1 ซิส 1, 4 พอลิไอโซพรีนสายตรง ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของยางธรรมชาติ
ที่มา: http://www.rubbercenter.org/dictionary/show.php?ID=5. (15 กันยายน, 2557)

3. น้ำยางสด

เป็นสารละลายที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.020 mg m^{-3} มีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด ชนิดหลักได้แก่ คาร์โบไฮเดรต อิเล็กโทรไลท์ โปรตีน และกรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรตชนิดหลักที่อยู่ในน้ำยางสด คือ 1 – methyl inositol หรือ quebrachitol ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำยาง และคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ อีกเล็กน้อย ได้แก่ กาแลคโตส ซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และอินโนซิทอล อื่นๆ โดยสารเหล่านี้มีผลต่อสมบัติน้ำยางและยางแห้ง ถ้าการเก็บรักษาสภาพไม่เหมาะสม คาร์โบไฮเดรตจะถูกออกซิไดซ์โดยจุลินทรีย์เกิดเป็นกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acids) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรด formic, acetic และ propionic โปรตีนที่อยู่ในน้ำของน้ำยางสด ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มี isoelectric point ต่างกัน โปรตีนชนิดหลักคือ α – globulin และ hevein ส่วนของกรดอะมิโน มีทั้ง multiplicity of polypeptides และsimple amino acids ทั้งนี้ ยังไม่เป็นที่ชัดเจนว่ากรดอะมิโนเหล่านี้จะมาก่อน หรือเกิดจากผลของการสลายของโปรตีนในน้ำยาง (หรืออาจทั้ง 2 กรณี) ปริมาณของ free amino acids มีอยู่ประมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (วราภรณ์, 2555)

4. ลูทอยด์

ลูทอยด์ หรือ viscoids เป็นอนุภาคที่ไม่ใช่ยาง รูปร่างเป็นทรงกลม มีเยื่อหุ้มเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคลูทอยด์ คือ 2 - 10 ไมโครเมตร มีปริมาณประมาณ 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำยาง ในทางเคมีลูทอยด์ประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ มีโปรตีนละลายน้ำได้ประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และฟอสโฟไลปิดประมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ภายในลูทอยด์มีสารละลาย (บางครั้งเรียกว่า β - serum) ที่ประกอบด้วยสารละลายของกรด เกลือแร่ โปรตีน น้ำตาล และโพลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) มีความเป็นกรด - ด่าง ประมาณ 5.5 ในขณะที่เซรุ่มส่วนบนมีความเป็นกรด – ด่าง ประมาณ 6.9 ในลูทอยด์มีโปรตีนหลายชนิด ส่วนของสารโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำเป็นลักษณะ fibrils มีทั้งขนาดหยาบและละเอียด ส่วนมากพบเฉพาะในน้ำยางที่กรีดจากต้นยางอายุน้อยและจะค่อยๆ หายไปเมื่อต้นยางมีอายุมากขึ้น โดยมีส่วนของโพลฟีนอลออกซิเดสเป็นส่วนที่ทำให้น้ำยางมีสีคล้ำขึ้นเมื่อสัมผัสอากาศหรือออกซิเจน (วราภรณ์, 2555)

5. แหล่งของน้ำยาง (http://www.aopdr01.doae.go.th/latex.htm; 15 กันยายน 2557)

น้ำยางอยู่ภายในท่อน้ำยาง ซึ่งเกิดจากการแบ่งตัวของเยื่อเจริญ โดยที่กลุ่มเซลล์ชนิดเดียวกันมาเชื่อมต่อกัน แล้วผนังเซลล์หัวท้ายสลายตัวอาจเพียงบางส่วน หรือสลายตัวหมดกลายเป็นท่อเดียวกันแล้วแตกสาขา และยังเชื่อมต่อกับเซลล์ชนิดเดียวกันที่อยู่ข้างเคียง โดยการสลายตัวของผนังเซลล์ด้านข้าง เกิดเป็นช่องเปิดติดต่อกันได้ทำให้มีลักษณะคล้ายร่างแห ลักษณะของท่อน้ำยางเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่าถ้าตัดเปลือกยางออกทางด้านตัดตามขวาง จะเห็นท่อน้ำยางตรงบริเวณหน้าตัด มีลักษณะกลมเรียงตัวกันเป็นวงรอบลำต้น ท่อน้ำยางมีเฉพาะภายในส่วนที่เป็นเปลือกของต้นยาง ซึ่งเปลือกของต้นยางนี้แบ่งออกเป็น 2 ชั้น ตามลักษณะของเนื้อเยื่อและการเกิดของ stone cell ในเปลือกยาง

(1.) เปลือกชั้นในสุด (soft bark zone) อยู่บริเวณที่ติดกับเยื่อเจริญหรือใกล้กับเนื้อไม้เป็นเนื้อเยื่อ และท่อน้ำยางที่สร้างขึ้นใหม่จึงเป็นชั้นที่มีจำนวนวงท่อน้ำยางหนาแน่น และสมบูรณ์ที่สุด เพราะฉะนั้นผลผลิตสูงสุดของต้นยางแต่ละต้นจะอยู่ที่บริเวณนี้ แต่ความหนาแน่นของเปลือกยางชั้นนี้ค่อนข้างบางคือ ประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของความหนาของเปลือกทั้งหมดเท่านั้น และจะไม่มี stone cell เลยจึงทำให้เนื้อเยื่อชั้นนี้ค่อนข้างอ่อนนุ่ม

(2.) เปลือกชั้นนอก (hard bark) อยู่ถัดจากเปลือกชั้นในสุดออกมาทางด้านนอกเป็นชั้นที่เยื่อเจริญสร้างขึ้นก่อนแล้วถูกดันออกมาด้านนอกเมื่อมีการสร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่ขึ้นมาแทนที่ ในชั้นนี้จะมี stone cell เกิดขึ้น ซึ่ง stone cell เหล่านี้จะทำให้เปลือกยางแข็งท่อน้ำยางไม่สมบูรณ์ขาดเป็นช่วงๆ

โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติที่ส่งผลให้เกิดอาการแพ้ต่อผู้ใช้งาน

โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติเป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ออกซิเจน และซัลเฟอร์มารวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ที่มีกรดอะมิโน หลายร้อยหมู่เชื่อมต่อด้วยพันธะเปปไทด์ (peptide bonds) (Perrealla and Gaspari, 2002) โดยปริมาณของโปรตีนที่พบอยู่ระหว่าง 1 - 1.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันตามแหล่งที่มาของน้ำยาง (วราภรณ์, 2555) เมื่อนำน้ำยางธรรมชาติมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ถุงมือยาง พบว่ามีผู้ที่ใช้งานเกิดอาการแพ้ถุงมือยางนั้นถึง 17 เปอร์เซ็นต์ โดยอาจเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น การสัมผัสกับผงแป้งข้าวโพดที่ใช้เป็นสารหล่อลื่นในการผลิตถุงมือยางซึ่งเป็นพาหะที่ดีของโปรตีน ทำให้โปรตีนดังกล่าวแพร่กระจายไปในอากาศได้ (นุชนาฏ และ วราภรณ์, 2539) หรือสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในถุงมือยาง การที่สารเคมีที่อยู่ในถุงมือยางซึมสู่ผิวหนังแล้วรวมตัวกับโปรตีนในร่างกาย หรือการรวมตัวกันของสารเคมี หรือผงแป้งในถุงมือยางกับโปรตีนที่มีสารก่อให้เกิดภูมิแพ้ในน้ำยางธรรมชาติ อาการแพ้ส่วนใหญ่จะแสดงออกในรูปของผื่นคันและผิวหนังอักเสบ การกำจัดหรือการลดโปรตีน (deproteinization) ในน้ำยางธรรมชาติเพื่อแก้ไขปัญหาอาการแพ้สามารถทำโดยใช้วิธีเคมี กายภาพ หรือการใช้วิธีเคมี และกายภาพร่วมกัน แต่การลดโปรตีนก็มีทั้งผลดีและผลเสียต่อคุณสมบัติของน้ำยางธรรมชาติซึ่งเชื่อกันว่าโปรตีนในน้ำยางมีบทบาทสำคัญต่อคุณสมบัติการยืดหยุ่น (elasticity) ของยาง โดยมีข้อเสีย คือ ทำให้ความเสถียรของน้ำยางลดลง (destabilization) และเปลี่ยนคุณสมบัติในการจับตัวเป็นก้อน (coagulation) ของน้ำยาง แต่ข้อดี คือ โปรตีนจะช่วยรักษาความเสถียรของคอลลอยด์ในน้ำยาง (colloidal stability) ในขณะผลิตยาง (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

1. ชนิดของโปรตีนภูมิแพ้ที่อยู่ในน้ำยางพาราสด

1.1 Hev b1 (rubber elongation factor; REF)

Hev b1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 137 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14 kDa (Priya et al., 2006) และ 58 kDa โดยพบว่า REF เป็นโปรตีนที่มีส่วนช่วยในการสังเคราะห์ cis-1,4-polyisoprene โดยทำหน้าที่ร่วมกับ cis-prenyl transferase ในการต่อหน่วย isoprene ให้กับสาย cis-1,4 polyisoprene (Dennis et al., 1989) ซึ่งเมื่อจัดประเภทพบว่าโปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนในกลุ่มสร้างเนื้อยาง แต่อย่างไรก็ตามพบว่าโปรตีนชนิดนี้ส่งผลต่อผู้ป่วยที่เป็นโรค Spina bifida ซึ่งเป็นโรคที่มีความผิดปกติทางไขสันหลัง โดยพบว่าโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้พบมากถึง 9 เปอร์เซ็นต์ในผู้ป่วย จากผู้ป่วยทั้งหมด 12 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นโรค Spina bifida โดยโปรตีน Hev b1 มีความจำเพาะต่อแอนติบอดี immunoglobulin E (IgE) (Gordon et al., 2002)

1.2 Hev b2 (β - 1, 3 - glucanase)

β - 1, 3 - glucanase มีน้ำหนักโมเลกุล 34 – 36 kDa (Hamilton, 2002) สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาไฮโดรไลติกที่สามารถย่อยพันธะของ β-1, 3-glucan โดยพบว่าโปรตีนชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับ แอนติบอดี IgE อย่างชัดเจน และ Hev b2 นี้ยังสามารถกระตุ้น T - cell ของผู้ป่วย (Gordon et al., 2002)

1.3 Hev b3 (small rubber particle protein; SRPP)

Hev b3 ถูกพบอยู่ในส่วนของอนุภาคยาง (Gordon et al., 2002) โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 24 – 27 kDa (Hamilton, 2002) โปรตีนชนิดนี้ส่งผลต่ออาการภูมิแพ้ในผู้ป่วยเด็กที่มีความผิดปกติที่กระดูกสันหลัง (Spina bifida) และมีการเกิดปฏิกิริยาคล้ายกับ Hev b1 (Palosuo, 1997) ที่มีความจำเพาะต่อเอนติบอดี IgE ที่ส่งผลทำให้เกิดอาการแพ้ขั้นรุนแรง และเป็นปฏิกิริยาการแพ้ที่เกิดขึ้นทันที (Banerjee et al., 2000)

1.4 Hev b4 (microhelix)

Hev b4 มีน้ำหนักโมเลกุล 50 – 57 kDa (Gordon et al., 2002) ซึ่งพบว่ามีความจำเพาะกับ IgE โดยพบว่าผู้ที่สัมผัสหรือใช้ยางพาราโดยเฉพาะผู้ที่ทำงานอยู่ในวงการแพทย์มีอาการแพ้ที่เกิดจากโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้ ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบผู้ป่วยที่เป็นโรค Spina bifida พบว่ามีการแพ้โปรตีนนี้ประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ จากผู้ป่วย 77 เปอร์เซ็นต์ (Gordon et al., 2002)

1.5 Hev b5 (acidic protein)

Hev b5 เป็นโปรตีนชนิด acidic ที่อุดมไปด้วยกรดกลูตามิก (Beezhold et al., 1999) มีน้ำหนักโมเลกุล 16 – 24 kDa (Hamilton, 2002) โดยพบว่าโปรตีน Hev b5 เป็นโปรตีนหลักที่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ IgE โดยตรง และทำให้เกิดการหลั่งของสารฮีสทามีน (Histamine) จากเม็ดเลือดขาวซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการแพ้ (Gordon et al., 2002) ซึ่งจากรายงานของ Palosuo (1997) พบว่า Hev b5 เป็นโปรตีนที่ส่งผลต่อการเกิดอาการผิดปกติจากโปรตีนภูมิแพ้ 92 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าก่อการเกิดอาการภูมิแพ้ในผู้ป่วยโรค Spina bifida ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

1.6 Hev b6 (hevein protein)

Hev b6 มีน้ำหนักโมเลกุล 43 – 36 kDa (Hamilton, 2002) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวกับการจับตัวของอนุภาคในน้ำยาง และเมื่อทำการทดสอบทาง Immunoblots และ ELISA ของผู้ป่วยโรค Spina bifida พบว่ามีการแสดงการทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง N – terminal มากกว่าแสดงที่ตำแหน่ง C – terminal อย่างเดียว โดยพบว่าโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้ส่วนใหญ่จะก่ออาการภูมิแพ้ในผู้ใหญ่ที่เป็นบุคคลทางการแพทย์มากกว่าในเด็ก (Gordon et al., 2002)

1.7 Hev b7 (patatin homolog)

Hev b7 มีน้ำหนักโมเลกุล 43 – 36 kDa (Hamilton, 2002) โปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนในกลุ่มสร้างเนื้อยาง โดยจากการศึกษาของ Beezhold et al. (1996) ที่ศึกษาผู้ป่วยที่มีการแพ้โปรตีน พบว่านี้มีผู้ป่วยที่เกิดการแพ้ โปรตีนชนิด Hev b7 ประมาณ 23 เปอร์เซ็นต์

1.8 Hev b8 (latex profilins)

Hev b8 มีน้ำหนักโมเลกุล 14 - 14.2 kDa (Hamilton, 2002) เมื่อตรวจสอบโดย skin prick test ในผู้ป่วย Spina bifida แล้วพบว่ามีการแสดงออกของ Hev b8 จำนวน 24 คน จากทั้งหมด 36 คน นอกจากนี้โปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้สามารถพบได้ในผลไม้ต่างๆ เช่น กล้วย ได้อีกด้วย (Gordon et al., 2002)

1.9 Hev b9 (enolase)

Hev b9 มีน้ำหนักโมเลกุล 51 kDa (Hamilton, 2002) Hev b9 เป็นส่วนประกอบของ C - serum ของน้ำยางธรรมชาติ ในปริมาณที่สูง (Gordon et al., 2002) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะถูกสร้างขึ้นเมื่อมีสิ่งกระตุ้นจากความเครียดทางด้านกายภาพและเคมี การติดเชื้อโรค บาดแผล สิ่งแวดล้อมภายนอก รวมถึงระยะพัฒนาของพืชด้วย (จันทร์ข้างแรม, 2013)

1.10 Hev b10 (Mn superoxide dismutase**; MnSOD)**

Hev b9 มีน้ำหนักโมเลกุล 22 – 26 kDa (Hamilton, 2002) แต่เมื่อทำการทดสอบกับผู้ป่วยที่เป็นโรค Spina bifida มีการแสดงออกโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้เพียง 1 คน จาก 26 คน (Gordon et al., 2002)

1.11 Hev b11 (class I chitinase)

Hev b11 มีน้ำหนักโมเลกุล 33 kDa (Hamilton, 2002) แสดงอาการแพ้แบบ Type I ซึ่ง (ปฏิกิริยาการแพ้เกิดขึ้นทันที เนื่องจาก IgE ที่ถูกสร้างขึ้นมาจะมีปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงต่อสารก่อภูมิแพ้) จึงเป็นอาการภูมิแพ้ขั้นรุนแรงที่สุดที่เกิดจากโปรตีนอยู่ในน้ำยางธรรมชาติ (Gordon et al., 2002)

ตาราง 3 ชนิดโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้จากยางพารา *Hevea brasiliensis*

Name	Description	Allergen group	Molecular mass (kDa)	pI
Hev b 1	Rubber elongation factor	1	14.6	8.45
Hev b 2	β1, 3 – Gluconase	3	34 – 36	10
Hev b 3	small rubber particle protein	1	24 – 27	4.8
Hev b 4	Microhelix	4	50 – 57	4.5
Hev b 5	Acidic protein	4	16 – 24	3.5
Hev b 6	Hevein protein (6.01/6.02/6.03)	2,3	43 – 36	4.8
Hev b 7	Patatin homolog (7b/c)	2,3	43 – 36	4.8
Hev b 8	Hevea profilin	4	14 – 14.2	NA
Hev b 9	Hevea enolase	4	51	NA
Hev b 10	Mn superoxide dismutase	4	22 – 26	NA
Hev b 11	Class I chitinase	3	33	NA

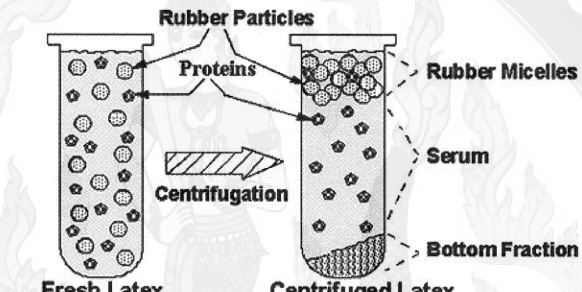
ที่มา: Hamilton (2002)

2. การกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยาง

การกำจัดหรือการลดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ (deproteinisation) เพื่อป้องกันอาการแพ้แบบ type-I เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ยางที่มีระดับโปรตีนต่ำ (deproteinized natural rubber, DPNR) และเพื่อป้องกันอันตรายต่อผู้แพ้โปรตีน โดยเฉพาะผู้ที่ใช้ผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสกับผิวโดยตรง (พงษ์ธร, 2548) สามารถทำโดยใช้วิธีการปั่นเหวี่ยงหลายครั้ง (multi centrifuging) การแยกด้วยเมมเบรน (membrane filtration) วิธีเคมี การใช้สารลดแรงตึงผิว (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553) การย่อยโปรตีนด้วย proteolytic enzyme (George et al., 2007)

2.1 การปั่นเหวี่ยงน้ำยางธรรมชาติ (centrifugation of NRL)

โปรตีนอิสระละลายอยู่ในส่วนของเซรุ่ม ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ และจะเกาะอยู่ในส่วนของอนุภาคยาง 25 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพ 2 เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซรุ่มทิ้งไปจะทำให้น้ำยางมีความเข้มข้นขึ้น โดยปริมาณน้ำที่อยู่ในน้ำยางจะลดลง และเป็นการกำจัดโปรตีนออกไปด้วย เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงน้ำยางในครั้งแรกจะสามารถลดปริมาณโปรตีนในเซรุ่มได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า และเมื่อทำการปั่นเหวี่ยงครั้งที่สองสามารถลดปริมาณโปรตีนได้ถึง 63 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีนี้ไม่สามารถกำจัดโปรตีนที่เกาะอยู่บริเวณอนุภาคยางออกไปได้ ซ้ำยังทำให้โปรตีนในน้ำยางเพิ่มขึ้นจาก 25 เปอร์เซ็นต์ เป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (Perrella and Gaspari, 2002)



Fresh Latex	
Rubber	35 %
Proteins	2.0 %
Carbohydrates	1.5 %
Lipids	1.3 %

Centrifuged Latex	
Rubber	59 %
Proteins	1.0 %
Carbohydrates	0.2 %
Lipids	2.0 %

ภาพ 2 ปริมาณโปรตีนและสารอื่นๆ ในน้ำยางสดก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยง
ที่มา: Perrell and Gaspari (2002)

2.2 การกำจัดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้สารเคมีและสารลดแรงตึงผิว

จากรายงานของ Ariyawiriyanan et al. (2013) ในการกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยางธรรมชาติ ได้มีการนำน้ำยางธรรมชาติบ่มกับแอมโมเนียที่มีความเข้มข้นสูง และบ่มกับยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องและได้พบว่าระดับของไนโตรเจนในน้ำยางธรรมชาติที่ทำการเติมยูเรียมีปริมาณไนโตรเจนลดลงมากกว่าการใช้แอมโมเนียสูงถึง 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี modified Lowry พบว่ามีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ลดลงมากกว่าการใช้แอมโมเนียเพียงอย่างเดียว ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีการใช้สารเคมีที่สามารถลดโปรตีนในน้ำยางพาราได้อีกวิธีหนึ่ง

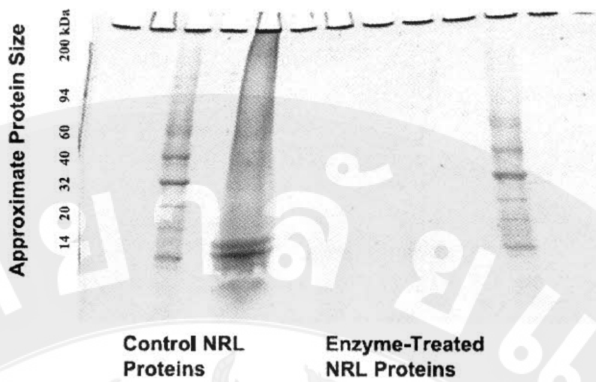
จากรายงาน Honeycutt et al. (2006) มีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดโปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ โดยการใช้สารเคมีอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ($Al(OH)_3$) และ ซิลิกาไดออกไซด์ (SiO_2) โดยนำมาละลายในสารละลาย KOH และผสมกับน้ำยางธรรมชาติที่อุณหภูมิห้อง แล้วกวนให้เข้า

กันนาน 72 ชั่วโมง สำหรับ Al $(OH)_3$ และ 24 ชั่วโมงสำหรับ SiO_2 ซึ่งสามารถทำให้ระดับโปรตีนที่ทำให้ก่ออาการแพ้ลดลงเหลือน้อยกว่า 0.2 กรัม/กรัม และนอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อมีการเติมกรด HCl ที่ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการใส่ลงในน้ำยางธรรมชาติที่มีการเติมโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate: SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนลดลงเป็นอย่างมากที่ pH 2 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าค่าความหนาแน่นของเนื้อยางนั้นลดลงด้วย (Siti Maznah et al., 2008)

นอกจากนั้นการใช้สารลดแรงตึงผิวชนิด non- ionic surfactant สามารถลดสารก่อภูมิแพ้ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวที่นิยมใช้คือ Triton TM X-100 และการใช้ TritonTM X-100 ควบคู่ไปกับการล้าง 4-5 ขั้นตอน (alginate creaming phase separation - redilution) จะลดสารโปรตีนภูมิแพ้ มากถึง 98-99 เปอร์เซ็นต์ (Schloman et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามรายงานของ Rattanaphan et al. (2012) พบว่า SDS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถสกัดโปรตีนออกมาจากยางสกริมที่เป็นแผ่นฟิล์ม ได้มากกว่าการใช้ NaOH ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ Triton TM X-100 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

2.3 การกำจัดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติโดยใช้เอนไซม์

วิธีการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส จากการรายงานที่ผ่านมาพบว่า เอนไซม์จะทำหน้าที่ในการช่วยไฮโดรไลซ์โปรตีนได้มากถึงล้านเท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้เอนไซม์ (ชญาภา, 2550) ซึ่งพบว่าการย่อยโปรตีนในน้ำยางพาราโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส และการปั่นเหวี่ยงแยกเซรุ่มออกจากน้ำยางให้เป็นน้ำยางโปรตีนต่ำสามารถช่วยให้โปรตีนลดลง เช่น ถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางธรรมชาติที่ใช้เอนไซม์ปาเปน (papain) ย่อยสลายโปรตีนพบว่าสามารถลดปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในถุงมือยางได้เหลือน้อยกว่า 50 ไมโครกรัม/ลิตร (George et al, 2007) และจากรายงานของ Perrealla and Gaspari (2002) ได้พบว่าการนำเอนไซม์โปรติเอสกลุ่ม alkaline protease บ่มร่วมกับน้ำยางเป็นเวลา 1 ถึง 2 วัน ที่อุณหภูมิ 13-32 $^{\circ}$C จากนั้นตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) พบว่าสามารถลด allergenic protein ได้สูงถึง 95 โดยเอนไซม์โปรติเอสสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งในส่วนของเซรุ่ม และส่วนของอนุภาคยาง ดังภาพ 5 นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เอนไซม์ร่วมกับการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวมีประสิทธิภาพเป็นอย่างมากในการเตรียมน้ำยางธรรมชาติที่มีความบริสุทธิ์สูง (Ichikawa et al.,1993) โดยโปรติเอสที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ เช่น ปาเปน จากมะละกอ โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด (พรรษา และ กฤษณา, 2543)



ภาพ 3 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในตัวอย่างน้ำยางธรรมชาติและน้ำยางธรรมชาติที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสกลุ่ม alkaline protease

ที่มา: Perrealla and Gaspari (2002)

จากรายงานของ อดุลยธรรม และคงศิลป์ (2543) ในการเติมเอนไซม์ปาเปน และเอนไซม์โบรมิเลนลงในน้ำยางสดที่มีการเติมสารแอมโมเนีย 0.4 เปอร์เซ็นต์ และทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่หลงเหลืออยู่ พบว่าปริมาณไนโตรเจนในน้ำยางสดที่มีการเติมเอนไซม์โบรมิเลน 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 0.37 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ชุดการทดลองที่ไม่เติมโบรมิเลนมีไนโตรเจน 0.49 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังพบว่าโปรติเอสทำให้ค่าความอ่อนตัวเริ่มแรก (Initial Plasticity; PO) มีค่าค่อนข้างสูงกว่ายางทั่วไป และค่าความคงตัวทางกลของน้ำยางข้นลดลงเมื่อเทียบกับน้ำยางข้นที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ และเมื่อเก็บน้ำยางทิ้งไว้ 4 เดือน น้ำยางข้นมีความคงตัวทางกลต่ำเหลือเพียง 248 วินาที นอกจากนั้นน้ำยางข้นมีแนวโน้มการเกิดครีมทำให้วัดค่าปริมาณเนื้อยางแห้ง (DRC) และค่าปริมาณของแข็งรวม (TSC) สูงขึ้นเมื่อทำการเก็บน้ำยางไว้นาน ซึ่งจากรายงานนี้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อมีการใช้เอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยางแล้วควรมีการปั่นแยกซ้ำเพื่อให้โปรตีนที่ถูกย่อยสลายเนื่องจากเอนไซม์ถูกล้างออก จากการนำน้ำยางข้นไปปั่นในครั้งแรกแล้วเจือจางด้วยน้ำให้เหลือ 30 เปอร์เซ็นต์ DRC แล้วนำเข้าปั่นแยกซ้ำเพื่อเป็นการล้างเอาโปรตีนออก

Pichayakorn et al. (2012) ได้ศึกษา การเตรียมน้ำยางโปรตีนต่ำเพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มที่มีการผสมกับโพลิเมอร์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้ทางการแพทย์ มีกระบวนการเตรียมน้ำยางพาราโปรตีนต่ำโดย น้ำน้ำยางพาราสดมาผสมกับ SDS 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สารรักษาสภาพชนิด Uniphen P- 23 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เอนไซม์ alcalase 0.2 phr (parts per hundred of dried rubber) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 M ความเป็นกรด- ด่าง 7-8 จากนั้นทำการ

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นำส่วนใสออก และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและทำการผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm จะได้น้ำยางพาราโปรตีนต่ำซึ่งจะอยู่ด้านบนสุด และทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม

การผลิตเอนไซม์เชิงอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะใช้ในอุตสาหกรรมการซักล้าง อุตสาหกรรมแป้ง และอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่ที่ใช้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) (ปราณี, 2556) ซึ่งถือว่ากระบวนการผลิตเอนไซม์นั้นเป็นสิ่งที่สำคัญมาก (Kirk et al., 2002) ผู้ผลิตจะต้องคำนึงถึงความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัย ในการนำมาประยุกต์ใช้โดยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากๆมากกว่าครึ่งของเอนไซม์ในทางการค้ามีการผลิตมากจาก *Bacillus* sp.โดยส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกผลิตออกมานอกเซลล์เช่นกัน (Priest, 1997) และประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์เป็นการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Pandey et al., 2000) ซึ่งในการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากส่วนใหญ่จะใช้วิธีการตัดต่อสายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตในการผลิตเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีการเพิ่มผลผลิตวิธีนี้ไม่เสถียร ดังนั้น การเพิ่มสารอาหารหลักจึงเป็นอีกวิธีที่ดีในการเพิ่มการผลิตของเอนไซม์ (Dey et al., 2001) การหมักเพื่อผลิตเอนไซม์นั้นจึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสม โดยต้องมีความสมดุลระหว่างส่วนประกอบของอาหารและส่วนประกอบอื่นที่ใช้ในการหมัก (Kumar and Takagi, 1999)

1. การคัดแยกจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ (ปราณี, 2556)

การคัดแยกจุลินทรีย์เป็นขั้นตอนแรก โดยการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จะสำเร็จได้ผลดีต้องคำนึงถึงปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ (1.) ลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และกระบวนการหมัก (2.) วิธีการคัดแยก และคัดเลือกจุลินทรีย์เมื่อคัดเลือกได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ดีแล้วต้องนำมาเพาะเลี้ยง และปรับสภาวะในการหมักให้เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ ได้แก่ การเตรียมหัวเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ

หัวเชื้อ (inoculum) หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ การเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นต้องได้มาตรฐาน ปริมาณ และคุณภาพของหัวเชื้อเพื่อให้ได้ผลผลิตของชีวมวลสูงสุด ลักษณะของหัวเชื้อที่ดีคือ เป็นเชื้อที่แข็งแรงและอยู่ในระยะการเจริญ นั่นคือ อยู่ในช่วงระยะ logarithmic phase ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีกิจกรรมภายในเซลล์สูงสุด มีปริมาณมากเพียงพอ ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น และมีสมบัติคงที่ให้ผลผลิตตามต้องการ

ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต (production medium) นั้นควรเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเชิงซ้อน (complex media) เพราะเป็นอาหารที่มีวัตถุดิบราคาถูกและให้ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (synthetic medic) ส่วนประกอบของอาหารควรมีราคาถูก และหาง่าย เช่น แหล่งคาร์บอน (carbon sources) อาจใช้แป้งธัญพืชต่างๆ เช่น แป้งข้าวบาร์เลย์ แป้งข้าวโอ๊ต แป้งข้าวโพด แป้งข้าวสาลี แป้งข้าวไรน์ หรือของเสีย/ของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น กากน้ำตาล หรือโมลาส (molasses) และสตาร์ชไฮโดรไลเสต (starch hydrolysate) สำหรับแหล่งไนโตรเจน (nitrogen sources) ได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเหลือง กากถั่วเหลือง ถั่วเหลืองป่น นำแช่ข้าวโพด ยีสต์ไฮโดรไลเสต กลูเตน และเจลาติน ส่วนแหล่งเกลือแร่ (mineral sources) อาจใช้ในรูปของเกลืออนินทรีย์ต่างๆ ที่เป็นแหล่งของโพแทสเซียม ฟอสเฟต ซัลเฟต และแคลเซียม

2. การควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์

เนื่องจากการสังเคราะห์เอนไซม์ถูกควบคุมโดยยีนและกระบวนการเมแทบอลิซึม จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องรู้ว่าเอนไซม์ที่ต้องการผลิตนั้นเป็นเอนไซม์ประเภท inducible enzyme ซึ่งจุลินทรีย์จะสร้างได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีสารชักนำ (inducer) หรือ repressible enzyme (สมใจ, 2555) ซึ่งโดยปกติแล้วสารชักนำมักจะเป็นสับสเตรทของเอนไซม์หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรท ดังนั้นการทราบสารอาหารประเภทใดบ้างที่เป็นสารเหนี่ยวนำจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง และสารอาหารต้องเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณสารอาหารที่เติมลงไป นอกจากนั้นต้องคำนึงถึงสารที่จะเกิดขึ้นระหว่างการหมักซึ่งอาจมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ และยังต้องคำนึงถึงลักษณะของอาหารที่ใช้กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมมี 2 แบบ คือ กระบวนการหมักแบบอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (solid state fermentation) และกระบวนการหมักแบบอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (submerge fermentation) การที่จะเลือกกระบวนการหมักแบบใดจะต้องคำนึงถึงชนิดจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เพราะจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ในสภาพอาหารแข็งได้ดีกว่าในสภาพอาหารเหลว และต้องมีการคำนึงถึงสภาวะหรือปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจน การกวน การให้อากาศ รวมถึงระยะเวลาในการผลิตควรทำการศึกษาว่าจุลินทรีย์มีการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดในช่วงระยะเวลาใดของการเจริญ เพื่อที่จะหยุดกระบวนการหมักและการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ในเวลาที่เหมาะสม และจะทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์ที่สูงสุด เพราะหากไม่

เก็บเกี่ยวเอนไซม์ในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมและปล่อยให้การหมักดำเนินต่อไป เอนไซม์อาจถูกทำลายโดยเอนไซม์โปรติเอสหรือสารอื่นๆ ทำให้ปริมาณเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว

เอนไซม์โปรติเอส (Proteases)

โปรติเอสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนต่างๆ (Ashis et al., 2007) ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในสิ่งมีชีวิต นอกจากนั้นยังพบว่ามีการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าเอนไซม์โปรติเอสถูกใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นสัดส่วนถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (Mehrotra et al., 1999) ซึ่งในปี 1956 เป็นครั้งแรกที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นเอนไซม์ทางการค้า โดยโปรติเอสสามารถจำแนกได้เป็น acid, neutral และ alkaline protease ซึ่งแบ่งตามสภาวะความเป็นกรด – ด่าง (pH) ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ (Ashis et al., 2007) แต่หากจำแนกโปรติเอสโดยใช้ตำแหน่งในการเกิดปฏิกิริยาบนโมเลกุลโปรตีน สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาที่ C – terminal หรือ N – terminal ของสายโพลีเปปไทด์ เรียกว่าเอนไซม์เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) และเอนไซม์ที่ตัดภายในสายโพลีเปปไทด์ เรียกว่า เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) (ปราณี, 2543) แต่โดยทั่วไปแล้วโปรติเอสได้ถูกแบ่งเป็นสี่กลุ่มย่อย ดังต่อไปนี้

1. โปรติเอสเซรีน (Serine protease; Alkali protease)

โปรติเอสเซรีนมีกรดอะมิโน serine และ histidine ที่บริเวณเร่ง มีกลไกการเร่งปฏิกิริยาขึ้นกับหมู่ hydroxyl ของหมู่เซรีน และมีองค์ประกอบอื่นที่สำคัญในการเร่งการตัดพันธะเปปไทด์ คือ การมีหมู่ - NH- ที่สองสายแกนหลักเพื่อนำมาใช้สำหรับพันธะไฮโดรเจนกับการพัฒนาประจุลบของออกซิเจนจากหมู่คาร์บอนิลของพันธะเปปไทด์ที่จับได้ ซึ่ง alkali proteases มีช่วง pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ที่ pH > 7 (pH 7 – 11) (Barrett et al., 2003; Dixon and Webb, 1979)

2. โปรติเอสซีสเตอีน (Cysteine proteases)

เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน และจะถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า sulfhydyl reagents หรือ sulfhydyl group (-SH) หรือกลุ่มไทออล ทำให้หมู่อนุมูล sulfhydyl ที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนอาจสูญเสียแอกติวิตีไปในที่สุด จึงเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า Sulfhydryl proteases เอนไซม์ที่จัดอยู่กลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด

3. โปรติเอสมีโลหะ (Metal – containing proteases)

หมายถึง โปรติเอสที่มีไอออน และโลหะรวมในโมเลกุลเอนไซม์ หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลายกล่าวคือ อยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ (cofactor) มีสมบัติที่สำคัญ คือ เป็นโปรติเอสที่อยู่ภายนอกเซลล์เกือบทั้งหมด เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในช่วงของ pH เป็นกลาง (pH 6.5 – 7.5) เรียก neutral protease และเนื่องจากมีไอออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยา จึงถูกยับยั้งด้วยสารจับไอออนของโลหะ (Metal chelating agent) เช่น 1, 10 – phenanthroline และ EDTA ตัวอย่างเอนไซม์ ได้แก่ Carboxypeptidase A และ Carboxypeptidase B

4. โปรติเอสกรด (Acid proteases)

หมายถึง โปรติเอสที่มีช่วง pH ของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วง pH ของกรด (pH < 7) โดยทั่วไป เอนไซม์กลุ่มนี้มีช่วง pH ที่เหมาะสม ระหว่าง pH 2 – 4 และไม่แสดงชัดเจนถึงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทบริเวณเร่ง อย่างไรก็ตามจากการพิจารณาของ pH activity profile ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่ Carboxyl มากกว่า 1 หมู่ จากอนุมูลกรดแอสปาติกอยู่ที่บริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เรนนิน (rennin) และเปปซิน (pepsin)

การเก็บเกี่ยวและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ภายในเซลล์จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เอนไซม์จะอยู่ร่วมกับสารประกอบอื่นจำนวนมาก โดยภายในเซลล์จะประกอบด้วยเอนไซม์จำนวนหลายร้อยชนิด ดังนั้นถ้าต้องการศึกษาเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งจึงจำเป็นต้องแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ก่อน เพื่อลดการรบกวนจากเอนไซม์อื่น ซึ่งอาจมีการใช้สับสเตรทร่วมกันหรือเปลี่ยนผลิตผลของเอนไซม์หนึ่งไปเป็นสารอื่น หรืออาจถูกย่อยสลายจากเอนไซม์อื่นโดยตรง ซึ่งความจำเป็นในการแยกเอนไซม์มีหลายระดับตั้งแต่การเตรียมเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมซึ่งอาจไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มากนัก ไปจนถึงการเตรียมเอนไซม์เพื่อใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรม ทำต้องใช้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง

1. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปราณี, 2556)

1.1 การตกตะกอน (precipitation)

การตกตะกอนเป็นการทำให้สารละลายเอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยการตกตะกอนเอนไซม์ที่ละลายในของเหลว แล้วนำตะกอนมาละลายกลับในสารละลายบัฟเฟอร์ในปริมาตรที่จำกัด สารละลายเอนไซม์จึงมีความเข้มข้นขึ้น

1) การตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือ (salting out)

การตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือเป็นที่นิยมใช้กันมาก สามารถใช้โดยที่ไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพอย่างถาวร เมื่อความเข้มข้นของเกลือมากขึ้นการละลายของเอนไซม์จะลดลง ทำให้เกิดการตกตะกอนเนื่องจากเกลือเรียกว่า salting out effect ซึ่งเกิดจากอิออนของเกลือไปแย่งจับโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโปรตีนมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือ เมื่อใดที่แรงระหว่างโมเลกุลของน้ำกับโปรตีนมีค่าน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จับตัวตกตะกอนลงมา (ชรินทร์, 2542) สารละลายเกลือที่นิยมใช้กันมากคือ แอมโมเนียมซัลเฟต เพราะมีข้อดีหลายประการ คือ มีความบริสุทธิ์สูงกว่าเกลือชนิดอื่น ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ไม่ทำลายเอนไซม์ ราคาถูก และมีความเย็นเกิดขึ้นระหว่างการละลาย (self- cooling) แต่มีข้อเสียคือ กัดกร่อนโลหะและคอนกรีต

2) การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents)

การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เป็นการตกตะกอนด้วยสารละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เมทานอล โพรพานอล อะซีโตน และไดเอทิลอีเทอร์ โดยการเติมสารละลายอินทรีย์ลงในสารละลายเอนไซม์มีผลทำให้การละลายของโปรตีนลดลง เนื่องจากสารละลาย

อินทรีย์ลดค่า dielectric constant ของน้ำ ทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนมากกว่าโปรตีนกับน้ำ และการรวมตัวของโปรตีนที่มีไอออนต่างกันจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งถึงจุดหนึ่งที่โปรตีนตกตะกอน โดยวิธีนี้ต้องควบคุมอุณหภูมิให้เย็นมากเพราะอุณหภูมิสูงกว่า 4 องศาเซลเซียสจะมีผลต่อการเสียสภาพของเอนไซม์ในสภาวะที่มีสารละลายอินทรีย์ร่วมด้วย

3) การตกตะกอนด้วยสารพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

การเติมพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น พอลิเอทิลีนไกคอล (polyethyleneglycol) ลงไปในสารละลายเอนไซม์ จะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน โดยสารพอลิเมอร์จะชักนำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนด้วยกัน แต่ขัดขวางการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำกับโปรตีน

4) การตกตะกอนโดยการเปลี่ยนแปลงพีเอช

ความสามารถในการละลายโปรตีนจะลดลงเมื่อความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายมีค่าเท่ากับ ค่าที่มีไอออนไฟฟ้าเท่ากันหรือที่จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point: pI) ซึ่งเป็นจุดที่ประจุไอออนสุทธิของโปรตีนมีค่าเท่ากับศูนย์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีหมู่กรดและหมู่เบสแตกต่างกัน ดังนั้นการปรับความเป็นกรด- ด่าง ของสารละลายให้เหมาะสมจะสามารถแยกโปรตีนออกได้ อย่างไรก็ตาม โปรตีนที่ต้องการจะต้องไม่เสียสภาพ วิธีนี้จึงเหมาะในการตกตะกอนโปรตีนแยกออกโปรตีนชนิดอื่นที่เราไม่ต้องการ

5) การตกตะกอนโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

โปรตีนแต่ละชนิดจะเสียสภาพและตกตะกอนที่อุณหภูมิต่างกัน อุณหภูมิสูงจะมีผลทำให้เอนไซม์เสียลักษณะโครงรูปทางธรรมชาติ เนื่องจากทำลายพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์ จึงนิยมตกตะกอนโปรตีนอื่นที่ไม่ต้องการ

1.2 การกรอง

เป็นวิธีที่นิยมในการแยกอนุภาคแขวนลอยออกจากของเหลวหรือแก๊ส โดยใช้วัสดุกรองที่มีลักษณะเป็นรูพรุน ทำหน้าที่กั้นอนุภาคของแข็งไว้ แต่ของแข็งและของเหลวสามารถไหลผ่านได้ ซึ่งตามปกติแล้วเมื่อทำการกรองแบคทีเรีย หรือสารที่มีขนาดเล็ก หรือสารแขวนลอยที่มีลักษณะเหนียวนิยมเติมสารช่วยกรอง (filter aid) เช่น kieselguhr เคลือบแผ่นกรองก่อนใช้งานเพื่อป้องกันการอุดตัน แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักบางชนิดไม่ควรใช้สารช่วยกรอง เช่น การผลิตมวลเซลล์จุลินทรีย์ เพราะจะทำให้ปนเปื้อนเข้าไปในผลผลิตที่เป็นตัวเซลล์ โดยทั่วไปนิยมใช้ความร้อนทำให้เซลล์จับตัวกันเป็นกลุ่ม ซึ่งจะทำให้กรองได้ง่ายขึ้น

1.3 การปั่นเหวี่ยง หรือ การเซนตริฟิวจ์

การแยกเซลล์จุลินทรีย์หรืออนุภาคขนาดเล็กอื่นๆ ออกจากของเหลวสามารถทำได้โดยใช้เครื่องเซนตริฟิวส์ ซึ่งแม้ว่าจะเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่าเครื่องกรอง แต่มีความจำเป็นบางกรณี คือ ถ้าการกรองทำได้ยากหรือช้า หรือต้องแยกเซลล์หรือสารแขวนลอยที่ปราศจากสารช่วยกรอง เป็นต้น การใช้การปั่นเหวี่ยงโมเลกุลของเอนไซม์จะถูกเหวี่ยงแยกตกไปที่ก้นหลอดโดยอัตราการตกตะกอนของเอนไซม์แต่ละชนิดจะขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างไม่ว่าจะเป็นขนาด รูปร่าง และความหนืดของสารละลาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่เซนตริฟิวส์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักจะเป็นแบบต่อเนื่อง เนื่องจากไม่มีข้อจำกัดในความจุ ซึ่งเหมาะสำหรับการทำในปริมาณมาก

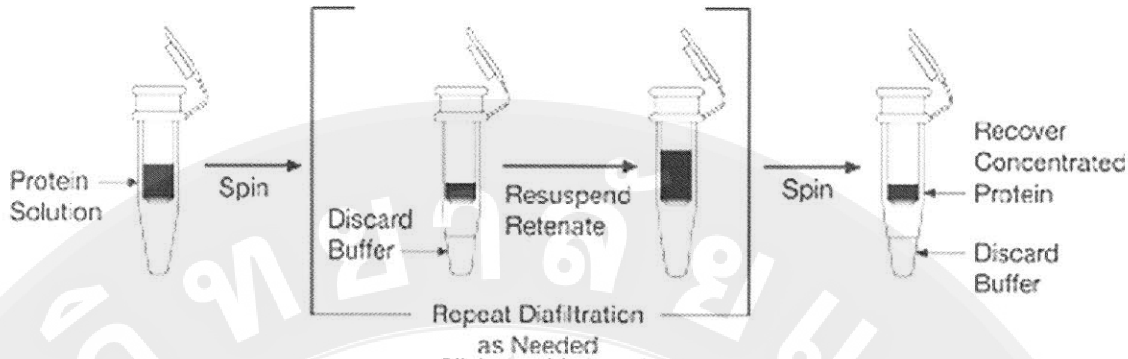
2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (enzyme purification)

2.1 ไดอะไลซิส (dialysis)

เป็นขั้นตอนการแยกไอออนของเกลือ และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำออกจากสารละลายเอนไซม์โดยนำสารละลายบรรจุลงในถุงที่ทำจาก cellophane หรือ collagen ที่มีสมบัติยอมให้สารที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่าขนาดรูพรุนผ่านได้อย่างอิสระ แต่จะกักสารโมเลกุลใหญ่ไว้ภายในถุง การแยกไอออนของเกลือออกจากสารละลายเอนไซม์จะต้องแช่ถุงที่บรรจุสารละลายเอนไซม์ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมประมาณ 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการกวนตลอดเวลา และมีการเปลี่ยนบัฟเฟอร์บ่อยๆ เพื่อให้ไอออนของเกลือแพร่ผ่านออกมาเร็วขึ้น

2.2 ไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration)

เป็นเทคนิคการกำจัดเกลือโดยอาศัยเยื่อกรอง หรือ อัลตราฟิลเตรชันเมมเบรน (ultrafiltration membrane) วิธีนี้ต่างจากการทำไดอะไลซิส คือ ใช้เวลาน้อยกว่าและมีประสิทธิภาพสูงในกรณีที่สารละลาย 2 ชนิดมีความเข้มข้นแตกต่างกันมาก ขั้นตอนแรกจะเติมบัฟเฟอร์ลงไปในสารละลายตัวอย่างตามด้วยการกรองอัลตราฟิวเตชัน จากนั้นเจือจางด้วยบัฟเฟอร์และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อกำจัดเกลือหรือเปลี่ยนบัฟเฟอร์



ภาพ 4 การทำไดอะฟิลเตรชัน (diafiltration)

ที่มา: http://www.pall.com/maun/laboratory/literature-library-details.page?id=35497. (20 กันยายน , 2557)

2.3 เจลฟิลเตรชัน (gel filtration)

สารจำพวกเจล หรือสารรูพรุนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก (เช่น sephadex G- 25) สามารถนำมาใช้ในการแยกสารได้ โดยนำเจลบรรจุลงในคอลัมน์ จากนั้นผ่านสารตัวอย่างลงไป โปรตีนโมเลกุลใหญ่จะไหลออกมาพร้อมๆ กับสารละลายตัวชะ ขณะที่ไอออนของเกลือยังคงอยู่ในคอลัมน์และจะถูกชะออกมาภายหลัง วิธีนี้เหมาะสำหรับสารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยและมีผลทำให้สารละลายเจือจางลง

2.4 โครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange chromatography)

เป็นวิธีแยกโปรตีนที่มีประจุต่างกันออกจากกันโดยการผ่าน โดยทำการบรรจุสารละลายโปรตีนที่มีความแรงไอออนต่ำ และที่ค่า pH ที่ทำให้โปรตีนแตกตัว ลงบนคอลัมน์ ที่บรรจุเรซินที่เหมาะสมซึ่งอาจมีประจุเป็นลบ (cation exchanger) (มีสมบัติเป็นตัวแลกเปลี่ยนสารที่มีประจุบวก) หรือเรซินที่มีประจุเป็นบวก (anion exchanger) (มีสมบัติมีสมบัติเป็นตัวแลกเปลี่ยนสารที่มีประจุลบ) โมเลกุลของโปรตีนที่มีประจุตรงกันข้ามกับประจุของเรซินบนคอลัมน์จะถูกดูดซับติดอยู่บนคอลัมน์ด้วยแรงยึดเหนี่ยวทางไฟฟ้า จากนั้นจะชะแยกออกมาโดยการเปลี่ยนค่า pH หรือใช้การเพิ่มค่าความแรงไอออนของสารละลายโดยการเพิ่มความเข้มข้นของประจุบวกหรือประจุลบที่จะไปแย่งจับกันของเอนไซม์กับเรซิน

2.5 อิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis)

เป็นวิธีแยกโปรตีนที่มีประจุสุทธิต่างกันในสนามไฟฟ้าตามความสามารถในการเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าของโมเลกุลที่มีประจุภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ต่างกัน โดยอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ขึ้นกับประจุ ขนาด และรูปร่างโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งทำได้ทั้งในสภาวะปกติและเสียสภาพธรรมชาติ เช่น SDS- PAGE ซึ่งเทคนิคนี้นิยมใช้การหาโมเลกุลของโปรตีน ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟี

2.6 โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography)

เป็นการแยกโปรตีนโดยให้โปรตีนที่มีความจำเพาะกับลิแกนด์ที่ยึดกับเรซินที่มีสภาพเฉื่อย (inert matrix) เช่น agarose บนคอลัมน์ด้วยพันธะโควาเลนท์ ลิแกนด์ที่ใช้นี้อาจจะเป็นสับสเตรท หรือตัวยับยั้งแบบแข่งขัน เมื่อสารละลายโปรตีนผ่านคอลัมน์ที่มีความจำเพาะ จึงทำให้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะยึดติดอยู่บนคอลัมน์ขณะที่โปรตีนและเอนไซม์ชนิดอื่นจะไหลออกมาจากคอลัมน์ เอนไซม์ที่จับกับคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาได้โดยการใส่สับสเตรทลงไปแย่งการจับของเอนไซม์กับคอลัมน์ หรือโดยการเปลี่ยนค่า pH หรือความแรงไอออนของสารละลายที่ใช้เป็นตัวชะเพื่อทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างเอนไซม์กับคอลัมน์ลดลง นอกจากนั้นการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยังสามารถแยกโดยวิธีอื่นๆ แสดงดังตาราง 4

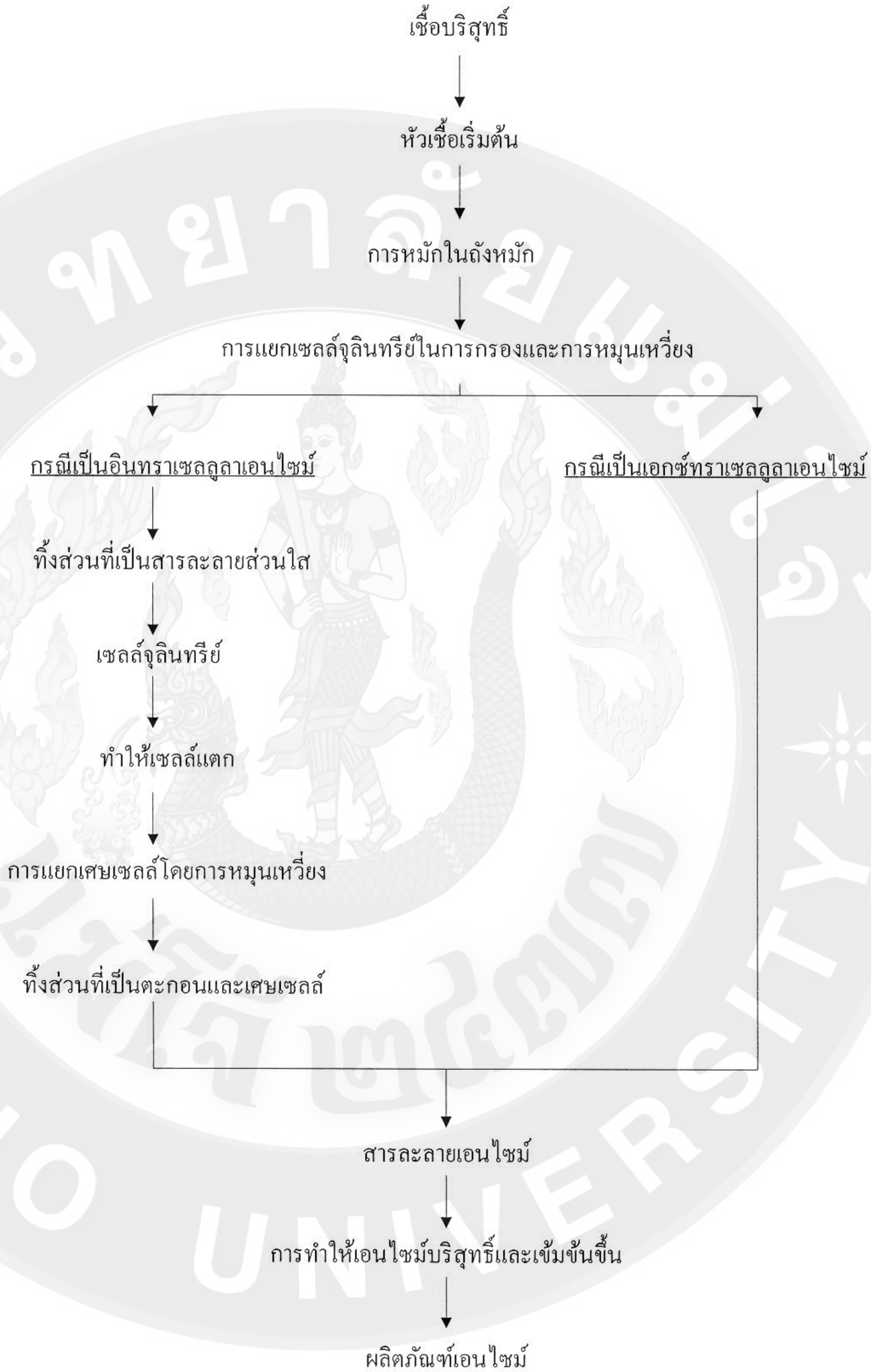
ตาราง 4 การแยกเอนไซม์ออกจากโปรตีนอื่น

สมบัติ	**วิธี**	**ปริมาณที่ใช้**
ขนาดหรือมวล	- การปั่นเหวี่ยง (Centrifugation)	- ปริมาณมากหรือ น้อย
	- การกรองผ่านเม็ดเจล (Gel filtration)	- โดยทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
	- ไดอะไลซิส (Dialysis)	- โดยทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
	- การกรองขั้นสูง (Ultrafiltration)	- โดยทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
ความสามารถในการละลาย (solubility)	- การเปลี่ยนแปลงค่า pH	- โดยทั่วไปใช้ปริมาณมาก
	- การเปลี่ยนแปลงค่าความแรงไอออน (Ionic strength)	- ปริมาณมากหรือน้อย
	- การลดค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant)	- โดยทั่วไปใช้ปริมาณมาก
ความมีขั้ว		
	- โครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยไอออน (Ion- exchange chromatography)	- ปริมาณมากหรือน้อย
	- โครมาโทโฟกัสซิ่ง (Chromatofocusing)	- ทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
	- การทำอิเล็กโทรโฟลิซิส (electrophoresis)	- ทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
	- การทำไอโซเล็กทริกโฟกัสซิ่ง (Isoelectric focusing)	- ทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
ความไม่มีขั้ว (Hydrophobic)	- โครมาโทกราฟฟีแบบไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic chromatography)	- ทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
ความจำเพาะของบริเวณจับหรือลักษณะโครงสร้าง	- โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatrography)	- ทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
	- โครมาโทกราฟฟีแบบไอออนโลหะตรึง (Immobilized metal ion chromatrography)	- ปริมาณมากหรือน้อย
	- การชะแบบจำเพาะ (Affinity elution)	- ปริมาณมากหรือน้อย

ตาราง 4 (ต่อ)

ความจำเพาะของบริเวณจับหรือลักษณะโครงสร้าง	- โครมาโทกราฟีแบบไดย์-ลิแกนด์ (Dye-ligand chromatography)	- ปริมาณมากหรือน้อย
	- การดูดซับแบบอิมมูน (Immunoabsorption)	- ทั่วไปใช้ปริมาณน้อย
	- โครมาโทกราฟีโคเวเลนท์ (Covalent chromatography)	- ทั่วไปใช้ปริมาณน้อย

ที่มา: Price and Stevens (1999)



ภาพ 5 แผนภาพสรุปกระบวนการผลิตเอนไซม์เพื่อการใช้งาน
ที่มา: ปราณี (2556)

การใช้แผนการทดลองทางสถิติในงานวิจัย

ในงานวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ใดๆ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและภาคอุตสาหกรรมนั้น มักมีปัจจัยที่หลากหลาย ที่อาจกระทบต่อผลผลิตเป้าหมาย ซึ่งหากมีปัจจัยจำนวนมากเข้ามาเกี่ยวข้อง ก็อาจเกิดความยุ่งยากในการวางแผนการทดลองได้ อีกทั้งกระทบต่อต้นทุนค่าใช้จ่ายและเวลาอีกด้วย การวางแผนการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ (Statistical experimental design) ได้เข้ามามีบทบาทช่วยในการตัดสินใจ และพบว่าสามารถช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายของการทดลองลงได้ เนื่องจากสามารถลดจำนวนหน่วยทดลองลง โดยทั่วไปขั้นตอนของการวางแผนการทดลองด้วยวิธีการทางสถิติ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัย การหาระดับที่เหมาะสม และการยืนยันผลการทดลอง

1. การคัดเลือกและกลั่นกรองปัจจัย (Factor Identification and Screening) มี 2 วิธีหลัก คือ

1.1 Factorial Design

แฟคทอเรียล (factorial design) เป็นการจัดการทดลองที่ผู้ทดลองสามารถศึกษาปัจจัยต่างๆ (factors) ได้ในเวลาเดียวกัน รวมทั้งสามารถศึกษาอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างแต่ละปัจจัย แต่อย่างไรก็ตามการจัดการทดลองแบบนี้อาจไม่สามารถศึกษาแต่ละปัจจัยได้อย่างละเอียด ถ้ามีปัจจัย และระดับต่างๆ มากเกินไปเพราะเกิดความแปรปรวนในวัตถุหรือวัสดุในการทดลองมาก โดยทั่วไปการจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล มักจะพยายามที่จะทำให้มี combination น้อยที่สุด คือ ให้มีแค่ 2 ระดับ ในแต่ละปัจจัย ดังนั้น จึงมักเขียนในรูป $t = 2^k$ โดยที่ k หมายถึงจำนวนปัจจัยที่ศึกษา (คณาจารย์ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร, 2552)

1.2 Plackett and Burman Design

Plackett and Burman (1946) ได้อธิบายหลักการของการจัดการทดลอง Plackett and Burman Design คือ การจัดการทดลองที่ถือได้ว่าเป็นส่วนหนึ่งของการจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล หรือ เป็นส่วนหนึ่งของแฟคทอเรียล ซึ่งใช้เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการพัฒนาสูตรหรือพัฒนาวิธีการผลิต ที่มีหลายปัจจัย ให้เหลือเฉพาะปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต ทำให้สามารถลดจำนวนหน่วยทดลองได้ โดยไม่ต้องทำการทดลองขนาดใหญ่ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถศึกษาอันตรกิริยาของปัจจัยต่างๆได้ การจัดการทดลองโดยใช้ Plackett and Burman design นี้ การจัดการทดลองจะใช้ 2^k factorial arrangement เป็นพื้นฐานโดยจะมีแบบแผนมาตรฐาน ดังตาราง 5

ตาราง 5 แผนการทดลองมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง

N	ปัจจัยที่ต้องกลั่นกรอง k = N-1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
8	+	+	+	-	+	-	-													
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-									
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-					
24	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-

ที่มา: Plackett and Burman (1946)

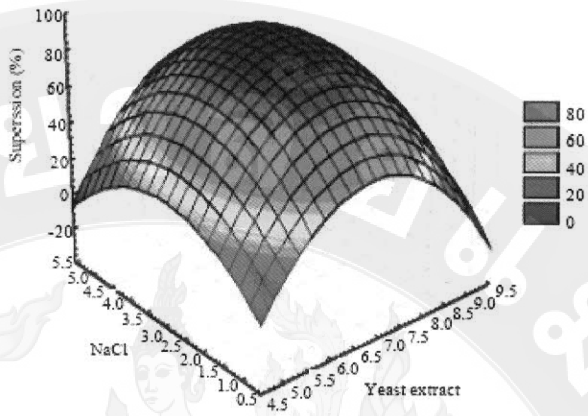
2. การหาระดับที่เหมาะสมโดยการออกแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSMs (อิศรพงษ์, 2545)

RSM เป็นการรวบรวมเอาเทคนิคทั้งทางคณิตศาสตร์และทางสถิติที่มีประโยชน์ต่อการสร้างแบบจำลองและการวิเคราะห์ปัญหาโดยที่ผลตอบที่สนใจขึ้นอยู่กับหลายตัวแปร และมีวัตถุประสงค์ที่จะหาค่าที่ดีที่สุด สามารถเขียนสมการของพื้นผิวโดยส่วนใหญ่จะแสดงพื้นผิวผลตอบสนองในรูปกราฟิก โดยที่ค่าตอบสนองจะถูกพล็อตกับระดับของ x_1 และ x_2 เพื่อที่จะช่วยให้มองรูปร่างของพื้นผิวตอบสนองได้ดีขึ้น ซึ่งอาจจะพล็อตเส้นโครงร่าง (contour plot) ของพื้นผิวตอบสนอง โดยที่ปัญหาส่วนใหญ่จะไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองกับตัวแปรอิสระ โดยในขั้นแรกต้องหาตัวประมาณที่เหมาะสมในการใช้เป็นตัวแทนสำหรับแสดงความสัมพันธ์ที่แท้จริงระหว่าง y และ เซตของตัวแปรอิสระ ซึ่งอาจจะเป็นแบบจำลองของผลของผลตอบสนองที่มีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นตัวแปรอิสระกับฟังก์ชันที่ใช้เป็นแบบจำลองกำลังหนึ่งดังสมการ 1

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \ldots + \beta_k x_k + e \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(1)$$

แต่ถ้ามีส่วนโค้งเกี่ยวข้องในระบบ จะใช้ฟังก์ชันพหุนามที่มีกำลังสูงขึ้น เช่น พหุนามกำลังสอง ดังสมการที่ 2

$$y = \beta_0 + \Sigma^{k}_{i=1}\ \beta_1 x_1 + \Sigma^{k}_{i=1}\ \beta_2 x_2 + \Sigma\ \Sigma i<j + e \ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(2)$$

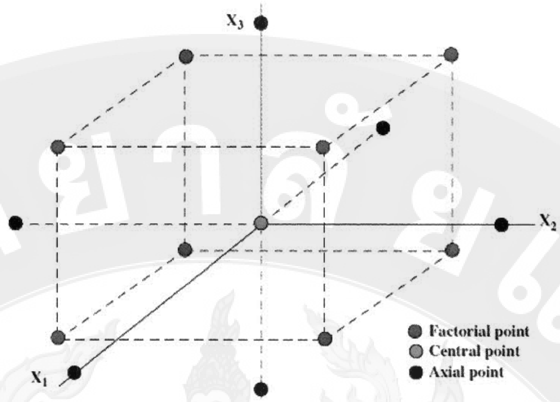


ภาพ 6 พื้นผิวตอบแบบสามมิติ
ที่มา: Nermeen et al. (2010)

ปัญหาเกี่ยวกับพื้นผิวตอบสนองส่วนมากจะใช้แบบจำลองกำลังหนึ่งหรือแบบจำลองกำลังสองในการหาผลตอบ แต่แบบจำลองทั้งสองชนิดไม่สามารถใช้ประมาณความสัมพันธ์ตลอดพื้นผิวทั้งหมดของตัวแปรอิสระ ถ้าพื้นผิวที่เราสนใจอยู่มีขนาดใหญ่ การออกแบบพื้นผิวผลตอบมีวิธีการที่นำมาใช้ในการหาค่าที่ดีที่สุดของผลตอบอยู่หลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ วิธีการกำลังสองน้อยสุดการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่หนึ่ง และการออกแบบสำหรับฟิต แบบจำลองอับดับที่สอง ซึ่งการออกแบบสำหรับฟิตแบบจำลองอับดับที่สองนี้เป็นการเน้นไปที่การสร้างแบบจำลองควอดราติกของผลตอบ มีวิธีการที่น่าสนใจอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ

1. การออกแบบส่วนประสมกลาง (Central Composite Design; CCD)

เป็นหนึ่งในวิธีการหาพื้นผิวผลตอบที่นิยมใช้เพื่อหากระบวนการที่เหมาะสม โดยทั่วไปส่วนประสมกลางจะประกอบด้วย 2^k แฟกทอเรียล โดย k คือ จำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษา ซึ่งการรันจะรันที่จุดศูนย์กลาง ดังภาพ 7 แสดงส่วนประสมกลางสำหรับ k= 3 ปัจจัย

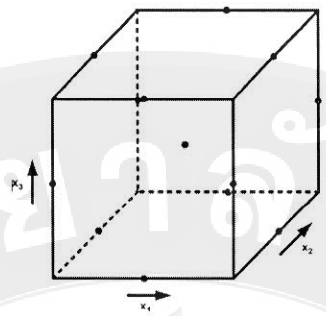


ภาพ 7 การออกแบบส่วนประสมกลาง (CCD) สำหรับ k=3
ที่มา: Cho and Zoh (2007)

ซึ่ง แผนการทดลองแบบ CCD นี้จะคล้ายกับแผนการทดลองแบบ Factorial Design โดย CCD จะประกอบด้วย ตำแหน่งการทดลอง ของ 2^n Factorial Design (ถ้า n ในที่นี้คือตัวแปรอิสระ 2 ตัว ดังนั้น 2^2 จะมีตำแหน่งการทดลองทั้งหมด 4 ตำแหน่ง (-1,-1) (+1,-1) (+1, +1) (-1, +1) ตำแหน่งการทดลอง ที่เพิ่มขึ้นมาอีก 4 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่เป็น แนว + α หรือ - α ในแนวแกน (+ α, 0) (- α, 0) (0, + α) (0, - α) ตำแหน่งตรงกลางของพื้นที่การทดลองอีก 1 ตำแหน่ง คือ Central Point (ตำแหน่ง 0,0) เพราะฉะนั้นการทดลองแบบ CCD ในกรณีที่มีตัวแปรอิสระ 2 ตัว จะมีตำแหน่งเพิ่มขึ้นจาก Fractorial Design อีก 5 ตำแหน่งคือ (+ α, 0) (- α, 0) (0, + α) (0, - α) และ (0,0) ทำให้การทดลองแบบนี้จึงสามารถครอบคลุมพื้นที่ที่ต้องการ (กัลยาณี, 2554)

2. การออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken Design)

เป็นการออกแบบสามระดับ (-1, 0 , 1) สำหรับฟิตพื้นผิวตอบสนอง การออกแบบนี้ถูกสร้างขึ้นจากการรวมการออกแบบแฟกทอเรียล กับการออกแบบบล็อกไม่สมบูรณ์ ผลของการออกแบบมีประสิทธิภาพในด้านจำนวนของการรันที่ต้องการ และการออกแบบนี้ยังมีความสามารถในการหมุนหรือเกือบหมุนได้อีกด้วย



ภาพ 8 แสดงการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

ที่มา: http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/612-experimento-de-box

- behnken (25 ตุลาคม, 2557)

เนื่องจากการออกแบบบ็อกซ์-เบห์นเคนเป็นการออกแบบรูปทรงกลมที่ทุกจุดวางอยู่บนรูปทรงกลมรัศมี 2 และไม่ได้รวมเอาจุดใดๆ ที่เป็นจุดยอดของรูปลูกบาศก์ที่สร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละตัวแปรเอาไว้ ดังภาพ 8 ซึ่งการกระทำเช่นนี้มีประโยชน์มากเมื่อจุดที่อยู่บนมุมของลูกบาศก์เป็นการรวมเอาปัจจัยระดับ (Factor-Level Combination) ที่แพงมากหรือเป็นไปไม่ได้ที่จะทำการทดลองอันเนื่องมาจากข้อจำกัดทางด้านกายภาพของกระบวนการ

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติสำหรับผลิตเอนไซม์โปรติเอส

Sathishkumar et al. (2015) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อ *Bacillus subtilis* GA CAS8 ที่คัดแยกจากน้ำทะเล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลือใช้ทางการเกษตร โดยมีการใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อคัดเลือกองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยศึกษาส่วนประกอบอาหารทั้งหมด 10 ชนิด หลังจากนั้นมีการหาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่คัดเลือกโดยการออกแบบพื้นผิวตอบสนองแบบ Central Composite Design (CCD) ซึ่งพบว่ามีส่วนประกอบอาหาร 4 ชนิด คือ กากเหลือจากการสกัดน้ำมัน เคซีน กะหล่ำปลี และแมกนีเซียมซัลเฟตที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และพบว่าปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแต่ละองค์ประกอบคือ คือ 6 5.72 5.73 และ 2.91 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าจากการทำนายพบว่าจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 295. 930 Unit/ml แต่เมื่อทำการทดลองเพื่อยืนยันผลพบว่าผลิตเอนไซม์ได้ถึง 332.412 Unit/ml

จากรายงานของ Reddy et al. (2008) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้การหมักแบบ batch culture มีการใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman design ในการคัดเลือกปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปริมาณหัวเชื้อ และเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ รวมทั้งหมด 8 ปัจจัย ซึ่งพบว่ามี 3 ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ คือ แป้งข้าวโพด น้ำหมักข้าวโพด และปริมาณหัวเชื้อ จากนั้นนำปัจจัยทั้ง 3 ไปหาระดับที่เหมาะสมโดยการออกแบบพื้นผิวตอบสนองแบบ CCD โดยพบว่าน้ำหมักข้าว กับ ปริมาณหัวเชื้อมีความสัมพันธ์กันอย่างยิ่ง โดยมีค่า P- value < 0.05 และจากการทดลองพบว่าปริมาณที่เหมาะสมของ แป้งข้าวโพด น้ำหมักข้าวโพด และปริมาณหัวเชื้อ ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำนาย คือ 10, 30 และ 2.99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 817 Unit/ml และเมื่อทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองพบว่าผลิตเอนไซม์ได้ถึง 873 Unit/ml ในขณะที่การผลิตเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนหาสภาวะที่เหมาะสมผลิตได้เพียง 416 Unit/ml

Liu et al. (2010) ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. ที่มีความคงตัวในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีทั้งหมด 10 ปัจจัย โดยมีการใช้แผนการทดลอง Plackett and Burman design ในการหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต ซึ่งพบว่ามีทั้งหมด 3 ปัจจัย ที่ส่งผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากนั้นใช้วิธี steepest ascent เพื่อหาค่ากลางของแต่ละปัจจัยสำหรับทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการกำหนดค่าในการออกแบบพื้นผิวตอบสนองแบบ Box-Behnken design โดยแผนการทดลองมี

ทั้งหมด 17 ทรีตเมนต์ จากทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ กลีเซอรอล ความเป็นกรด- ด่าง และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ผลการทดลองพบว่าปริมาณกลีเซอรอล ความเป็นกรด- ด่าง และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ที่เหมาะสิม 12.47 กรัม/ลิตร, 8.25 และ 0.73 กรัม/ลิตร ตามลำดับ สามารถทำนายการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 1,079.55 Unit/ml และเมื่อทำการยืนยันผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ถึง 1,182.68 Unit/ml จากเดิมผลิตได้เพียง 465.06 Unit/ml

ในปี 2006 Thys et al. ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Microbacterium* sp. โดยวิธีการออกแบบพื้นผิวตอบสนองนอกจากนั้นทำการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้วิธีการทดสอบทีละปัจจัย (one-variable-at-a-time) ซึ่งพบว่าการใช้ขนไก่ป่นให้ผลในต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ 96.5 Unit/ml รองลงมาคือ กากถั่วเหลือง 73.8 Unit/ml จากนั้นทำการหาระดับความเข้มข้นของ ขนไก่ป่น อุณหภูมิ และ pH เริ่มต้น โดยการใช้แผนการทดลอง CCD ซึ่งพบว่าอุณหภูมิและความเป็นกรด- ด่าง มีผลอย่างยิ่งต่อการผลิตเอนไซม์ โดยพบว่าอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส pH 7 ระยะเวลาการหมัก 3 วัน มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 270 Unit/ml นอกจากนี้ยังพบว่าแม้ค่า pH และอุณหภูมิที่ระดับต่ำจะให้ผลดีต่อการผลิตเอนไซม์ แต่เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีข้อจำกัดในการเจริญที่สภาวะดังกล่าว ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสได้

Oskouie et al. (2008) ศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบอาหารที่ใช้ในการผลิต alkaline protease จาก *Bacillus clausii* โดยทำการศึกษา ซูโครส yeast extract และ KNO_3 ที่พบว่าเป็นปัจจัยหลักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยทำการทดลองทั้งหมด 20 ทรีตเมนต์ จากการศึกษาพบว่าปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต alkaline protease คือ ซูโครส yeast extract และ KNO_3 ที่ 11, 7 และ 5.2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากสมการความสัมพันธ์ที่ได้พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 1,330.6 Unit/ml โดย yeast extract เมื่อใช้ในระดับต่ำนั้นมีผลดีต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้โปรแกรมการออกแบบการทดลองตอบสนองต่อพื้นผิว พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมมากขึ้นถึง 1,000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร basal medium ที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเพียง 250 Unit/ml

Misra et al. (2006) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต alkaline protease จาก *Pseudomonas aeruginosa* ที่เป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยศึกษาแหล่งโปรตีน และตัวชักนำในการผลิตเอนไซม์ที่ทำการเพาะเลี้ยงเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาปัจจัยเบื้องต้นของอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า albumin , $(NH_4)_2SO_4$ และกลูโคส มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ จากนั้นทำการหา

สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้การตอบสนองพื้นผิวแบบ CCD โดยมีการออกแบบการทดลองทั้งหมด 20 ทรีตเมนต์ โดยพบว่าโมเดลที่ทำการศึกษามีค่าความเชื่อมั่นถึง 95.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นพบว่าทั้ง 3 ปัจจัย ที่ทำการศึกษาส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ทั้งหมด โดยระดับที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ albumin 6.586 , $(NH_4)_2SO_4$ 0.164 และ กลูโคส 6.72 เปอร์เซ็นต์ จากสมการสามารถทำนายการผลิตเอนไซม์ได้ถึง 801,822 Unit/ml และเมื่อทำการทดลองยืนยันผลการทดลองพบว่าผลิตเอนไซม์ได้ 793,492 Unit/ml โดยพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากเดิมเมื่อไม่มีการใช้หาสภาวะโดยใช้การตอบสนองพื้นผิวถึง 260,03.2 Unit/ml

Haddar et al. (2010) ทำการพัฒนากระบวนการหมักโดยใช้อาหารสูตรต้นทุนต่ำ ข้าวสาลีที่ถูกนำเปลือกออก และ โปรตีนที่ได้จากปลาซาดีน ในการผลิต alkaline protease จาก *Bacillus mojavensis* A21 โดยขั้นแรกทำการหาแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้วิธีการทดสอบทีละปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด จากนั้นทำการหาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยใช้ Plackett and Burman ซึ่งพบว่ามีทั้งหมด 4 ปัจจัย คือ ข้าวสาลีที่นำเปลือกออก NaCl, KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 จากนั้นทำการหาระดับที่เหมาะสมโดยใช้การตอบสนองพื้นผิวแบบ Central Composite Design (CCD) โดยมีออกแบบการทดลอง 30 ทรีตเมนต์ จากการศึกษาพบว่า จากแผนการทดลองสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด 1,830.6 Unit/ml โดยใช้ ข้าวสาลีที่นำเปลือกออก 30 กรัม/ลิตร, NaCl 2 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 1 กรัม/ลิตร และ K_2HPO_4 0.3 กรัม/ลิตร จากนั้นทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสพบว่าระยะเวลาที่ 24 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่ 1,850 Unit/ml

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

วัตถุดิบ

น้ำยางพาราสด จากอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่
กากถั่วเหลืองอาหารสัตว์จากร้านแม่โจ้การเกษตร (ยี่ห้อ Top feed)

แบคทีเรีย

Bacillus subtilis (MR10)

เครื่องมือ

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance)	METTLER TOLEDO
เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	SARTORIUS
เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (Centrifugation)	HERRICK
เครื่องเขย่าสารและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)	CERTOMAT
เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	SCIENTIFIC INDUSTRIES
เครื่องวัดการดูกลืนแสง (Spectrophotometer)	THERMO SCIENTIFIC
เครื่องวัดความเป็น กรด- เบส (pH meter)	pH tests 30
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	BINDER
ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator)	MEMERT
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	MEMERT
เครื่องกวนสาร แบบให้ความร้อน (Hot plate stirrer)	CLIFTON CERASTIR
เครื่องอิเล็กโตรโฟไลซิส (SDS-PAGE electrophoresis)	AMERSHAM ECL
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	OLYMPUS
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	HIRAY

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)	MICROTECH

อุปกรณ์

บีกเกอร์ (Beaker)	PYREX
ขวดดูแรน (Duran)	DURAN
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)	PYREX
หลอดทดลอง (Test tube)	PYREX
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)	DURAN
กระบอกตวง (Cylinder)	PYREX
ฟิล์มเอ็กซเรย์ (Films)	Kodak
แท่งแก้วคนสาร (Strirring rod)	-
ไมโครปิเปต (Micropipette)	GISON
ปิเปต (Pipette)	HBG
ช้อนตักสาร (Dispensing spoons)	-
ขวดน้ำกลั่น (Wash bottle)	-
ลูกยางปิเปต (Pipette rubber bulb)	-
นาฬิกาจับเวลา (Stopwatch)	ABCAM
โถดูดความชื้น (Desiccator)	BOROMAX
PVDF membrane	MERCK
ถุงไดอะไลซิส (Dialysis bag)	Cellu Sep
แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)	-

สารเคมี

Nutrient Broth	LAB SCAN
Skim milk	HIMEDA
Agar	นางเงือก
Casein from bovine milk	FLUKA
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	AJAX FINECHEM
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	SCHARLAU
Tyrosine	MERCK
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	MERCK
Trichloroacetic acid (CCl_3COOH)	MERCK
Folin-ciocalteau reagent	MERCK
Ampicilin	FLUKA
Sodium sulfite (Na_2SO_3)	MERCK
Copper (II) Sulfate ($CuSo_4.5H_2O$)	AJAX FINECHEM
Sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	CARLO ERBA REAGENTI
Ovalbumin	SIGMA
Coomassie Brilliant Blue G 250	FLUKA
Sulfuric acid (H_2SO_4)	RCILABSCAN
Potassium sulfate (K_2SO_4)	AJAXFINECHEM
Sodium hydroxide (NaOH)	J.T. BAKER
Hydrochloric acid (HCl)	RCI LABSCAN
Sodium dodecyl sulfate ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)	PACIFIC SCIENCE
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	FISHER
Glycine	RESEARCH ORGANICS
Methanol	RCI LABSCAN
Bromophenol blue	SIGMA
Glycerol	UNIVAR
β-mercaptoethanol	APPLI CHEM
Acetic acid	RCI LABSCAN

Protein Ladder	VIVANTIS
Latex Elongation factor	THERMO
Polyacrylaminegel 12%	GE HEALTHCARE
Western HRP Substrate	LUMINATE CRESCENDO
Ecoteric T20	AJAX FINECHEM
Acetone RCI	LABSCAN
Ethanol	BDH
Magnesium sulfate ($MgSO_4 . 7H_2O$)	UNIVAR
Ammonium Chloride (NH_4Cl)	UNIVAR
Ammonium Sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)	UNIVAR
Potassium benzoate ($C_7H_5KO_2$)	UNIVAR
Manitol	LOBA
Sodium azide (NaN_3)	LOBA
Potassium metabisulfite ($K_2O_5S_2$)	LOBA
Potassium sorbate ($C_6H_7KO_2$)	LOBA
Sucrose	RCI-LABSCAN
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	BDH
น้ำยาล้างฟิล์ม	KodeK (DEVELOPER)

วิธีทดลอง

แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แยกได้มาจากถั่วเน่า (Wongputtisin et al., 2012) โดยเก็บรักษาไว้ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นสุดท้ายที่ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

นำ stock หัวเชื้อเริ่มต้น *B. subtilis* (MR 10) มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Nutrient Broth (NB) บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเติมสารละลายน้ำเกลือลงไปใหม่ สารแขวนลอยที่ได้จะใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาครั้งนี้

การศึกษาสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยง *B. subtilis* เพื่อผลิตโปรติเอส

1. การคัดเลือกองค์ประกอบหลักของอาหารเหลว

เตรียมอาหารเหลววัตถุดิบต้นทุนต่ำจาก skim milk และกากถั่วเหลือง ปริมาณ 1 เปอร์เซ็ฯต์ (W/V) และอาหารเหลวสูตร NB (สูตรมาตรฐาน) ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมหัวเชื้อลงในอาหารเหลวในปริมาณ 100 มิลลิลิตร วัดการเจริญของ *B. subtilis* MR10 ในอาหารเหลวทั้ง 3 ชนิดโดยเก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0 - 24 มาทำการนับด้วยเทคนิคเกลี่ยเชื้อ (Spread plate) บนอาหารแข็ง NB นอกจากนี้ยังทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity) ด้วยวิธีที่อ้างอิงจาก Chantanwannakul et al. (2002) ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ด้วยวิธี Lowry และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) จากสัดส่วนของค่ากิจกรรมและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ และคัดเลือกอาหารเหลววัตถุดิบต้นทุนต่ำที่เหมาะสมสำหรับศึกษาเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนต่อไป

2. การคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตโปรติเอส

เมื่อทำการคัดเลือกองค์ประกอบหลักในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้แล้ว จึงทำการคัดเลือกปัจจัยที่กระทบต่อการผลิตโปรติเอส โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackettt and Burman Design ชนิด N = 12 ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส K_2HPO_4 $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ $(NH_4)_2SO_4$ NH_4Cl ความเป็นกรด – ด่าง อุณหภูมิ และเวลาการเพาะเลี้ยง แต่ละปัจจัยจะถูกศึกษาที่ระดับสูงและต่ำดังรายละเอียดในตาราง 6 การทดลองได้ถูกแบ่งเป็นทั้งหมด 12 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมีการใช้วัตถุดิบที่คัดเลือกได้จากข้อ 1. มาเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ จากนั้นถูกกำหนดให้ได้รับปัจจัยต่างๆ ในระดับที่แตกต่างกัน และทำการทดสอบตามแผนการทดลอง Placket and Burman Design ดังตาราง 7 ภายหลังการเติมหัวเชื้อในปริมาณ 10^8cfu ลงไปแล้ว ทำการเพาะเลี้ยงตามสภาวะที่กำหนด และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสเพื่อวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และประมวลข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรมทางสถิติ Minitab software© วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตโปรติเอสสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง 6 แสดงระดับในการศึกษาของแต่ละปัจจัยตามแผนการทดลองแบบ N=12 เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตโปรติเอส โดย *B. subtilis*

ระดับ	pH	Time (h)	Temp (°C)	K_2HPO_4 (g/l)	$MgSO_4{\cdot}7H_2O$(g/l)	Glucose (g/l)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/l)	NH_4Cl (g/l)
สูง (1)	7	12	20	0.05	0.01	0.2	0.05	0.05
ต่ำ (-1)	10	48	50	0.5	0.5	2	0.5	0.5

ตาราง 7 แสดงแผนการทดลอง Plackettt and Burman Design ชนิด N = 12

RUN	pH	time	Temp	K_2HPO_4	$MgSO_4.7H_2O$	glucose	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
5	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
8	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

3. การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตโปรติเอส

ภายหลังได้รับปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากข้อ 2 เรียบร้อยแล้ว ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของ K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และความเป็นกรด- ด่าง โดยใช้แผนการทดลองแบบ Steepest ascent เพื่อหาระดับที่ค่ากลาง (0) ของปัจจัย โดยนำค่า p-value ที่มีค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จากการใช้การหาอิทธิพลที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบ Plackettt and Burman Design มาใช้ในการทำแผนการทดลอง โดยนำค่าความเชื่อมั่นที่น่าเชื่อถือ (p ไม่เข้าใกล้ 0.05 มากเกินไป) ใช้เป็นตัวหารกับค่า p ค่าอื่นที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งคือค่า Δ code และ ค่าจริงคือ Δ code × ระยะห่างของค่าจริง จากนั้นทำการใส่ค่า code และค่าจริงตามแผนการทดลองดังตาราง 8 จากนั้นทำการนำค่าที่ได้ไปทำการทดลองในอาหารสูตรต้นทุนต่ำและนำค่าจริงในแผนการทดลองที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดได้ไปใช้การวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ชนิด 3 ปัจจัย ที่มีการแบ่งการทดลองออกเป็น 20 ชุดการทดลอง ดังแสดงในตาราง 9 ร่วมกับเทคนิค Response surface methodology วัตถุดิบจากข้อที่ 1 ถูกใช้เป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจากนั้นถูกกำหนดให้ได้รับปัจจัยต่างๆ ในระดับที่แตกต่างกันตามแผนการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงตามสภาวะที่กำหนดและเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm จากนั้น เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และประมวลข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรมทางสถิติ Design – Expert software© วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) สร้างสมการแบบหุ่นกำลังสอง (Second order polynomial equation) เพื่อทำนายระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่สูงสุด เมื่อทราบระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยแล้ว ก็ทำการศึกษาเวลาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่เหมาะสม โดยทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ที่ชั่วโมง 0 - 24 เพื่อหาเวลาที่มีการผลิตเอนไซม์สูงที่สุด

ตาราง 8 ตารางแสดงแผนทำการทดลองแบบ Steepest ascent ของ K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ pH

	Code			Actual		
	pH	K_2HPO_4 (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	pH	K_2HPO_4 (g/L)	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)
ค่ากลาง	0	0	0	8.5	0.275	0.255
Δ	-0.946	0.954	1	-1.419	0.214	0.245
ค่ากลาง+ Δ	-0.946	0.954	1	7.33	0.489	0.5
ค่ากลาง+ 2Δ	-1.892	1.908	2	5.911	0.704	0.745
ค่ากลาง+ 3Δ	-2.838	2.862	3	4.492	0.919	0.99
ค่ากลาง+ 4Δ	-3.784	3.817	4	3.073	1.133	1.235
ค่ากลาง+ 5Δ	-4.730	4.771	5	1.653	1.348	1.48

ตาราง 9 แสดงแผนการทดลอง Central Composite Design ชนิด 3 ปัจจัย เพื่อหาระดับปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรติเอส โดย *B. subtilis*

RUN CCD	A (pH)	B (K_2HPO_4)	C ($MgSO_4.7H_2O$)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1.682	0	0
10	1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

หมายเหตุ ปัจจัย A (pH) ศึกษาในช่วง 4.3 – 7.7

ปัจจัย B (K_2HPO_4) ศึกษาในช่วง 0.53 - 0.87 g/l

ปัจจัย C ($MgSO_4.7H_2O$) ศึกษาในช่วง 0.58- 0.92 g/

4. การยืนยันผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

หลังจากทำการศึกษาหาสภาวะปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบ Central Composite Design (CCD) จากข้อ 3 เรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำการยืนยันผลในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสภายใต้สภาวะดังกล่าว โดยทำการเติมหัวเชื้อ *B. subtilis* และเลี้ยงในอาหารเหลวกากถั่วเหลือง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และนำมาวัดกิจกรรมเอนไซม์

การศึกษากระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสม

ทำการศึกษาหากระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวตกตะกอนโปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ อะซิโตน เมทานอล เอทานอล กับตัวตกตะกอนมาตรฐานคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ทำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเลี้ยง *B. subtilis* (MR 10) ในอาหารเหลวต้นทุนต่ำสูตรที่พัฒนาขึ้น ภายหลังการกำจัดอนุภาคต่างๆ รวมทั้งเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นค่อยๆ เติมสารตกตะกอนจนกระทั่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตะกอนโปรตีนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที และละลายตะกอนกลับด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เก็บเกี่ยวได้จากการใช้ตัวตกตะกอนแต่ละชนิดเปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟต ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดกิจกรรมเอนไซม์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ และคัดเลือกชนิดตัวตกตะกอนที่เหมาะสม

ภายหลังการคัดเลือกตัวตกตะกอนที่เหมาะสมเป็นที่เรียบร้อยแล้ว ได้ทำการหาระดับความเข้มข้นสุดท้ายของตัวตกตะกอนที่เหมาะสม ทดลองเติมตัวตกตะกอนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายมีค่าเท่ากับ 40-80 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตะกอนโปรตีนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนกลับด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เก็บเกี่ยวได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำวัดกิจกรรมเอนไซม์ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ด้วยการวัดกิจกรรมเอนไซม์และคัดเลือกความเข้มข้นตัวตกตะกอนที่เหมาะสม

การศึกษากระบวนการรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอส

ทำการคัดเลือกสารเคมีกลุ่มต่างๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้น ได้แก่

สารกลุ่ม cryoprotectants ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol), ซูโครส (sucrose), แมนนิทอล (manitol)

สารกลุ่มยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ โซเดียม เอไซด์ (sodium azide) โพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ (Sodium metabisulfite)โปแทสเซียมซอร์เบต (Potassium sorbate) และโพแทสเซียมเบนโซเอต (Potassium benzoate)

สารกลุ่ม metal chelator ได้แก่ EDTA

สารแต่ละชนิดถูกผสมลงในสารละลายเอนไซม์หยาบของโปรติเอสในปริมาณที่แตกต่างกันตามปริมาณที่แนะนำในเอกสารอ้างอิง ดังตาราง 10 นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบกับ Protein stabilizing cocktail (Pierce ™) ซึ่งเป็นสารรักษาสภาพโปรตีนในทางการค้า

จากนั้นทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน วัดกิจกรรมของโปรติเอสที่หลงเหลืออยู่และคัดเลือกสารรักษาสภาพที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดเพื่อมาหาระดับที่เหมาะสมโดยการใช้แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เนื่องจากสารรักษาสภาพที่ให้ผลดีที่สุดคือ กลีเซอรอล และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ ดังนั้นแผนการทดลองได้ถูกออกแบบขึ้นดังแสดงในตาราง 11 ทำการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วัดกิจกรรมของโปรติเอสที่หลงเหลืออยู่ จากนั้นนำข้อมูลมาประมวลผลด้วยโปรแกรม Design – Expert software© วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) สร้างสมการแบบหุ่นกำลังสอง (second order polynomial equation) เพื่อทำนายระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยและการหลงเหลือของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่สูงสุด

ตาราง 10 ปริมาณสารรักษาสภาพที่ใช้ในการรักษาสภาพเอนไซม์

สารรักษาสภาพ	ปริมาณ	เอกสารอ้างอิง
glycerol	4.6 mM	Pierce ^{TM} (2005)
Potassium sorbate	3.3 mM	Barzegar et al. (2014)
sucrose	0.087 mM	Pierce ^{TM} (2005)
Potassium benzoate	1000 µg/ml	Zengin et al. (2011)
Sodium azide	0.008 mM	Pierce ^{TM} (2005)
EDTA	5 mM	Pierce ^{TM} (2005)
Sodium metabisulfite	750 µg/ml	Frank and Patel. (2006)
Manitol	1.6 mM	Pierce ^{TM} (2005)

ตาราง 11 แสดงแผนการทดลอง Central Composite Design ชนิด 2 ปัจจัย เพื่อหาระดับปัจจัยที่เหมาะสมต่อการรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอส

Run CCD	A (glycerol)	B (Sodium metabisulfite)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	1.4142	0
6	-1.4142	0
7	0	1.4142
8	0	-1.4142
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

หมายเหตุ ปัจจัย glycerol ศึกษาในช่วง 0.07 - 1.196 (v/v)

ปัจจัย Sodium metabisulfite ศึกษาในช่วง 0.146 - 1.353 (v/v)

การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้

1. การเตรียมฟิล์มยางและการสกัดโปรตีน

เก็บตัวอย่างน้ำยางพาราสดจากสวนเกษตรกร อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการรักษาสภาพด้วยการเติมโซเดียมซัลไฟต์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.02 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเทน้ำยางพาราสดปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในจาน Petri dish ให้กระจาย แล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส กระทั่งแห้งจะได้แผ่นฟิล์มยางพารา และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ในการสกัดโปรตีนจากฟิล์มยางนั้น ทำได้ด้วยการเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 M ความเป็นกรด- ด่าง 7 ในสัดส่วน 1: 5 เขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ก็จะได้สารละลายโปรตีนจากยางพารา

2. การทดสอบการย่อยโปรตีนภูมิแพ้

เติมเอนไซม์โปรติเอสปริมาณ 300 ยูนิต ลงไปในสารละลายโปรตีนจากยางพาราปริมาณ100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์การหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor (REF, Hev b1) ด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา

3. การวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้

แช่ PVDF membrane ในเมทานอล 20 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที และหยดตัวอย่างลงบนลงบนแผ่น membrane 2 ไมโครลิตร รอจนกระทั่งแห้ง จากนั้นนำ Membrane มาล้างด้วย TBS buffer 2 ครั้ง ๆละ 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มกับ 4 เปอร์เซ็นต์ non-fat milk ที่ละลายใน TBS buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มกับ mouse anti- latex REF monoclonal antibody (clone 07-001) ที่จำเพาะกับโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ๆละ 15 นาที และล้างด้วย TBS buffer อีก 5 นาที และนำไปบ่มกับ Secondary antibody ที่เป็น conjugate กับ HRP substrate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที และนำไปทำปฏิกิริยากับ substrate เป็นเวลา 5 นาที

นำ Membrane ที่ได้หลังจากการทำ Western blot มาประกบฟิล์มในที่มืด 1 นาที สำหรับการทำ Dot blot จากนั้นนำฟิล์มที่ได้มาล้างในสารละลาย Developer ตามด้วยการล้างน้ำ และสารละลาย Fixer จากนั้นนำไปล้างน้ำ และทำการผึ่งฟิล์มให้แห้ง

การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีดัดแปลงมาจาก Chantawannakul et al. (2002)โดยใช้โปรตีน Casein จากนมวัว เป็นสับสเตรต วิธีการโดยคร่าว มีดังต่อไปนี้

เตรียมสารละลายผสม 4 หลอดได้แก่

หลอดที่ 1 (ES):สารละลายเอนไซม์ปริมาณ1 ml + สารละลาย 0.5% Casien ปริมาณ 1 ml

หลอดที่ 2 (EB):สารละลายเอนไซม์ 1 ml + 0.05M phosphate buffer pH7.0 1 ml

หลอดที่ 3 (SB):สารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ Casein 1 ml + 0.05M phosphate buffer pH7.0 1 ml

หลอดที่ 4 (BB): 0.05M phosphate buffer pH7.0 2 ml

นำสารละลายแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid 1 ml แล้วนำไปปั่นหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมา 0.25 ml รวมกับ 0.4 M Na_2CO_3 1.25 ml และ Folin-ciocalteau reagent 0.15 ml ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Tyrosine ที่เตรียมไว้แล้ว ทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากนิยาม

เอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย Tyrosine ออกมา 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่วิเคราะห์

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำสำหรับเพาะเลี้ยง *B. subtilis* เพื่อผลิตโปรติเอส

1. การคัดเลือกองค์ประกอบหลักของอาหารต้นทุนต่ำ

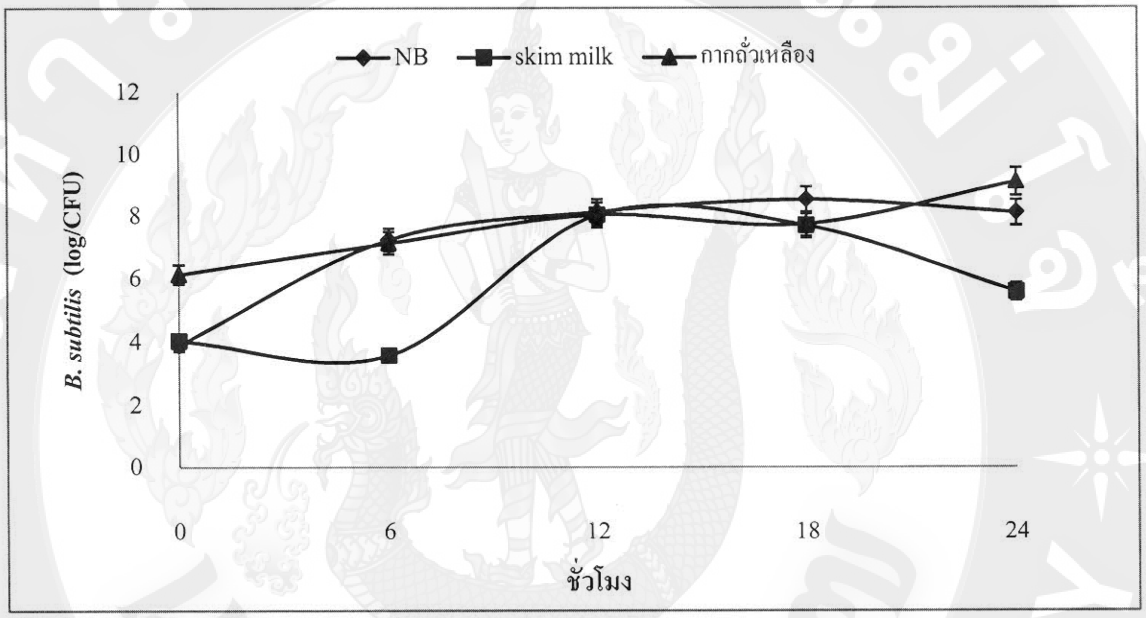
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ในอาหารเหลวกากถั่วเหลือง และอาหารเหลว skim milk แล้วทำการการวัดการเจริญของแบคทีเรีย และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้น เปรียบเทียบกับการเจริญ และผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว NB ผลการทดลองพบว่าการเจริญของเชื้อในชั่วโมงที่ 12 ในอาหาร ทั้ง 3 ชนิด มีค่าที่ใกล้เคียงกันอยู่ในระหว่าง 8.02-8.12 (Log cfu/ml) แต่ในชั่วโมงที่ 24 พบว่าการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือการเจริญในอาหารเหลว NB และ skim milk ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 9.09 8.09 และ 5.6 log CFU / ml โดยพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 18 การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* MR10ในอาหารเหลว skim milk ลดลงอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 การเจริญของเชื้อมีค่า เท่ากับ 5.6 log CFU/ml ดังแสดงในภาพ 9

ในขณะที่การผลิตเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทั้ง 3 สูตรนั้น พบว่า เอนไซม์ถูกผลิตมากขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดย ในชั่วโมงที่ 24 นั้น การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว NB ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส สูงสุด รองลงมาคืออาหารเหลวกากถั่วเหลือง และอาหารเหลว skim milk โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 52.2 31.1 และ 25 Unit/ml ตามลำดับแต่อย่างไรก็ตามพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในชั่วโมงที่ 18 ที่ผลิตจากอาหาร NB มีกิจกรรมสูงที่สุดถึง63 Unit/ml และพบว่าในชั่วโมงที่ 24 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสลดลง จากนั้นเมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ พบว่าปริมาณโปรตีนในชั่วโมงที่ 24 ในอาหารแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งอยู่ระหว่าง 3.06 - 3.42 มิลลิกรัม และเมื่อทำการหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตในอาหารเหลวสูตร NB ยังคงมีค่าสูงที่สุดรองลงมาคือ อาหารเหลวกากถั่วเหลือง และอาหารเหลว skim milk โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ที่ 16.42 9.09 และ 8.17 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพ 10

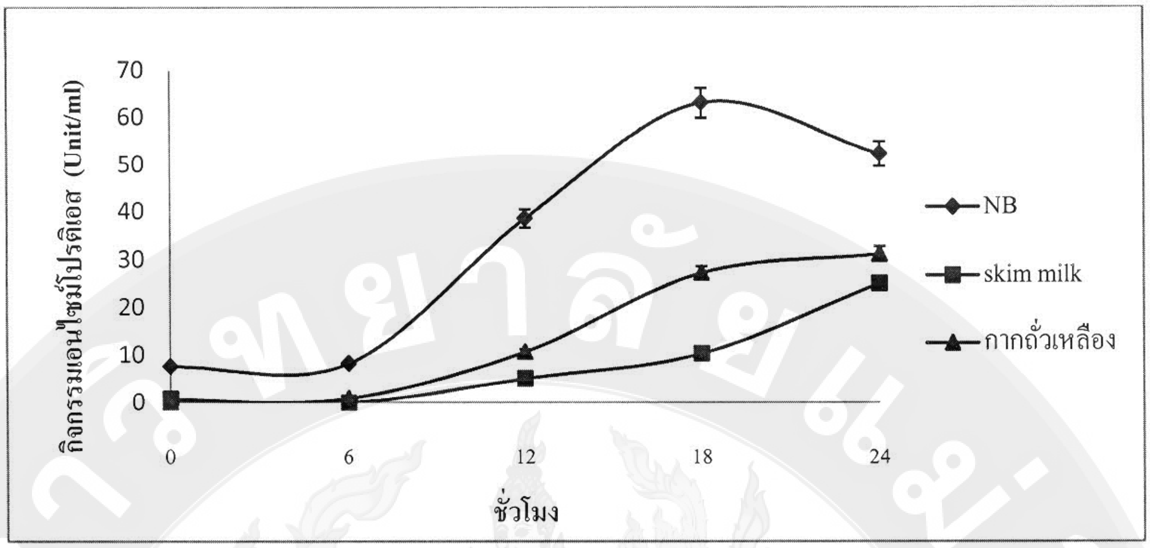
ซึ่งจากการทดลองพบว่าอาหารเหลว NB สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด อาจเนื่องมาจากอาหารเหลวสูตร NB นี้มีส่วนประกอบของ peptone yeast extract meet extract ที่เป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าสูงต่อการใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งรายงานของ Taylor et al. (1972) ได้กล่าวว่า peptone นั้นใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อราหลายชนิด และจากรายงานของ Bond (2001) ได้กล่าวถึง yeast extract ว่าเป็นแหล่งสารอาหารที่มีโปรตีน กรดอะมิโน และวิตามินจึงทำให้เป็นที่นิยมต่อการใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยจากรายงานของ Dajanta et al. (2009) ได้นำอาหารเหลว NB ที่ประกอบด้วย peptone beef extract และ NaCl มาใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกจากถั่วเน่าเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสก็พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีการเจริญได้ดีและก็พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้โดยทดสอบจากการดูวงใส (clear zone)

แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบอาหารต้นทุนต่ำระหว่างกากถั่วเหลือง กับ skim milk นั้น พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ภาพ 10) ในชั่วโมงที่ 24 เอนไซม์จากอาหารเหลวกากถั่วเหลืองมีแนวโน้มที่คงที่ต่างจากในอาหารเหลว skim milk ที่มีแนวโน้มของกิจกรรมที่สามารถเพิ่มขึ้นได้อีก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเรื่องปริมาณผลผลิตเมื่อเทียบต่อหน่วยเวลา (productivity) ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ระหว่างอาหารต้นทุนต่ำทั้งสองชนิดแล้วพบว่าการใช้อาหารสูตรกากถั่วเหลืองนั้นสามารถลดระยะเวลาการผลิตได้มากกว่า และมี productivity ที่สูงกว่าการใช้อาหารสูตร skim milk และในชั่วโมงที่ 24 อาหารเหลวกากถั่วเหลืองสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส อัตราการเจริญของเชื้อ และค่ากิจกรรมจำเพาะที่สูงกว่า อาหารสูตร skim milk ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในกากถั่วเหลืองมีปริมาณมีแหล่งอาหารที่อุดมสมบรูณ์มากกว่าอาหารเหลวสูตร skim milk โดยจากรายงานของ Wongputtisin et al. (2012) และ Chun and Lien (2014) พบว่าในกากถั่วเหลืองมีโปรตีนสูง ถึง 47-51 เปอร์เซ็นต์ dry matter (DM) และยังประกอบไปด้วยสารที่สำคัญอื่นๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต 35 เปอร์เซ็นต์ DM ไขมัน 1.2- 3.1 เปอร์เซ็นต์ DM และแร่ธาตุต่างๆ นอกจากนั้นรายงานของ Joo et al. (2002) ที่ทำการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* โดยใช้อาหารกากถั่วเหลือง 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ ทำการเปรียบเทียบกับอาหารสูตร tryptic soy broth (TSB) พบว่าเชื้อในอาหารสูตรกากถั่วเหลืองมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมากกว่าอาหารสูตร TSB ประมาณสองเท่า และจากรายงานของ Thys (2006) ในการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสก็พบว่ากากถั่วเหลืองเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ casein, yeast extract, peptone และ cheese whey นั้น กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารที่ทำให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมากกว่า นอกจากนั้นยังพบว่ากากถั่วเหลืองนี้เป็นวัตถุดิบมีราคาถูกและสามารถผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (synthetic medic) (ปราณี, 2556)

ซึ่งกากถั่วเหลืองมีราคากิโลกรัมละประมาณ 18- 20 บาท (CPF Feed Marketing Bureau, 2558) ที่ถูกกว่าอาหารสูตร NB มาตรฐานที่มีราคา 1,300 บาท ต่อ 500 กรัม ดังนั้นแม้ *B. subtilis* จะผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองได้น้อยกว่าอาหารเหลว NB แต่ด้วยต้นทุนราคาของกากถั่วเหลืองที่ต่ำกว่าอาหาร NB มาก ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบหลัก



ภาพ 9 การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ในชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB กากถั่วเหลือง และ skim milk



ภาพ 10 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB skim milk และกากถั่วเหลือง

ตาราง 12 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้และค่ากิจกรรมจำเพาะที่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB skim milk และกากถั่วเหลือง

ชั่วโมง	กิจกรรมเอนไซม์ (Unit/ml)			ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			กิจกรรมจำเพาะ (Unit)		
	NB	skim milk	กากถั่วเหลือง	NB	skim milk	กากถั่วเหลือง	NB	skim milk	กากถั่วเหลือง
0	7.56	0.72	0	1.79	2.10	1.80	4.21	0.34	0
6	8.17	0	0.89	1.65	1.64	1.39	4.95	0	0.64
12	38.44	5.00	10.67	1.50	1.47	1.78	25.58	3.40	6.00
18	63.00	10.33	27.22	1.52	1.42	1.74	41.55	7.27	15.62
24	52.22	25.00	31.11	3.18	3.06	3.42	16.41	8.17	9.09

2. การคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตโปรติเอส

จากการคัดเลือกวัตถุดิบต้นทุนต่ำเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่ากากถั่วเหลืองถูกเลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และเพื่อเป็นการพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *B. subltilis* MR10 จึงได้ศึกษาเพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวกากถั่วเหลือง โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackettt and Burman Design ปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ กลูโคส K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl ความเป็นกรด – ด่าง (pH) อุณหภูมิและเวลา

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในแต่ละชุดการทดลองแสดงดังตาราง 11 และเมื่อทำการประมวลผลข้อมูลดังกล่าวและวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรมทางสถิติ Minitab© software ผลการวิเคราะห์แสดงดังตาราง 14 พบว่า R- squared ของโมเดล (model) มีค่า 98.62 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจกล่าวได้ว่ามีความแม่นยำถึง 98.62 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นผลการวิเคราะห์ใดๆ จากการประมวลผลครั้งนี้จึงค่อนข้างน่าเชื่อถือ แต่อย่างไรก็ตามแผนการทดลองแบบ Plackettt and Burman Design นี้ใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือกปัจจัยที่ส่งผลกระทบหลัก (main effect) ของปัจจัยต่างๆ ที่ศึกษาเท่านั้น แต่ไม่สามารถศึกษาถึงผลของปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ต่างๆ ระหว่างปัจจัยที่มีในการทดลองได้ (อิศรพงษ์, 2545) โดยผลการทดลองพบว่า K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH เริ่มต้น และ เวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีค่า P- value เท่ากับ 0.001 ซึ่งถือว่ามีความเชื่อมั่นอยู่ในระดับที่สูง ส่วน $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 และ pH มีค่า P- value เท่ากับ 0.037, 0.042 และ 0.043 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของทั้ง 4 ปัจจัยแล้ว ยังพบว่า เวลามีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์สูงที่สุด โดยสังเกตจากค่า Coefficient ซึ่งมีค่าสูงถึง 40.47 อีกทั้งพบว่าส่งอิทธิพลเชิงบวก กล่าวคือ หากใช้เวลาเพิ่มขึ้น ย่อมทำให้ค่าสังเกตที่ได้เพิ่มขึ้นด้วย K_2HPO_4 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ก็เช่นเดียวกันที่ให้ผลเชิงบวกต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีเพียง pH ที่ส่งผลเชิงลบ แสดงว่าการใช้ pH ที่ระดับสูงจะมีผลเสียต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ทำให้ได้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสลดลง ซึ่งในการศึกษาผลของ pH จากการทดลองค่าต่ำสุดมีค่า เท่ากับ 7 ค่า ค่าสูงสุดเท่ากับ 10 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pant et al. (2015) ในการหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อ *B. subtilis* ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ที่ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องโดยศึกษาค่าความเป็นกรด- ด่างที่ช่วง 5-9 ก็พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7.4 เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามรายงานของ Musil et al. (1997) ในการศึกษา ความเป็นกรด-ด่าง ในการผลิตเอนไซม์ นั้นพบว่าความเป็นกรด- ด่าง ไม่ได้มี

ผลต่อการผลิตเอนไซม์เพียงอย่างเดียวเท่านั้นแต่ต้องมีปัจจัยอื่นเพิ่มด้วย และจากรายงานของ Hardar et al. (2010) ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้ทำการศึกษาปัจจัยที่ช่วยในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสก็พบว่า K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และเวลามีผลอย่างมากในการผลิตเอนไซม์โดยมีค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นรายงานของ Reddy et al. (2008) ได้รายงานว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นแบบผลิตออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) จาก *Bacillus* sp. เพื่อให้ได้ปริมาณมากนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งอาหารที่ใช้เพียงอย่างเดียวแต่ยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเป็นกรด- ด่าง เวลา ความเข้มข้นของหัวเชื้อด้วย ซึ่งแหล่งไนโตรเจนจะช่วยในกระบวนเมทาบอลิซึมทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาจากนอกเซลล์ได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตเอนไซม์ในการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ต่างกันสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันนั้นย่อมทำให้ผลในการผลิตเอนไซม์ต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นปัจจัยในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ด้วย (Fang et al., 2009) และจากรายงานของ Chu et al. (1992) และ Moon and Parulekar (1993) พบว่าแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน (ในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์) นั้นมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสโดยเมื่อเพิ่มแหล่งไนโตรเจนควบคู่กับแหล่งคาร์บอนจะทำให้เกิดผลดีกว่าการเพิ่มแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียว เช่น การเติมน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตาม $(NH_4)_2SO_4$ ถึงแม้ว่าจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้เป็นอย่างมากแต่พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อาจเนื่องมาจากกากถั่วเหลืองมีไนโตรเจนที่เพียงพอ และยังพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟต ปกติแล้วจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรด เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป เพราะจะเกิด SO_4^{-2} ขึ้นซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ (สมใจ, 2555) ดังนั้น ผลจากการทดลองครั้งนี้ จึงได้ออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของ K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ pH ต่อไป

ตาราง 13 กิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละชุดการทดลอง จากแผนการทดลองแบบ Plackettt and Burman Design

Treatment	pH	Time	Temp	K_2HPO_4	$MgSO_4.7H_2O$	Glucose	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl	กิจกรรมเอนไซม์ Unit/ml
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	143.33
2	1	-1	1	1	1	-1	-1	1	57.22
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	130.56
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	116.11
5	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	82.33
6	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	45
7	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	61.67
8	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	50.56
9	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	177.22
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	47.78
11	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	147.78
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	49.44

ตาราง 14 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab© software จากแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		92.42	3.10	29.81	0.000
pH	-20.91	-10.45	3.10	-3.37	0.043
time	80.94	40.47	3.10	13.06	0.001
Temp.	-1.50	-0.75	3.10	3.40	0.824
K_2HPO_4	21.09	10.55	3.10	3.40	0.042
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22.20	11.10	3.10	3.58	0.037
glucose	-7.02	-3.51	3.100	-1.13	0.340
$(NH_4)_2SO_4$	13.69	6.84	3.10	2.21	0.114
NH_4Cl	-7.02	-3.51	3.10	-1.31	0.340
S	PRESS	R-Sq	RSq(pred)	RSq(adj)	
10.7382	5534.8	98.62%	77.85%	94.92%	

3. การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ส่งต่อการผลิตโปรติเอส

การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยนำปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ($p< 0.05$) คือ K_2HPO_4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ pH จากการศึกษาด้วยแผนการทดลองแบบ Plackettt and Burman Design มาออกแบบการทดลองด้วยวิธี Central Composite Design (CCD) แบบ 2^n factorial จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมทางสถิติ Design – Expert© software แต่เนื่องจากการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยเทคนิค CCD นั้น แต่ละปัจจัยต้องมีการกำหนดค่ากลาง และช่วงระดับของปัจจัยให้เหมาะสม เทคนิคที่ใช้ในการกำหนดค่ากลาง และช่วงระดับของแต่ละปัจจัยในครั้งนี้คือ Steepest ascent ซึ่งผลการทดลองแสดงดังตาราง 15 ที่แสดงให้เห็นว่า ค่ากลางที่ระดับ + 2 Δ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด คือ 34 Unit/ml แสดงดังตาราง จึงใช้ระดับ +2 Δ นี้เป็นค่ากลางในการวางแผนการทดลองแบบ CCD ต่อไป

ตาราง 15 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ทำการศึกษาด้วยวิธี steepest ascent

	pH	K_2HPO_4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	กิจกรรมเอนไซม์ (Unit/ml)
ค่ากลาง	8.75	0.275	0.255	25
ค่ากลาง+ Δ	7.33	0.489	0.5	25.5
ค่ากลาง+2 Δ	6	0.704	0.745	34
ค่ากลาง+3 Δ	4.492	0.919	0.99	8.5
ค่ากลาง+4 Δ	3.07	1.133	1.235	8.5
ค่ากลาง+5 Δ	1.654	1.348	1.48	0

การใช้เทคนิค steepest ascent ในการหาค่ากลาง และช่วงระดับที่เหมาะสมของปัจจัยสำคัญที่คัดเลือกมาในครั้งนี้ ทำให้หาระดับที่เหมาะสมของปัจจัย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังสามารถบอกได้ว่า ที่แต่ละระดับของปัจจัยนั้นๆ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของค่าตอบสนองอย่างไร (Li et al., 2009; Montgomeryd and Runger, 2002) ดังนั้นจึงนำค่า pH ที่ระดับเท่ากับ 6, K_2HPO_4 เท่ากับ 0.7 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 0.75 เป็นค่ากลางในการวางแผนการทดลองแบบ CCD ต่อไป ผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในแต่ละชุดการทดลองแสดงดังตาราง 16 และผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Design – Expert© software แสดงดังตาราง 17 ซึ่งพบว่าค่า R- squared ของโมเดลมีค่า เท่ากับ 81.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าโมเดลนี้มีความเชื่อมั่นอยู่ที่ 81.12

เปอร์เซ็นต์ ($p= 0.011$; $p< 0.05$) โดยพบว่า A*A (pH*pH), B*B (K_2HPO_4*K_2HPO_4) และ C*C ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$* $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) มีค่า p- value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งมีค่า 0.036, 0.002 และ 0.013 ตามลำดับซึ่งแสดงว่าทั้ง 3 ปัจจัยล้วนมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนั้นยังพบว่าค่า Coefficient ของทั้ง 3 ปัจจัยหลักมีค่าเป็นลบ แสดงว่าเมื่อทำการใส่ K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ และ pH ที่ระดับสูงจะมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลง และสมการแบบหุ่นกำลังสองที่สามารถสร้างขึ้นจากการวิเคราะห์ครั้งนี้ เพื่อใช้ในการทำนายผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองคือ

$$\text{Protease (Unit/ml)} = 51.83 + 2.29A + 3.39B + 2.57C - 3.5A*A - 5.97B*B - 4.38C*C + 3.8AB - 2.1AC - 1.2BC$$

เมื่อ A, B และ C คือระดับของ pH, K_2HPO_4 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ของแต่ละตัวแปรนี้สามารถแสดงออกมาในรูปของกราฟตอบสนองโครงร่างพื้นผิว ดังภาพ 11 ซึ่งจากสมการที่ได้จากการวิเคราะห์นี้สามารถทำนายการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่สูงสุดได้ที่ 54 Unit/ml เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.68 ปริมาณ K_2HPO_4 เท่ากับ 0.71 กรัม/ลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 0.72 กรัม/ลิตร และเมื่อทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะดังกล่าวเพื่อยืนยันผลก็พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 52.65 Unit/ml ซึ่งคลาดเคลื่อนจากค่าที่ทำนายด้วยสมการ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานของ Oskouis et al. (2008) ที่ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต alkaline protease จากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ CCD พบว่าในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการทำนายสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 1,600 Unit/ml แต่เมื่อทำการยืนยันผลการทดลองพบว่า สามารถผลิตเอนไซม์ได้เพียง 1,520 Unit/ml ซึ่งการกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากสมการและการยืนยันผลมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกับในการทดลองครั้งนี้ การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งนี้ นับว่าประสบความสำเร็จ เนื่องจากสามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้มากขึ้น ซึ่งเดิมอาหารเหลวกากถั่วเหลืองที่ไม่เติมปัจจัยอื่น สามารถให้ผลผลิตเอนไซม์เพียง 17 Unit/ml

ภายหลังได้ทำการศึกษาหาเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งเวลาการเพาะเลี้ยงก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารต้นทุนต่ำสูตรที่พัฒนาขึ้นนี้ ในชั่วโมงที่ 21 แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุดถึง 61.67 Unit/ml ดังแสดงในภาพ 12 และการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ดังแสดงในภาพ 13 โดยชั่วโมงที่ 6 พบว่าเริ่มมีการเจริญของเชื้อและในชั่วโมงที่ 12 ถึง 21 มีแนวโน้มการเจริญที่คงที่และลดลงในชั่วโมงที่ 24 ดังนั้นโดยสรุปแล้ว จะเห็นว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นถึง 17.13 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการใช้เทคนิคการวางแผนการทดลองทางสถิติช่วยในการพัฒนาสูตรอาหารและสูตรอาหารต้นทุนต่ำที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* MR10 เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ กากถั่วเหลือง 10 กรัม/ลิตร pH เท่ากับ 7.68 K_2HPO_4 เท่ากับ 0.71 กรัม/ลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ เท่ากับ 0.72 กรัม/ลิตร เวลาในการเพาะเลี้ยง 21 ชั่วโมง

การวางแผนการทดลองแบบ CCD มีความน่าเชื่อถือและมีประสิทธิภาพในการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมัก ซึ่งได้รับความนิยมใช้เป็นเทคนิคเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักในหลายงานวิจัย ยกตัวอย่างเช่น รายงานของ Dey et al. (2001) และ Gupta et al. (2002) ได้มีการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และอะไมเลสจากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้วิธีการตอบสนองแบบพื้นผิวร่วมกับ CCD พบว่าแผนการทดลองแบบ CCD นี้เป็นวิธีที่สำคัญในการหาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่แตกต่างกัน โดยสามารถหาระดับที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้โดยทำนายจากสมการแบบหุ่นกำลังสองที่สร้างขึ้น และจากรายงานของ Oskouie et al. (2008) พบว่าการใช้การออกแบบด้วยวิธี CCD ในการหาระดับที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Bacillus clausii* เมื่อเทียบกับอาหารสูตรเดิมที่ไม่มีการหาระดับที่เหมาะสมของซูโครส yeast extract และ KNO_3 ได้เกือบสี่เท่า เป็นต้น

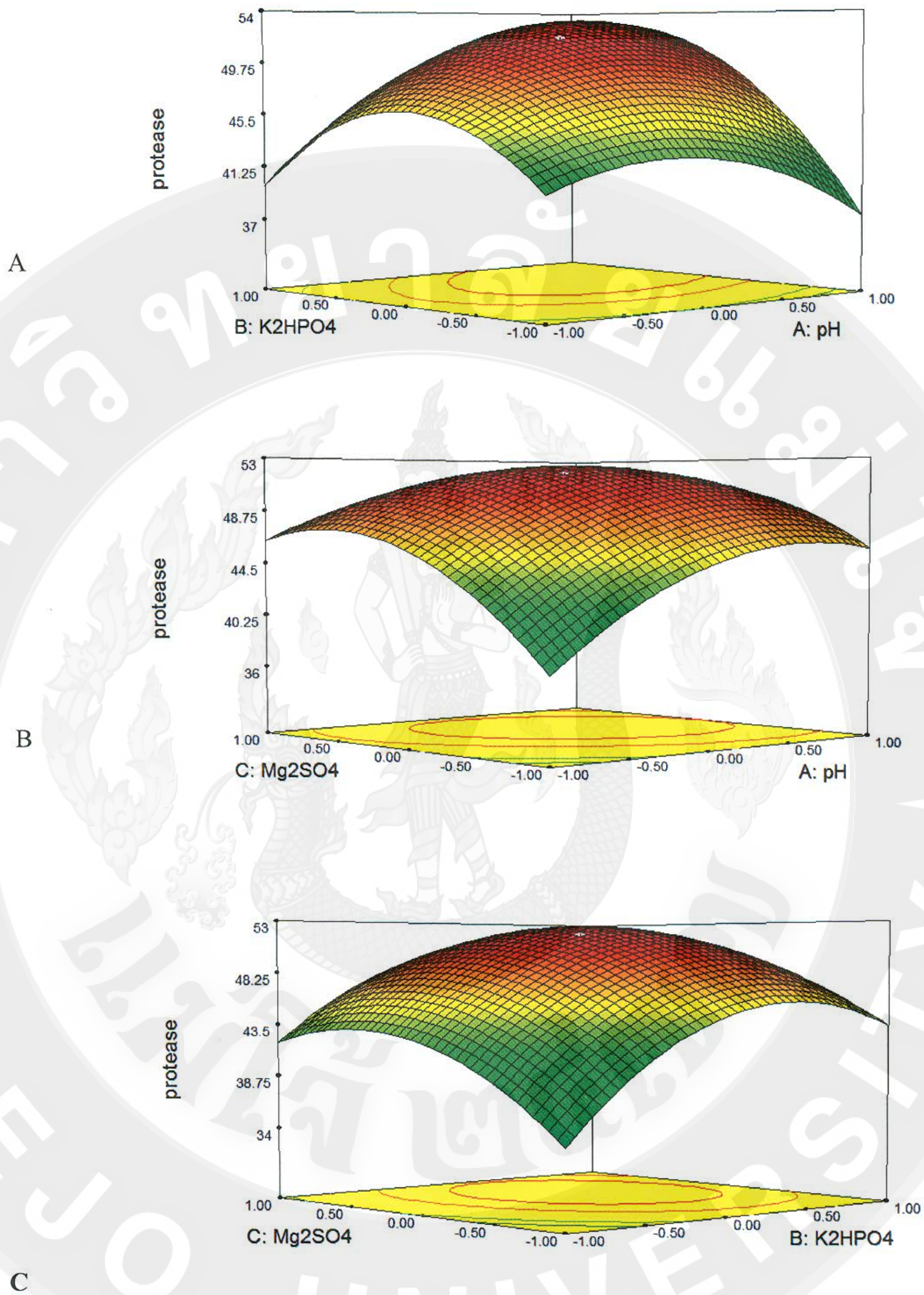
ตาราง 16 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและค่าการทำนายโดยใช้การศึกษาแบบ CCD โดยใช้อาหารเหลวกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบหลัก

RUN CCD	pH	K_2HPO_4	$MgSO_4.7H_2O$	observed Unit/ml	Predicted Unit/ml
1	-1	-1	-1	24.4	27.52
2	1	-1	-1	26	28.84
3	-1	1	-1	28.8	30.23
4	1	1	-1	49.2	43.96
5	-1	-1	1	35.2	40.44
6	1	-1	1	35.6	34.17
7	-1	1	1	32	29.16
8	1	1	1	38.4	35.28
9	-1.682	0	0	46.8	47.02
10	1.682	0	0	44.8	53.28
11	0	-1.682	0	47.2	41.39
12	0	1.682	0	38.8	44.61
13	0	0	-1.682	39.2	37.92
14	0	0	1.682	40.2	41.48
15	0	0	0	51.6	50.15
16	0	0	0	51.6	50.15
17	0	0	0	51.6	50.15
18	0	0	0	51.6	50.15
19	0	0	0	51.6	50.15
20	0	0	0	51.6	50.15

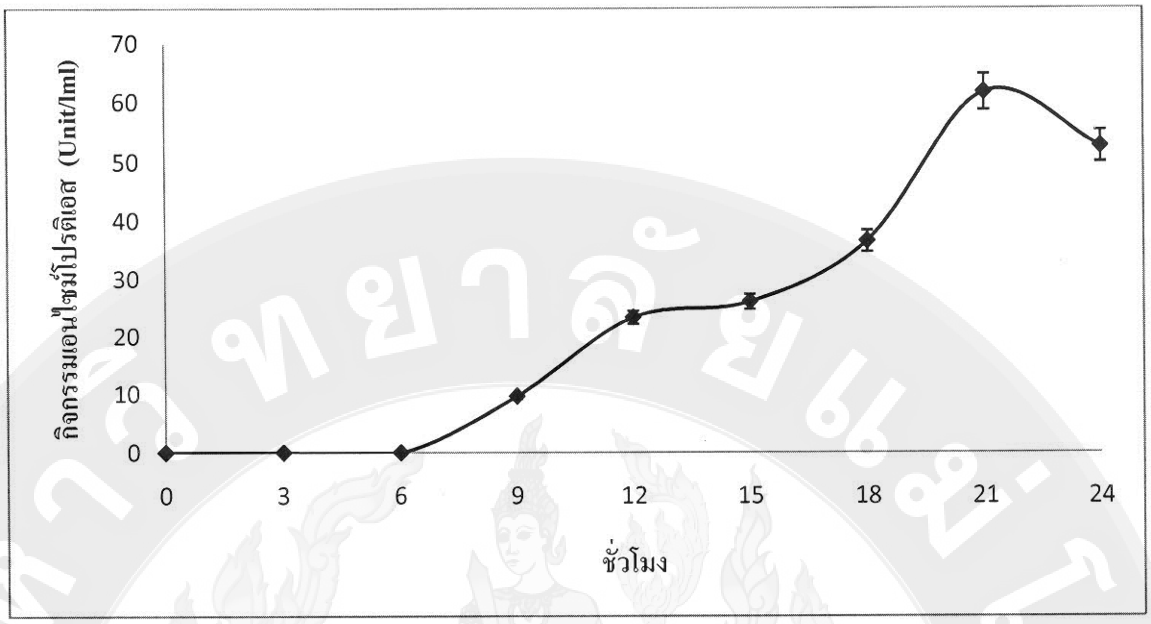
ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Design – Expert©software โดยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) โดยใช้อาหารเหลวกากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบหลัก

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	1300.73	144.525	4.77	0.011
Linear	3	318.44	106.146	3.51	0.057
A	1	71.44	71.444	2.36	0.156
B	1	156.78	156.783	5.18	0.046
C	1	90.21	90.211	2.98	0.115
Square	3	819.97	273.323	9.03	0.003
A*A	1	176.50	176.498	5.83	0.036
B*B	1	514.40	514.401	16.99	0.002
C*C	1	276.91	276.912	9.14	0.013
2-Way Interaction	3	162.32	54.107	1.79	0.213
A*B	1	115.52	115.520	3.81	0.079
A*C	1	35.28	35.280	1.17	0.306
B*C	1	11.52	11.520	0.38	0.551
Error	10	302.82	30.282		
Lack-of-Fit	5	302.82	60.563	*	*
Pure Error	5	0.00	0.000		
Total	19	1603.54			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
5.50287	81.12%	64.12%	0.00%		

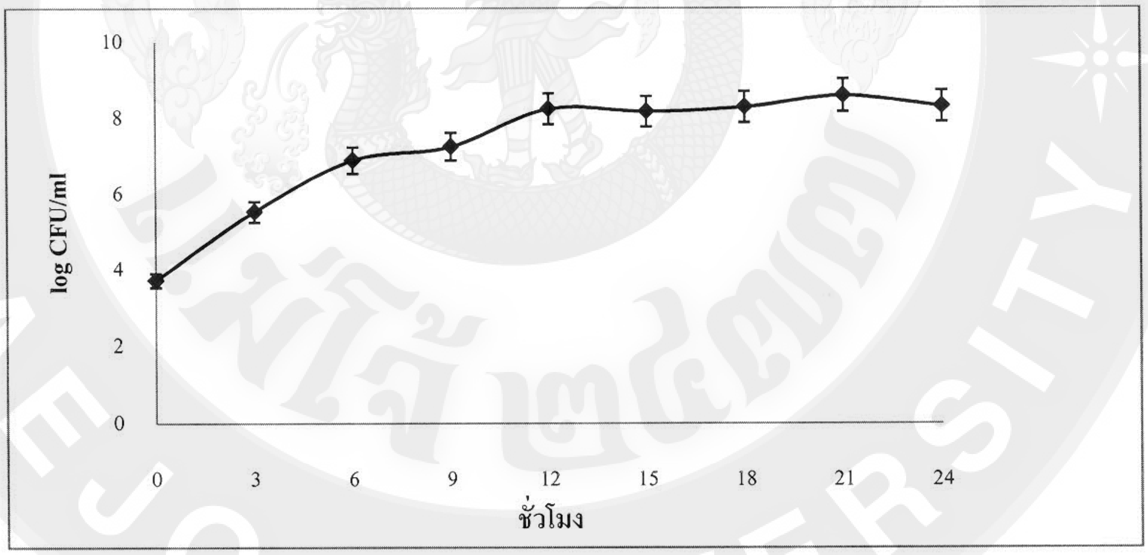
หมายเหตุ A คือ pH B คือ K_2HPO_4 และ C คือ $MgSO_4.7H_2O$



ภาพ 11 แสดงการตอบสนองต่อพื้นผิวโดยการใช้การศึกษาแบบ CCD ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เมื่อ A: ความสัมพันธ์ระหว่าง K_2HPO_4กับ pH B:ความสัมพันธ์ระหว่าง $MgSO_4.7H_2O$ กับ pH C: ความสัมพันธ์ระหว่าง $MgSO_4.7H_2O$ กับK_2HPO_4



ภาพ 12 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ *B. subtilis* MR10 ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่พัฒนาขึ้น ณ เวลาของการเพาะเลี้ยงต่างๆ



ภาพ 13 การเจริญของเชื้อ *B. subtilis* MR10 ที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นทุนต่ำที่พัฒนาขึ้น ณ เวลาของการเพาะเลี้ยงต่างๆ

การศึกษากระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสม

ในการศึกษากระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ทำโดยคัดเลือกตัวตกตะกอนโปรตีนที่เหมาะสมที่ให้ประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ใกล้เคียงกับแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 70 เปอร์เซ็นต์ ตัวตกตะกอนอินทรีย์ทั้งหมด 3ชนิด ได้แก่ อะซิโตน เอทานอล และเมทานอลถูกนำมาศึกษาในครั้งนี้ โดยประเมินจากกิจกรรมเอนไซม์และค่ากิจกรรมจำเพาะผลการทดลองพบว่าการตกตะกอนด้วยอะซิโตน สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด โดยมีผลได้ (yield) ของการเก็บเกี่ยวได้ 50.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้กันในห้องปฏิบัติการ รองลงมาคือ เอทานอล และเมทานอล โดยเก็บเกี่ยวได้ 42.77 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 18 ในขณะที่ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่เก็บเกี่ยวได้จากการใช้เอทานอลนั้นมีค่าสูงที่สุดที่ 38.57 Unit/ml จะเห็นว่าอะซิโตน และเอทานอลสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้สูง รวมถึงกิจกรรมจำเพาะและค่าความบริสุทธิ์ที่ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเลือกใช้ อะซิโตน ในการตกตะกอนโปรตีนเนื่องจาก อะซิโตน สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้มากกว่า นอกจากนั้นยังสามารถนำอะซิโตนกลับมาเวียนใช้ใหม่ได้ โดยนำอะซิโตนหลังการใช้การตกตะกอนนำไปกลั่น จากนั้นจึงนำไปเวียนใช้อีกครั้ง และจากรายงานของ Scopes (2004) พบว่าการใช้ อะซิโตน ในการตกตะกอนนั้นมีแนวโน้มในการทำให้เอนไซม์เสียสภาพน้อยกว่าการใช้เอทานอลในการตกตะกอน นอกจากนั้นรายงานของ Wang et al. (2010) ได้กล่าวถึงลักษณะของอะซิโตน ว่าเป็นสารที่มีค่าความมีขั้ว (dielectric constant) อยู่ที่ 20.7 นอกจากนั้นยังมีจุดเดือดอยู่ที่ 56 องศาเซลเซียส และมี dipole movement ที่สูงซึ่งทำให้เกิดผลดีต่อการตกตะกอนของเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อศึกษาระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมของอะซิโตนในการตกตะกอนโปรติเอสตั้งแต่ 40- 80 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าที่ระดับ 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้สูงสุดที่ 98.22 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น 70 60 50 40โดย เก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ 81.68 57.63 16.88 และ 38 1.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 19 แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ค่ากิจกรรมจำเพาะ และค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ตกตะกอนได้จากอะซิโตนที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์มีค่ามากสุดคือ 43.24 Unit/mg และ 25.56 เท่า รองลงมาคือ การใช้อะซิโตนที่ความเข้มข้น 70 50 80 และ 40 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตาราง 19 ซึ่งผลการตกตะกอนโปรตีนโดยการใช้ อะซิโตนที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ ครั้งนี้ให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Geethanjali and Subash (2013) ที่ศึกษาการเปรียบเทียบตัวตกตะกอนโปรตีน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต อะซิโตน และเอทานอล เพื่อ ทำเอนไซม์โปรติเอสให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วน (partial purification) ซึ่งพบว่า

อะซิโตนที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดเมื่อทำการเปรียบเทียบกับตัวตกตะกอนโปรตีนอีกสองชนิด นอกจากนั้นยังพบว่าถ้าต้องการให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมากขึ้นในการตกตะกอนโดยการใช้อะซิโตน ควรนำอะซิโตนไปทำการแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสก่อนการนำมาทำการตกตะกอน (Nadeemullah and Mukhtar, 2013)

ตาราง 18 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอส โดยการใช้ตัวตกตะกอนชนิดต่างๆ

	เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยว	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (Unit/ml)	ค่าความบริสุทธิ์ (เท่า)
โปรติเอสหยาบ	100	2.00	1.00
แอมโมเนียมซัลเฟต	45.23	22.12	11.06
อะซิโตน	50.76	34.01	17.00
เอทานอล	42.77	38.57	19.28
เมทานอล	16.7	26.20	13.09

ตาราง 19 แสดงค่าประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอส เมื่อใช้อะซิโตนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

	เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยว	ค่ากิกรรมจำเพาะ (Unit/ml)	ค่าความบริสุทธิ์ (เท่า)
โปรติเอสหยาบ	100	1.69	1.00
อะซิโตน 40 %	1.87	3.27	1.93
อะซิโตน 50 %	16.88	16.06	9.49
อะซิโตน 60 %	57.63	43.24	25.56
อะซิโตน 70 %	81.6	26.38	15.59
อะซิโตน 80 %	98.23	13.53	8.00

การศึกษากระบวนการรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอส

ในการเก็บรักษาโปรติเอสให้มีอายุการใช้งานที่ยาวนานนั้น จำเป็นต้องมีการเติมสารรักษาสภาพโปรตีนกลุ่มต่างๆ ลงไป ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของการเติมสารรักษาสภาพชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิต่างๆ สารรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ สารกลุ่ม cryoprotectants สารยับยั้งจุลินทรีย์ และสารกลุ่ม Metal chelator เมื่อทำการศึกษาที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21วัน พบว่าเอนไซม์ที่ไม่เติมสารรักษาสภาพมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลง เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่เติม โซเดียมเอไซด์ และโพแทสเซียมซอเบต ส่วนการเติม.ซูโคส เมนิทอล พบว่ากิจกรรมเอนไซม์มีแนวโน้มคงที่ ในขณะที่การเติมกลีเซอรอล โพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมเบนโซเอททำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ (KMS) ช่วยให้กิจกรรมเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 3 เท่า เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์หยาบที่ไม่เติมสารรักษาสภาพ แสดงผลดังตาราง 20 อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์เมื่อเติมสาร KMS ลงไปนี้ อาจสามารถอธิบายได้ว่าเกิดจากความสามารถในการรีดิวซ์ของ KMS ที่เกิดขึ้นกับโปรตีนเคซีนซึ่งเป็นสารตั้งในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จึงทำให้เกิดโครงสร้างที่ง่ายต่อการถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์ ดังนั้นจึงทำให้วัดค่ากิจกรรมได้สูงขึ้นนั่นเอง ยืนยันได้จากรายงานของ Andwe et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์โปรติเอสร่วมกับ KMS ในการเพิ่มปริมาณ free amino nitrogen (FAN) ในข้าวฟ่างโดยพบว่า KMS มีส่วนช่วยในการเพิ่มปริมาณของ FAN เนื่องจาก KMS ทำให้เกิดการรีดิวซ์ ของ kerfirin (โปรตีนจากน้ำแช่ฟางข้าว) ที่เป็น โพลิเมอร์ และโอลิโกเมอร์ไปเป็นโมโนเมอร์ นอกจากนั้นยังพบว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แม้มีการเติมสารรักษาสภาพโปรตีนลงไป แต่กิจกรรมของเอนไซม์ก็ยังคงลดลง ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ซึ่งภายหลังเมื่อได้มีการตรวจสอบด้วยการนำสารละลายเอนไซม์มาเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อก็พบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียจริง แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่เติมซูโคลส กลีเซอรอล โซเดียมเมทาไบซัลเฟต และโพแทสเซียมเบนโซเอตลงไปเป็นสารรักษาสภาพ พบว่ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์น้อยที่สุด ซึ่งผลการทดลองนั้นสอดคล้องกับผลการทดลองที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารเคมีที่นำมาศึกษาครั้งนี้บางชนิดได้ถูกรายงานถึงประสิทธิภาพในการใช้รักษาสภาพโปรตีน และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนมาแล้ว เช่น รายงานของ Flores et al. (2007) ในการศึกษาโพแทสเซียมซอเบต นั้นเป็นสารรักษาสภาพที่ดีโดยมีประสิทธิภาพในการเป็นสารป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย และจากรายงานของ Mendonca (1992) ได้ทำการศึกษากลไกการทำงานของโพแทสเซียมซอเบต ในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* พบว่าเมื่อทำการใช้เป็นสารรักษาสภาพในอาหารจะเกิดการไฮโดรไลซ์ และผลิตกรดซอร์บิกที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH นอกจากนั้นยังทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชันตรงตำแหน่ง double bonds โดยโมเลกุลของออกซิเจนจะทำให้พันธะแตกออก ทำให้มีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ได้โดย pH มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ คือจะทำให้บริเวณแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Aehel, 2007) ซึ่งจากรายงานนี้ทำให้เห็นว่าโพแทสเซียมซอเบต นั้นจะทำให้ pH เกิดการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นเมื่อนำการใช้ในการรักษาสภาพเอนไซม์อาจไม่เหมาะสม นอกจากนั้นรายงานของ Chefetz et al. (2006) พบว่าโซเดียมเอไซด์นั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง pH เช่นกันจึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นสารรักษาสภาพเอนไซม์เนื่องจาก pH มีผลต่อโปรตีนดังที่กล่าวมาข้างต้น

จากการศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการเลือก โพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ และกลีเซอรอลมาใช้เป็นสารรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอสเนื่องจากกลีเซอรอลนั้นเป็นสารรักษาสภาพในโปรตีนที่ดี จากการรายงานของ Saldotova (2000); Morell (1999) พบว่าการใช้ กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ นั้นสามารถรักษาสภาพโปรตีนใน diagonostic allergen ได้แต่อย่างไรก็ตามปริมาณความเข้มข้นของกลีเซอรอลก็มีผลต่อการรักษาสภาพของโปรตีน และนอกจากนั้นยังพบว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลโดยตรงในการรักษาสภาพโปรตีน ซึ่งจากรายงานของ Sudha et al. (2007) ได้ศึกษาผลในการใช้กลีเซอรอลรักษาสภาพโปรตีนพบว่ากลีเซอรอลที่ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงการใช้อุณหภูมิที่สูงนั้นไม่นั้นไม่สามารถรักษาสภาพโปรตีนได้

ตาราง 20 แสดงเปอร์เซ็นต์การหลงเหลือของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเติมสารเคมีรักษาสภาพโปรตีนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

	วันที่ 0	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 7	วันที่14	วันที่21
crude	100	86.58	88.19	88.86	83.63	83.35
crude+ glycerol 30%	125.59	141.81	152.32	125.48	133.68	135.75
crude+sucrose 30%	149.43	142.98	147.17	137.02	128.82	136.39
crude+manitol 30%	136.93	145.48	145.66	140.67	126.68	131.85
crude+Sodium azide 0.05%	90.44	93.48	93.31	89.92	86.82	84.83
crude+potassium metabisulfite 750µg/ml	339.42	345.43	362.14	329.62	319.38	326.06
crude+potassium sorbate 5%	92.61	104.49	97.02	80.48	89.85	89.85
crude+ potassium benzoate 1000µg/ml	164.81	178.84	178.51	127.28	173.39	165.48
crude+EDTA 5 mM	130.37	131.60	132.26	90.15	123.20	117.76

ภายหลังจากเลือกสารกลีเซอรอล และ KMS เพื่อใช้เป็นสารรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอสในศึกษาครั้งนี้เป็นที่เรียบร้อยแล้ว จึงได้ทำการศึกษาหาระดับที่เหมาะสมของสารเคมีทั้งสองชนิดนี้ด้วยแผนการทดลอง CCD ชนิด 2 ปัจจัย แบบ Octagon โดยทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 3 เดือน ตามลำดับ จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมทางสถิติ Design – Expert© software ผลการทดลองการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส แสดงดังตาราง 22 และภาพ 14 ซึ่งพบว่าโมเดลนี้สามารถเป็นที่ยอมรับได้เนื่องจากมีค่า R-squared อยู่ที่ 84.53 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่ากลีเซอรอล และ KMS นั้นมีค่า Coefficient ของทั้ง 2 ปัจจัยหลักมีค่าเป็นบวก แสดงว่าเมื่อทำการใส่ กลีเซอรอล และ KMS ที่ระดับสูงจะมีผลต่อการรักษาสภาพเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสมการแบบหุ่นกำลังสองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมโปรติเอสที่หลงเหลือ ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสกับปริมาณสารรักษาสภาพทั้งสองชนิดได้ดังต่อไปนี้

$$\text{protease (Unit/ml)} = 1946 + 96X_1 + 158X_2 - 785X_1^2 - 260X_2^2 - 65X_1X_2$$

เมื่อ X_1 คือ กลีเซอรอล, X_2 คือโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์

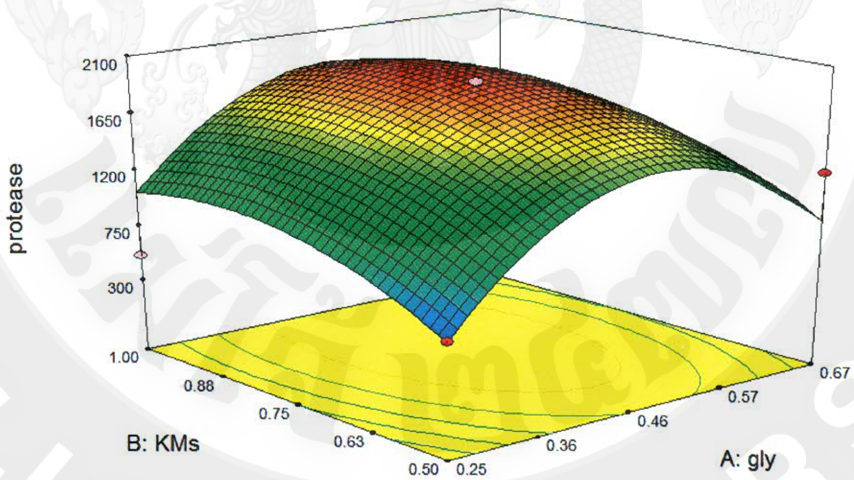
สามารถทำนายค่ากิจกรรมเอนไซม์จากสมการได้ค่าสูงสุดที่ 1972 Unit/ml เมื่อเติมกลีเซอรอล ความเข้มข้นสุดท้าย 4.6 M และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.03 M และพบว่าประสิทธิภาพการรักษาสภาพเอนไซม์ที่ทำนายได้จากสมการนี้ ใกล้เคียงกับค่าจริงที่ได้จากการทดลอง โดยเมื่อรักษาสภาพเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสที่สัปดาห์ที่ 4 แล้ว พบมีกิจกรรมเอนไซม์หลงเหลืออยู่ 1,946.15 Unit/ml ซึ่งคลาดเคลื่อนไป 1.3 เปอร์เซ็นต์ แต่การศึกษาระดับที่เหมาะสมของกลีเซอรอล และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนั้น ผลการทดลองพบว่าแต่ละชุดการทดคลองให้ผลประสิทธิภาพในการรักษาสภาพเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกันมากจึงทำให้ไม่สามารถนำมาประมวลผล ANOVA ได้ อาจจะสามารถกล่าวได้ว่า ในการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสนั้น จะใช้กลีเซอรอล และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ที่ระดับใดก็ได้

ตาราง 21 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้และค่าการทำนายของการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในสัปดาห์ที่ 4

run order	x1 (glycerol)	x2 (KMS)	observe Unit/ml	Predict (Unit/ml)
1	0.25	0.5	592.31	582.02
2	0.672	0.5	1284.62	904.35
3	0.25	1	510.77	1028.72
4	0.672	1	941.54	1089.52
5	1.196	0.75	570.77	511.25
6	0.07	0.75	318.46	240.34
7	0.43	1.353	898.46	1649.95
8	0.43	0.146	2092.31	1203.15
9	0.43	0.75	1946.00	1946.15
10	0.43	0.75	1946.00	1946.15
11	0.43	0.75	1946.15	1946.15
12	0.5	0.5	1946.00	1946.15

ตาราง 22 ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ Design – Expert© software โดยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) หาระดับที่เหมาะสมในการใช้สารรักษาสภาพ

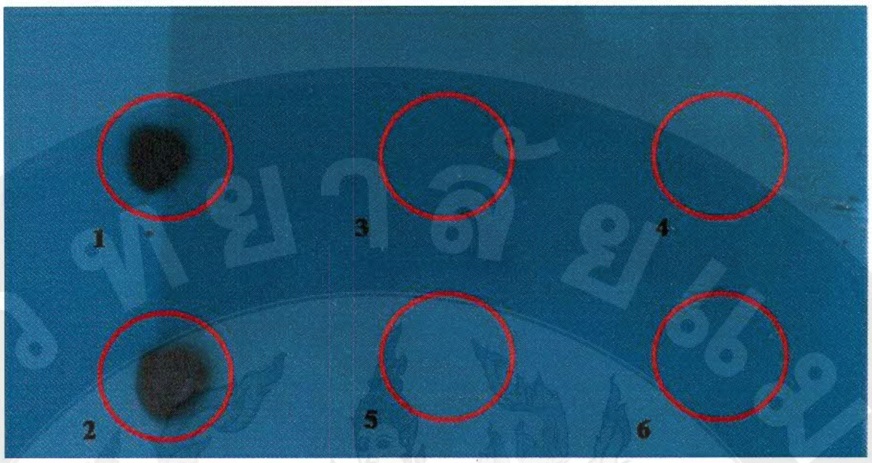
Term	Effect	Coef	E Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	1946	158	12.34	0.000		
gly	192	96	125	0.77	0.467	1.00
KMS	316	158	125	1.27	0.245	1.00
gly*gly	-1570	-785	134	-5.87	0.001	1.02
KMS*KMS	-519	-260	134	-1.94	0.093	1.02
gly*KMS	-131	-65	176	-0.37	0.722	1.00



ภาพ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการใช้สารกลีเซอรอล และKMS ที่มีต่อปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่หลงเหลืออยู่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 1 เดือน

ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* MR10 ในอาหารเหลวต้นทุนต่ำ และกระบวนการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นครั้งนี้ ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor (REF, Hev b1) ที่เป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดหลักที่ทำให้ก่อภูมิแพ้ต่อผู้ใช้งานผลิตภัณฑ์จากน้ำยางพาราซึ่งโปรตีนภูมิแพ้ชนิดนี้มีผลเป็นอย่างมากต่อผู้เป็นโรค spina bifida (Yeang et al. 2004) เอนไซม์โปรติเอสถูกนำมาบ่มร่วมกับโปรตีนจากน้ำยางพาราสด จากนั้นตรวจสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดดังกล่าว ด้วยเทคนิค Dot blot ซึ่งผลการทดลองก็ได้แสดงดังภาพ 15 พบว่าตัวอย่างโปรตีนจากน้ำยางพาราที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ (ชุดควบคุม) ยังคงตรวจพบการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF แต่ตัวอย่างตัวอย่างที่มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* (MR 10) นั้นพบว่าไม่มีการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ ไม่ว่าจะเป็นโปรติเอสที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NB หรืออาหารเหลวต้นทุนต่ำที่พัฒนาขึ้นก็ตาม โดยอาจสรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF ได้ ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาของ Perrealla and Gaspari (2002) ได้พบว่าการนำเอนไซม์โปรติเอสกลุ่ม alkaline protease บ่มร่วมกับน้ำยางเป็นเวลา 1 ถึง 2 วัน ที่อุณหภูมิ 13-32 °C แล้วก็ไม่สามารถพบการหลงเหลืออยู่ของโปรตีนเมื่อโดยทดสอบด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) แต่อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวไม่สามารถระบุถึงชนิดของโปรตีนแต่ละชนิดได้ ทำได้เพียงระบุขนาดของโปรตีนที่พบ อีกทั้งเทคนิค SDS-PAGE นี้ยังมีความไวในการตรวจจับ (Sensitivity) ที่ต่ำกว่าเทคนิค dot blot ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มาก โดยเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบโปรตีนได้ที่ระดับปริมาณต่ำสุดถึง 10 นาโนกรัม ดังนั้นผลการทดสอบที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ น่าจะสร้างมั่นใจได้ว่าน้ำยางพาราสดที่ผ่านการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10 ครั้งนี้ ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ชนิด REF จริง ถึงอย่างไรก็ตามเพื่อความมั่นใจในการใช้งานน้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่เตรียมได้นี้ ควรมีการทดสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ ด้วย



ภาพ 15 แสดงผลทดสอบการหลงเหลืออยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสดด้วยเทคนิค Dot blot

Dot 1, 2: สารสกัดจากน้ำยางพารา (control)

Dot 3: สารสกัดจากน้ำยางพาราที่มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสจาก NB

Dot 4: สารสกัดจากเนื้อยางพาราที่มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสจากกากถั่วเหลือง

Dot 5: สารละลายเอนไซม์โปรติเอสหยาบที่ผลิตจากอาหารสูตร NB

Dot 6: สารละลายเอนไซม์โปรติเอสหยาบที่ผลิตจากอาหารสูตรต้นทุนต่ำ

การวิเคราะห์ต้นทุนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้

จากการศึกษาการพัฒนาสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำสำหรับผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อ *B. subtilis* และการพัฒนากระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสม เพื่อรองรับการผลิตสำหรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปยางพารา ซึ่งจำเป็นต้องคำนึงต้นทุนการผลิตเป็นสำคัญนั้น นับได้ว่าการศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการลดต้นทุนกระบวนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยพบว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอส 1 Unit ด้วยกระบวนการที่ถูกพัฒนาขึ้นนี้มีต้นทุนอยู่ที่ 0.0022 บาท และใช้เวลาเพียง 59 ชั่วโมงในการผลิตหนึ่งกะ (batch) ขณะที่กระบวนการผลิตเดิมมีราคาต้นทุนอยู่ที่ 0.011 บาท และใช้เวลา 82 ชั่วโมงในการผลิตหนึ่งกะ ซึ่งราคาต้นทุนลดลงถึง 5 เท่า และลดเวลาการผลิตลงได้ 28.05 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้รายละเอียดการวิเคราะห์ต้นทุนแสดงดังตาราง 23 และ 24

ตาราง 23 แสดงการแจกแจงต้นทุนค่าใช้จ่ายและต้นทุนเวลาสำหรับการเตรียมเอนไซม์โปรติเอส ด้วยวิธีการเดิม

ขั้นตอน	**ต้นทุนค่าใช้จ่าย**		**ต้นทุนเวลา**	
	รายการ	**จำนวนเงิน (บาท)**	**รายการ**	**ชั่วโมง**
1. การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส	อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป NB ปริมาณ 13 กรัม (500 กรัม/1,300 บาท)	36.4	เพาะเลี้ยง *B. subtilis* และการเตรียมหัวเชื้อ	42
2. การแยกเซลล์แบคทีเรีย	-	-	ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ทิ้ง	1
3. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเลี้ยง	แอมโมเนียมซัลเฟต 576 กรัม/ ลิตร (1,000 กรัม/400 บาท)	226.8	เติมแอมโมเนียมซัลเฟต	6
	ถุงไดอะไลซิส 50 เซ็นติเมตร (9,000 บาท/ 30 เมตร)	130	ทิ้งไว้เพื่อตกตะกอนสมบูรณ์	12
			ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนโปรตีน	3
			ทำไดอะไลซิสเพื่อกำจัดเกลือ	18
	รวมเงิน	413.2	รวมเวลา	82
ได้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้งสิ้น 37,380 Unit จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร				
ดังนั้น 1 Unit มีราคาต้นทุน 0.011 บาท ใช้เวลา 82 ชั่วโมง				

ตาราง 24 แสดงการแจกแจงต้นทุนค่าใช้จ่ายและต้นทุนเวลาสำหรับการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธีกระบวนการที่พัฒนาขึ้น

ขั้นตอน	ต้นทุนค่าใช้จ่าย		ต้นทุนเวลา	
	รายการ	จำนวนเงิน (บาท)	รายการ	ชั่วโมง
1. การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส	อาหารเลี้ยงเชื้อกากถั่วเหลืองเสริมอื่นๆ (กากถั่วเหลืองราคา 20 บาท/ กิโลกรัม)	2	เพาะเลี้ยง *B. subtilis* และการเตรียมหัวเชื้อ	42
2. การแยกเซลล์แบคทีเรีย	-	-	ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ทิ้ง	1
3. การเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเลี้ยง	สารอะซิโตน (160 บาท/ลิตร)	256 (76.8)**	เติมอะซิโตน ทิ้งไว้เพื่อตกตะกอนสมบูรณ์ ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนโปรตีน	0.5 12 3
	รวมเงิน	78.8	รวมเวลา	59
ได้ผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้งสิ้น 35,555.56 Unit จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร				
ดังนั้น 1 Unit มีราคาต้นทุน 0.0022 บาท ใช้เวลา 59 ชั่วโมง				

** เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการตกตะกอนแล้ว สามารถกลั่นอะซิโตนกลับมาใช้ใหม่ได้ และเมื่อคาดว่าการสูญเสียของอะซิโตนระหว่างการกลั่นอยู่ที่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

1. ในการพัฒนาสูตรอาหารเหลวต้นทุนต่ำเพื่อทดแทนอาหารเหลวสูตร NB ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าสูตรอาหารเหลวกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมคือ กากถั่วเหลือง 100 กรัม/ลิตร K_2HPO_4 0.71 กรัม/ลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.72 กรัม/ลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เริ่มต้นเท่ากับ 7.68 และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะดังกล่าวแล้วพบว่าแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้เท่ากับ 61.67 Unit/ml ซึ่งใกล้เคียงกับอาหารเหลวสูตร NB และสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากถั่วเหลืองถึง 4.3 เท่า

2. จากการศึกษากระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอสที่เหมาะสมจากอาหารเลี้ยงเชื้อทดแทนการใช้สารแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าอะซิโตนที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการตกตะกอนเอนไซม์มากที่สุด โดยสามารถเกี่ยวเอนไซม์ได้เท่ากับ 57.63 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งอะซิโตนสามารถถูกนำมาเวียนใช้ใหม่ได้อีกด้วย

3. ในการศึกษากระบวนการยืดอายุการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอส พบว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4.6 M และโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.03 M สามารถใช้เป็นสารรักษาสภาพเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 1 เดือน

4. เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวต้นทุนต่ำและกระบวนการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ พบว่ายังคงมีความสามารถในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด rubber elongation factor (REF) ที่พบในน้ำยางพาราสดได้ ไม่แตกต่างกับเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร NB

5. จากการวิเคราะห์ต้นทุนการผลิตเอนไซม์โปรติเอสด้วยกระบวนการที่พัฒนาขึ้นจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าเอนไซม์โปรติเอส 1 Unit มีต้นทุนอยู่ที่ 0.0022 บาท และใช้เวลาเพียง 59 ชั่วโมง ในหนึ่งรอบการผลิต ซึ่งมีต้นทุนลดลงจากกระบวนการผลิตในห้องปฏิบัติการถึง 5 เท่า

บรรณานุกรม

คณาจารย์ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. 2552. **การพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมเกษตร.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 468 น.

จิตติมา เจริญพานิช. 2553. **เอนไซม์วิทยา.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอ.เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์. 465 น.

ชญาภา นิ่มสุวรรณ. 2550. การแพ้โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ:วิธีการตรวจสอบ และเทคโนโลยีการแก้ไข. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการยาง** 1: 1 – 14.

ชรินทร์ เตชะพันธุ์. 2542. **การทำโปรตีนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: อุตสาหกรรมเกษตร. 87 น.

นุชนาฏ ณ ระนอง และ วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2539. เทคโนโลยีการลดโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ. **วารสารยางพารา** 16: 79-86.

พงษ์ธร แซ่อุย. 2548. **ยาง: ชนิด สมบัติ และการใช้งาน.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ซีเอ็ดยูเคชั่น. 125 น.

พรรษา อดุลยธรรม และ กฤษณา คงศิลป์. 2543. **รายงานการวิจัยเรื่อง การใช้เอนไซม์ในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางเพื่อการผลิตน้ำยางข้น.** สงขลา: ศูนย์วิจัยยางสงขลาสถาบันวิจัยยาง.

พร้อมศักดิ์ สงวนธำรง. 2550. การเปรียบเทียบวิธีทดสอบมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในผลิตภัณฑ์จากน้ำยาง: วิธีไหนดีที่สุด. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการยาง** 1: 18-22.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. **เอนไซม์ทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 305 น.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2556. **เอนไซม์เทคโนโลยี.** กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 271 น.

สมใจ ศิริโภค. 2555. **จุลชีวิทยาอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. 339 น.

ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. โปรตีนในน้ำยางธรรมชาติ. **ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 2: 2-15.

วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2549. **ผลิตภัณฑ์ยาง: ยางธรรมชาติ:การผลิตและการใช้งาน (Natural Rubber :Production And Applictions)** . กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 274 น.

วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2552. **ผลิตภัณฑ์ยาง: กระบวนการผลิตและเทคโนโลยี (Rubber Production: Manufacturing & Technology).** กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 203 น.

วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2555. **เทคโนโลยีน้ำยาง (Latex Technology).** กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). 274 น.

อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2545. **การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร.** พิมพ์ครั้งที่ 3. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 168 น.

__________. 2554. อุตสาหกรรมและผลิตภัณฑ์ยาง. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oie.go.th/sites/sites/default/files//attachments/IndustBasicKnowledge/Master_2.pdf. (15 กันยายน 2557).

__________. 2555. น้ำยางธรรมชาติ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา:http://www.rubbercenter.org/dictionary/show.php?ID=5 (15 กันยายน 2557).

Aehle, W. 2007. **Enzyme in industry**. 3 rd ed. Netherlands: Darmstadt. 593 p.

Ashis, K., Hemanta, A. and Sudhir, K. 2007. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrical* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal** 39: 353–361.

Andwe, C. C. N., Hall, A. N. and Taylor, J. R. N. 2008. Proteolysis of sorghum endosperm protein when mashing with raw grain plus exogenous protease and potassium metabisulphite. **Journal of the Institute Brewing** 114(4): 343-348.

Ariyawiriyanan,W., Sae-heng, K., Kewwarin, J. 2013. The mechanical properties of vulcanized deproteinized natural rubber. **Energy Procedia** 34: 728-733.

Banerjee, B., K. Kanitpong, J. N. Fink, M. Zussman, G. L. Sussman, K. J. Kelly and V. P. Kurup. 2000. Unique and shared IgE epitopes of Hev b 1 and Hev b 3 in latex allergy. **Molecular Immunology** 37 (12–13): 789-798.

Barzegar, H., Azizi, M. H., Barzegar, M. and Hamidi-Esfahani, Z. 2014. Effect of potassium sorbate on antimicrobial and physical properties of starch-clay nanocomposie fims. **Carbohydrate Polymers** 110: 26-31.

Barrett, A.J., N. D. Rawlings and J. F. Woessner. 2003. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2nd ed . San Diego: Academic Press. 1,666 p.

Beezhold, D. H., V. L. Hickey, J. E. Slater and G. L. Sussman. 1999. Human IgE-binding pitopes of the latex allergen Hev b 5. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 103 (6): 1166-1172.

Bond, O. 2011. **Benefits of yeast extract**. [online]. http://www.livestrong.com/article/471516-benefits-of-yeast-extract (26 September 2014).

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. **Science Asia** 28: 241- 245.

Chefetz, B., K. Stimler, M. Shechter and Y. Drori. 2006. Interactions of sodium azide with triazine herbicides: Effect on sorption to soils. **Chemosphere** 65 (2): 352-357.

Cho, H.I. and Zoh, K.D. 2007. Photocatalytic degradation of azo dye (Reactive Red 120) in TiO2/UV system: Optimization and modeling using a response surface methodology (RSM) based on the central composite design. **Dyes and Pigments** 75:533- 543.

Chu, I.M., Lee, C. and Li, T.S. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch culture of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme and Microbial Technology** 4: 55-61.

Dajanta, K., S. Wongkham, P. Thirach, P. Baophoeng, A. Apichartsrangkoon, P. Santithum and EkachaiChukeatirote. 2009. Comparative study of proteolytic activity of protease-production bacteria isolated from thua nao. **Maejo International Journal of Science and Technology** 3 (2): 269-276.

Dennis, MS., Henzel, WJ., Bell, J., Kohr, W. and Light, DR. 1989. Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in Hevea latex. **Journal of Biological Chemisty** 264: 18618-18626.

Dey, G., A. Mitra, R. Banerjee and B. R. Maiti. 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal** 7 (3): 227-231.

Dixon, M. and E.C. Webb. 1979. **Enzyme.** 3rd ed. London: Longman. 1116 p.

__________. 1997. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus.* **American Society for Microbiology** 41: 3.

Fang, Y., Liu, S., Wang, S. and Lv., M. 2009. Isolation and screening of a novel extracellular organic solvent- stable protease producer. **Biochemical Engineering Journal** 43: 227-231.

Florer, S. F., Rojas, A. M., Goyanes, S. and Gerschenson, L. 2007. Physical properties of tapioca- starch edible films. **European Food Research and Technology** 225: 375-384

Geethanjal, S. and Subash, A. 2013. Comparative study on precipitation techniques for protease isolation and purification from Labeo rohita Viscera. **Journal of Aquatic Food Product Technology** (22): 121-128.

George, KM., Rajammal, G., Amma, G. and Mathew, N.M. 2007. Stabilized liquid papain can deproteinise NR latex. **Rubber Asia** 21(5): 81-84.

Gordon, L., Donald, H. and Viswanath, P. 2002. Allergens and natural rubber proteins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 95:635-642.

Gupta, R., Beg, Q., Khan, S. and Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties pf microbial alkaline protease. **Apply Microbiology and Biotechnology** 60: 381- 395.

Haddar, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M. and Kamoun, S, A. 2010. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 110 (3): 288-294.

Hamilton, R. 2002. Diagnosis of natural rubber latex allergy. **Methods** 27: 22-31.

Ichikawa, N., Hwee, EA., and Tanaka, Y. 1993. **Properties of Deproteinised Natural Nubber Latex, In Natural Rubber Current Developments in Product Manufacture and Applications Rubber**. Malaysia: Research Institute .

Joo, H.S.,Kuma,r C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R. and Cang C.S. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii.* **Process Biochemistry** 38:155-159.

Khan, S., Misra, AK., Tripathi CK., Mishra, BN. and Bihari V. 2006. Response surface optimization of effective medium constituents for the production of alkaline protease from a newly isolated strain of Pseudomonas aeruginosa. **Indian Journal of Experimental Biology** 44(2): 151-6.

Kirk, O., T. V. Borchert and C. C. Fuglsang. 2002. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology** 13(4): 345-351.

Kumar, C. G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances** 17 (7): 561-594.

Li, X., Ouyang, J., Xu, Y., Chen, M., Song, X., Yong, Q. and Yu, S. 2009. Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. **Bioresource Technology** 100: 3613- 3617.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry** 193: 265- 275.

Mehrotra, S., Pandey, P. K., Gaur, R. and Darmwal, N. S. 1999. The production of alkaline protease by a Bacillus species isolate. **Bioresource Technology** 67(2): 201-203.

Mendonca, A. F. 1992. Mechanism of inhibitory action of potassium sorbate in *Escherichia coli.* **Food Science and Human Nutrition**, Lowa State University.

Moon, SH. and Parulekar, SJ. 1993. Some observation on protease production in continuous suspention culture of *Bacillus firmus.* **Biotechnology Engineering Journal** 41: 43- 54.

Montgomery, D.C., and Runger G.C. 2002. Applied statistics and probability engineers. 3 rd ed. New York: wiley. 784 p.

Morell, F., Codina, R. and Rodringo, M. 1999. Increase positivity of skin test and allergenic stability of glycerinated soybean hull extracts. **Clinical & Experimental Allergy** 29: 388-393.

Musil, K., Novakova, O. and Kunz, K. 1997. **Biochemistry in schematic perspective**. Avicenum Czechoslovak Medical press. 182 p.

Nadeemullah and mukhtar, H. 2013. Partial purification of alkaline protease by mutant strain of *Bacillus subtilis*$^{EMS-6}$. **Biologia (pakistan)** 59(1): 165-171.

Nanti, S., Wongputtisin, P., Sakulsingharoj, C., Klongklaew, A. and Chomsri, N. (2014). Removal of allergenic protein in natural rubber latex using protease from *Bacillus* sp. **Journal Food and Applied Bioscience** 27: 32-45.

Nermeen, A., Hassan A.H. and Gehan, M. 2010. Response Surface Methodology as a Tool for Optimizing the Production of Antimicrobial Agents from *Bacillus licheniformis* SN2. **Current Research in Bacteriology** 3: 1-14.

Oskouie, S. F. G., F. Tabandeh, B. Yakhchali and F. Eftekhar. 2008. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by Bacillus clausii. **Biochemical Engineering Journal** 39 (1): 37-42.

Plackett, R.L. and Burman J.P. 1946. The design ofoptimum multifactorial experiments. **Biometrika** 33: 305-325.

Palosuo,T. 1997. Latex allergens. **Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique** 37: 1184-1187.

Pant, G., A. Prakash, J. V. P. Pavani, S. Bera, G. V. N. S. Deviram, A. Kumar, M. Panchpuri and R. G. Prasuna. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from Bacillus subtilis. **Journal of Taibah University for Science** 9 (1): 50-55.

Perrella, F. and Gaspari, A. 2002. Nutural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. **Methods** 27: 77-86.

Pichayakorn, W., Suksaeree, J., Boonme, Prapaporn., Taweepreda, W. and Ritthidej. G.C. 2012. Preparation of Deproteinized Natural Rubber Latex and Properties of Films Formed by Itself and Several Adhesive Polymer Blends. **Industry and Engineering Chemistry** 51 (41): 13393–13404.

Priya, P., P. Venkatachalam and A. Thulaseedharan. 2006. Molecular cloning and characterization of the rubber elongation factor gene and its promoter sequence from rubber tree (Hevea brasiliensis): A gene involved in rubber biosynthesis. **Plant Science.** 171 (4): 470-480.

Reddy, L. V. A., Wee ,Y.-J. Yun , J.-S. and Ryu, H.-W. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of Bacillus sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. **Bioresource Technology** 99 (7): 2242-2249.

Saldotova, L., Paupore, E., Burk, S., Pastor, R. and Slater, J. 2000. The stability of house dust mite allergens in glycerinated extracts. **Journal allergy Clin Immunol** 105: 7482-7488.

Schloman, JR, WW., Teetor, VH., and Ray, DT. 2006. Protein level affect the cure efficiency and allergenetic potential of polyisoprene lattices. **Rubber Chemistry and Technology** 79(4): 631-640.

Scopes, R. K. 2004. **Protein Purification: Princiles and Practice**. 3 nd ed. New york: **NY.**

Sindhu, R., Suprabha, G. N. and Shashidhar, S. 2009. Optimization of process parameterfor the production of alkaline protease from *Penicillum godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry. **African Journal of Microbiology Research** 3(9): 515-522.

Siti Maznah, K., A. Baharin, I. Hanafi, M. E. Azhar and M. H. Mas Rosmal Hakim. 2008. Effect of acid treatment on extractable protein content, crosslink density and tensile properties of natural rubber latex films. **Polymer Testing** 27 (7): 823-826.

Sudha, V. T., Srivastava, D., Arora, N., Gaur, S. N. and Singh, B. P. 2007. Stability of protease-periplaneta americana allergen extract during storage:formulating preservatives to enhance shelf life. **Journal of Clinical Immunology** 27(3): 294-301.

Sussman, B., Frcp, P. and Kurup, P. 2002. Allergens and natural rubber proteins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 110: s33-s37.

Taylor, W. G., R. A. Dworkin, R. W. Pumper and V. J. Evans. 1972. Biological efficacy of several commercially available peptones for mammalian cells in culture. **Experimental Cell Research** 74(1): 275-279.

Thys, R. C. S., S. O. Guzzon, F. Cladera-Olivera and A. Brandelli. 2006. Optimization of protease production by Microbacterium sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry** 41 (1): 67-73.

Vesna, J., Withrow, T. and Hamilton, R. 1995. Allergens, IgE, mediators, inflammatory mechanisms Characterization of the allergen(s) in latex protein extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 95:635-642.

อะซิโตนที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดเมื่อทำการเปรียบเทียบกับตัวตกตะกอนโปรตีนอีกสองชนิด นอกจากนั้นยังพบว่าถ้าต้องการให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมากขึ้นในการตกตะกอนโดยการใช้อะซิโตน ควรนำอะซิโตนไปทำการแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสก่อนการนำมาทำการตกตะกอน (Nadeemullah and Mukhtar, 2013)

ตาราง 18 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอส โดยการใช้ตัวตกตะกอนชนิดต่างๆ

	เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยว	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (Unit/ml)	ค่าความบริสุทธิ์ (เท่า)
โปรติเอสหยาบ	100	2.00	1.00
แอมโมเนียมซัลเฟต	45.23	22.12	11.06
อะซิโตน	50.76	34.01	17.00
เอทานอล	42.77	38.57	19.28
เมทานอล	16.7	26.20	13.09

ตาราง 19 แสดงค่าประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรติเอส เมื่อใช้อะซิโตนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

	เปอร์เซ็นต์การเก็บเกี่ยว	ค่ากิกรรมจำเพาะ (Unit/ml)	ค่าความบริสุทธิ์ (เท่า)
โปรติเอสหยาบ	100	1.69	1.00
อะซิโตน 40 %	1.87	3.27	1.93
อะซิโตน 50 %	16.88	16.06	9.49
อะซิโตน 60 %	57.63	43.24	25.56
อะซิโตน 70 %	81.6	26.38	15.59
อะซิโตน 80 %	98.23	13.53	8.00

Wang, Q., Hou, Y., Xu, Z., Miao, J. and Li, G. 2008. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia sp.* NJ341 with response surface methodology. **Bioresource Technology** 99(6): 1926-1931.

Wang, S. W. 2010. Enzyme purification by acetone precipitation. **College park: university of Maryland, department of chemical and bimolecular engineering.**

Wongputtisin, P., Khanongnuch, C., Khongbantad, W., Niamsup, P. and Lumyong, S. 2012. Screening and selection of *Bacillus spp.* for fermented corticate soybean meal production. **Applied Microbiology** 113: 798-806.

Yanga, J., Shihb, I., Tzengc, Y., Wanga, S. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis*that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology** 26 : 406 – 413.

Yeang, H., Heimsoth, S., Sulong, Y., Loke, Y., Lau, C. and Hemiton, R. 2004. Hev b5 and Hev b13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 114:593-598.

Yoshimasa, O. and Seiichi, S. 2012. Protein-free natural rubber. **Colloid Polymer Science** 290: 331-333.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

1.1. สารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0

Stock A: 0.05 M K_2HPO_4

ชั่ง K_2HPO_4 8.709 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

Stock B: 0.05 M KH_2PO_4

ชั่ง KH_2PO_4 6.804 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Stock A 61.5 มิลลิลิตร

Stock B 38.5 มิลลิลิตร

ซึ่งหากต้องการเตรียม 0.05 M phosphate buffer ที่ pH อื่นก็สามารถเตรียมได้จากตาราง 24

ตาราง 25 การเตรียม 0.05 M phosphate buffer

pH	1 M K_2HPO_4 (ml)	1 M KH_2PO_4
5.8	8.5	91.5
6	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7	61.5	38.5
7.2	71.5	28.5
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4

1.2 สารละลาย 0.5% Casein from bovine milk

ละลาย Casein from bovine milk 0.5 กรัม ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย 0.4 M Sodium carbonate

ชั่ง Sodium carbonate 42.3945 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.4 สารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid

ชั่ง Trichloroacetic acid 65.3551 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรเก็บไว้ในขวดสีชา

1.5 สารละลาย Folin-ciocalteau reagent

เจือจาง Folin-ciocalteau reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1

1.6 สารละลาย 0.1% Tyrosine

ชั่ง Tyrosine 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Modified Lowry's method

2.1 Reagent A: Na_2CO_3 6 %(w/v)

2.2 Reagent B: $Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$ 1.5% (w/v) + sodium citrate 3% (w/v) ในอัตราส่วน 1:1

2.3 Reagent C: ประกอบด้วย Reagent A + Reagent B ในอัตราส่วน 10:0.2

2.4 Reagent D: Folin-ciocalteau reagent :น้ำ ในอัตราส่วน 72:28

3. สารละลายสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl

3.1 สารละลาย Sodium Hydroxide ความเข้มข้น 32%

ชั่ง Sodium hydroxide (NaOH) 320 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (เตรียมในตู้ดูดควัน)

3.2 Mixed indicator

ชั่ง Methyl red จำนวน 0.1 กรัม นำละลายด้วย เอทานอล 50 มิลลิลิตร และชั่ง Bromocresol green จำนวน 0.1 กรัม นำมาละลายด้วย เอทานอล 50 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายทั้งสองเทรวมกัน และคนให้เข้ากัน

3.3 สารละลาย Boric acid ความเข้มข้น 4%

ชั่ง Boric acid จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนละลายหมด จากนั้นนำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

3.4 Mixed Catalyst

ชั่ง Potassium Sulfate (K_2SO_4) + Copper Sulfate ($CuSO_4$. $5H_2O$) ในอัตราส่วน 95: 5 โดยน้ำหนัก (ใช้10 กรัม/หลอด)

3.5 Hydrochloric acid ความเข้มข้น 0.005 N

ปิเปตกรด Hydrochloric acid (HCl) จำนวน 0.414 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรที่มีในน้ำกลั่นอยู่ส่วนหนึ่ง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนตามขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE

4.1 สารละลาย 10x Electrode running buffer pH 8.3

ชั่ง Tris Base 30.3 กรัม, Glycine 144.0 กรัม และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร

4.2 สารละลาย Coomassie Stain solution

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G 250 1.25 กรัม ผสมกับ Acetic acid 50 มิลลิลิตร และ Methanol 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4.3). สารละลาย Destain solution

Destain I : กรดอะซิติก 9% ผสมกับ Methanol 45% ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

Destain II: Acetic acid 7% และผสมกับ Methanol 5% ปรับปริมาตรด้วยน้ำ กลั่นให้ เป็น 100 มิลลิลิตร

5. สารละลายสำหรับการทำ Western blot method

5.1 10x Electrode (Running Buffer) pH 8.3

Tris base	30.3	กรัม
Glycine	144.0	กรัม
SDS	10.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

5.2 Transfer Buffer 10x (เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส)

Tris base	15.15	กรัม
Glycine	72.0	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

เตรียม Transfer Buffer 1x

เอา Transfer Buffer 10x มา 50 มิลลิลิตร แล้วเติม methanol 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

5.3 TBS Buffer

TBS Buffer ประกอบด้วย 10 mM Tris HCl pH 7.5 และ 150 mM NaCl

5.4 เตรียม TBST

TBST ประกอบด้วย 0.01% Tween 20 ใน TBS Buffer (10 µl / 100 ml)

5.5 เตรียม 4% non fat milk

ชั่ง non fat milk มา 4 g ละลายใน TBS Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.6 สารละลายสำหรับการประกบฟิล์ม

I : Fixer 400 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

II: Developer 400 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

6. วิธีการคำนวณและวางแผนการทดลองแบบ Steepest ascent

1. นำค่า p- value ที่มีค่าความเชื่อมั่นมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองด้วยแผนการทดลอง Plackett and Burman Design มาใช้วางแผนการทดลอง Steepest ascent โดยดูค่าความเชื่อมั่นที่น่าเชื่อถือ (p ไม่เข้าใกล้ 0.05 มากเกินไป) จากนั้นนำค่าสัมประสิทธิ์ของ p ที่น่าเชื่อถือมาใช้เป็นตัวหารของแต่ละปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์

2. ค่าสัมประสิทธิ์ของปัจจัยที่หารเรียบร้อยแล้ว คือค่า Δ code และ ค่าจริงคือ Δ code × ระยะห่างของค่าจริง จากนั้นทำการใส่ค่า code ดังตาราง 8 ในบทที่ 3

ตาราง 26 แสดงค่าสัมประสิทธิ์และการคำนวณ Δ code ของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

	pH	**K_2HPO_4**	**$MgSO_4 \cdot 7H_2O$**
ค่าสัมประสิทธิ์	-20.91	21.09	22.2
ค่าสัมประสิทธิ์/ 22.2	0.946	0.954	1

ภาคผนวก ข

การวัดปริมาณโปรตีนและการเตรียมกราฟมาตรฐาน

การวัดปริมาณโปรตีนและการเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลาย Tyrosine

ขั้นตอนการเตรียมกราฟมาตรฐาน

1.1 เตรียมสารละลาย stock solution Tyrosine ความเข้มข้น 1,000 μg/ml

1.2 เตรียมสารละลาย Tyrosine ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน ตั้งแต่ 0 - 1,000 μg/ml

1.3 นำสารละลาย Tyrosine 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที

1.4 เติมสารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

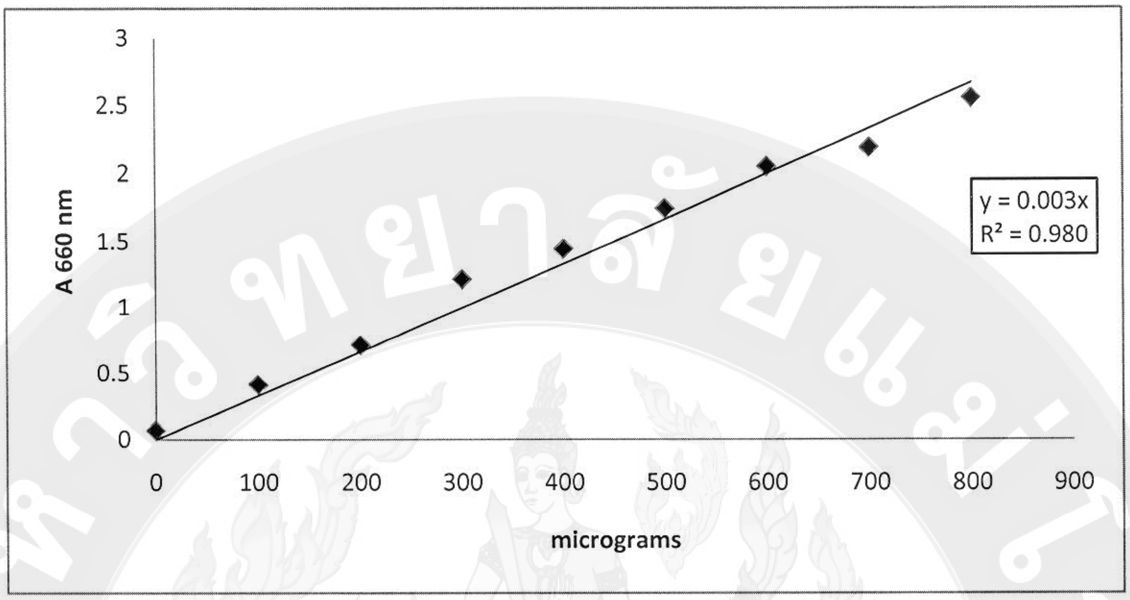
1.5. ดูดสารละลายส่วนใสมา 0.25 มิลลิลิตร รวมกับ 0.4 M Na_2CO_3 1.25 มิลลิลิตร และ Folin- ciocalteau reagent 0.15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที

1.6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm

1.7 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Tyrosineกับ A660

ตาราง 27 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Tyrosine ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาณ Tyrosine (microgram)	A 660 nm
0	0.066
100	0.414
200	0.713
300	1.213
400	1.441
500	1.74
600	2.049
700	2.188
800	2.547



ภาพ 16 กราฟมาตรฐานสารละลาย Tyrosine

2. การวัดหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Modified Lowry's method

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

2.1 ดูดตัวอย่าง 0.8 มิลลิลิตร เติมสารละลาย C 0.3 มิลลิลิตร และนำไป Vortex ทิ้งไว้ 10 นาที

2.2 เติมสารละลาย D 0.1 มิลลิลิตร นำไป Vortex ทิ้งไว้ 15 นาที

2.3 วัดค่าการดูกลืนแสงที่ 750 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐาน

<u>การเตรียมกราฟมาตรฐาน Ovalbumin</u>

1. เตรียมสารละลาย Ovalbumin ความเข้มข้น 1000 µg /ml

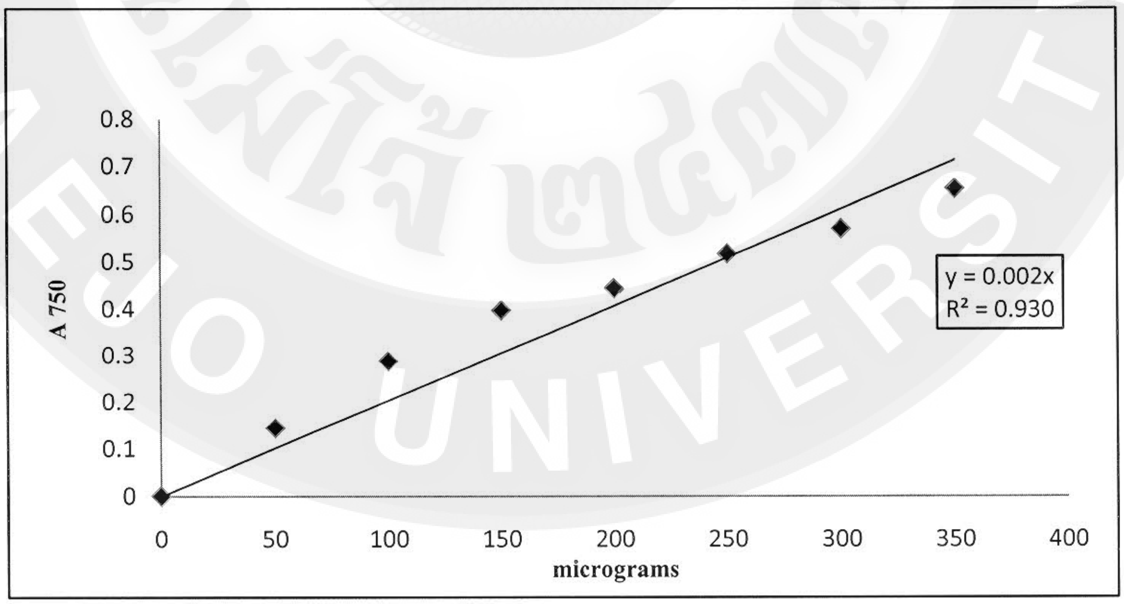
2. สารละลาย Ovalbumin 0.8 ml เติมสารละลาย C 0.3 ml ทำการ Vortex ทิ้งไว้ 10นาที

3. เติมสารละลาย D 0.1 ml จากนั้นนำไป Vortex ทิ้งไว้ 15 นาที

4. วัดค่าการดูกลืนแสงที่ 750 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืน แสงที่ 750 nm กับความเข้มข้นของสารละลาย Ovalbumin

ตาราง 28 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Ovalbumin ที่ความเข้มข้นต่างๆด้วย วิธี Modified Lowry's method

ปริมาณ Ovalbumin (micrograms)	A 750 nm
0	0
50	0.144
100	0.287
150	0.397
200	0.444
250	0.518
300	0.57
350	0.653



ภาพ 17 กราฟมาตรฐานสารละลาย Ovalbumin

ภาคผนวก ค

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวอัจฉรารัตน์ คล่องแคล้ว	
เกิดเมื่อ	4 พฤษภาคม 2534	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนศึกษานารีวิทยา จังหวัดกรุงเทพฯ
	พ.ศ. 2549	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนมัธยมวัดหนองแขม จังหวัดกรุงเทพฯ
	พ.ศ. 2552	ปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ. 2555	นักศึกษาอบรมฝึกงาน มหาวิทยาลัย Central Luzon State University ประเทศฟิลิปปินส์
ผลงานทาวิชาการ	พ.ศ. 2557	การนำเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุมระดับนานาชาติ ในงาน The Binnial Asian Association for Biology Education Conference ครั้งที่ 25 ประเทศมาเลเซีย เรื่อง Selection of low-cost culture medium for the production of bacterial protease for application in Para rubber manufacturing
	พ.ศ. 2557	การนำเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุมระดับนานาชาติ ในงาน The Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology and International Conference ครั้งที่ 26 มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เรื่อง Low cost process for protease production from *B. subtilis* to apply in Para rubber manufacturing