



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ

โดย นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และคณะ

14 เมษายน 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การคัดเลือกโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ

คณะผู้วิจัย

- | | |
|----------------------------|------------------------------------|
| 1. นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน | มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 2. นางสาวน้ำผึ้ง แดงไทย | มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 3. นางสาวนิอร โฉมศรี | สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง |

ชุดโครงการวิจัยแห่งชาติ : ยางพารา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

บทสรุปรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ การคัดเลือกโปรติเอสที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ
Selection of suitable proteases for protein degradation in rubber latex

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

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

นักศึกษา/ ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล ดร.นิอร โคมศรี
 หน่วยงาน สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา 200 หมู่ 17 ต.พิชัย อ.เมือง
 จ.ลำปาง 52000
 ชื่อ-สกุล นางสาวน้ำผึ้ง แดงไทย
 หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
 ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

งบประมาณทั้งโครงการ 100,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 9 เดือน ตั้งแต่วันที่ 14 กรกฎาคม 2552 ถึง 14 เมษายน 2553

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

ในกระบวนการผลิตถุงมือยางจะมีการกำจัดโปรตีนออกจากรubber latex ก่อน พบว่าวิธีที่มีประสิทธิภาพคือ การใช้สารเคมีร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส โดยโปรติเอสนี้สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดซึ่งก็มีประสิทธิภาพแตกต่างกันไป จึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยขึ้นนี้ที่จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยใช้โปรติเอสที่เตรียมจากสิ่งมีชีวิตหลายๆ

ชนิด แล้วตัดสินใจว่าโปรตีนจากแหล่งใดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการจัดโปรตีนออกจากริ่้นน้ำยางสด นอกจากนี้โปรตีนที่มีประสิทธิภาพดียังคาดว่าจะช่วยลดการใช้สารเคมีร่วมลงได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกแหล่งของโปรตีนที่เหมาะสมในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางสด

ผลการดำเนินงาน

หลังจากได้ดำเนินการตามแผนอันประกอบไปด้วย การรวบรวมตัวอย่างพืช สัตว์ และ จุลินทรีย์มาศึกษาหาแหล่งที่พบโปรตีน เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด ก่อนจะคัดเลือกมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีน อันประกอบไปด้วย (1) ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม (2) อุณหภูมิที่เหมาะสม (3) ปริมาณสาร SDS ที่เดิม และ (4) ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนในตัวอย่าง 6 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* (MR10) *A. oryzae* น้ำสับปะรด ขางมะละกอ เอนไซม์โปรตีนบริสุทธิ์จาก *Bacillus* spp. และผงหมักเนื้อสัตว์ที่ 1 จึงได้คัดเลือกแล้วนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าแม้บางตัวอย่างจะมีค่ากิจกรรมที่สูง แต่กลับมีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ต่ำ ซึ่งหมายถึงมีการปนเปื้อนโปรตีนชนิดอื่นอยู่สูง จึงอาจจะส่งผลกระทบต่อปริมาณโปรตีนในน้ำยางสดภายหลังการย่อยโปรตีนได้

หลังจากนำโปรตีนทั้ง 6 แหล่งมาทดสอบการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดแล้ว พบว่าโปรตีนจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) สามารถย่อยโปรตีนในน้ำยางสด จนกระทั่งตรวจพบปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในชั้นซีรัมถึง 25,575 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าโปรตีนจากแหล่งอื่นๆ อาจเนื่องมาจากเป็นกรดค่างของน้ำยางสดที่มีค่าประมาณ 6.8-7.5 เป็นช่วงที่เหมาะสมในการทำงานของโปรตีนจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ซึ่งเป็น alkaline protease จึงได้เลือกโปรตีนชนิดนี้สำหรับศึกษาต่อไป โดยได้ทำการศึกษหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด ผลการทดลองพบว่า ในขอบเขตที่ได้ทำการศึกษานี้ การเติมโปรตีนในปริมาณ 6 ยูนิตสามารถย่อยโปรตีนในน้ำยางได้มากที่สุดและสามารถวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในชั้นซีรัมเท่ากับ 15,100 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าการเติมปริมาณเอนไซม์ในระดับอื่นๆ อย่างไรก็ตามคาดว่าแม้จะเติมเอนไซม์มากขึ้น การย่อยโปรตีนในน้ำยางสดอาจจะไม่ได้เพิ่มขึ้นมากนักเพราะอัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับปริมาณสารตั้งต้นด้วย ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดคือที่ 45 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อุณหภูมิสูงจะช่วย

ให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่กรณีของปฏิกิริยาจากเอนไซม์นั้นมีข้อจำกัดที่ว่า เอนไซม์เป็นโปรตีน ซึ่งจะเสียสภาพเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิที่สูงเกินไป ดังนั้นที่ 55 องศาเซลเซียส อัตราการย่อยโปรตีนจึงลดลงไป ในขณะที่การศึกษาผลของการเติม Sodium dodecyl sulfate (SDS) ลงในน้ำยางสดเพื่อทำงานร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส พบว่าการเติม SDS ในปริมาณเล็กน้อยจะช่วยทำให้ย่อยโปรตีนในน้ำยางสดได้ดีกว่าการไม่เติม SDS แต่ไม่ต่างกันมากนัก อย่างไรก็ตามหากเติมในปริมาณที่สูงกลับทำให้เอนไซม์ทำงานได้ลดลง ซึ่งการเติม SDS ในปริมาณ 0.2% ร่วมกับการเติมเอนไซม์โปรติเอส จะให้ผลดีที่สุด ซึ่งใช้น้อยลงกว่าการรายงานก่อนหน้านี้ถึง 5 เท่า ทั้งนี้ SDS มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวจึงช่วยให้โปรตีนที่เกาะในส่วนหนึ่งของเนื้อยางสามารถละลายออกมาอยู่ในส่วนของซีรัมเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเติม SDS ในปริมาณมากเกินไปจะเกิดผลเสียเนื่องจาก SDS จะทำให้เอนไซม์เสียโครงรูปจนไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ SDS ยังเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงไม่ควรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับมนุษย์ และสุดท้ายนักวิจัยก็ได้พบว่าโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นมีประสิทธิภาพกำจัดโปรตีนได้ดีกว่าโปรติเอสไม่บริสุทธิ์ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรติเอสที่ไม่มีบริสุทธิ์มีสิ่งปนเปื้อนมาก อันมีผลต่อการทำงานของโปรติเอส

สรุปผลการวิจัย

โดยสรุปแล้ว พบว่าโปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (MR10) มีประสิทธิภาพกำจัดโปรตีนในน้ำยางสดดีที่สุดเหนือโปรติเอสแหล่งอื่นๆ โปรติเอสจากแหล่งนี้สามารถผลิตได้ง่าย ในเวลาอันสั้นและปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโปรติเอสจากพืชและสัตว์หรือแม้แต่เห็ดยิบจุลินทรีย์ชนิดอื่น โปรติเอสที่ได้นี้มีสถานะที่เหมาะสมในการทำงานย่อยโปรตีนในน้ำยางสด ได้แก่ การใช้ปริมาณ 6 unit/ น้ำยาง 20 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการเติมสาร SDS ในปริมาณ 0.2% และการใช้โปรติเอสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางสดได้ดีกว่าโปรติเอสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามการใช้โปรติเอสโดยปราศจากการเติม SDS ก็ให้ผลเป็นที่น่าพอใจเช่นกัน เนื่องจากโปรติเอสชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูง จึงคาดว่าน่าจะมีศักยภาพนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ได้ แต่อาจทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากค่าใช้จ่ายในการเตรียมโปรติเอส

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

แม้ว่าโปรตีนจาก *B. subtilis* (MR10) จากงานวิจัยนี้จะมีประสิทธิภาพกำจัดโปรตีนในน้ำอย่างสถิติเพียงใด โปรตีนที่ผลิตขึ้นมานี้ก็มีข้อจำกัด คือโปรตีนจะย่อยโปรตีนทุกชนิดรวมถึงโมเลกุลของโปรตีนเอง ทำให้เก็บรักษาไว้ไม่ได้นาน ต้องเตรียมใหม่อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหากจะพัฒนาใช้โปรตีนดังกล่าวนี้ในอุตสาหกรรมอาหาร จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในการเตรียมโปรตีนในรูปแบบที่สะดวกใช้งาน และมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น เช่น รูปแบบผงหรือของเหลวเข้มข้น เป็นต้น ก็จะสร้างความสะดวกต่อการใช้งานในกระบวนการผลิตได้

ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิจัยระดับชาติหัวข้อ “การเตรียมน้ำยางโปรตีนดำโดยใช้โปรตีนจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (MR10)” แต่อย่างไรก็ตาม เนื้อหายังไม่สมบูรณ์นักเพราะยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของน้ำยางก่อนและหลังการย่อยด้วยโปรตีน ดังนั้นจะเป็นการดีเป็นอย่างยิ่ง หากจะมีโอกาสได้วิเคราะห์คุณสมบัติของยางโปรตีนดำเพิ่มเติม

บทคัดย่อ

โปรตีนบางชนิดในน้ำยางสดสามารถก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ในมนุษย์ได้หากมีการสัมผัส ทำให้ในกระบวนการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ต้องมีการกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปเสียก่อน เดิมจะใช้วิธีปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดโปรตีนทิ้ง แต่โปรตีนที่ยึดเกาะกับเนื้อยางจะไม่สามารถถูกกำจัดทิ้งไปโดยวิธีนี้ ดังนั้นจึงได้มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยโปรตีนเหล่านี้แทนการปั่นเหวี่ยง งานวิจัยฉบับนี้จึงได้ดำเนินการคัดเลือกโปรติเอสที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด และหาสถานะที่เหมาะสมในการทำงานของโปรติเอส โดยโปรติเอสจากหอยเชอร์รี่ ผลมะเดื่อ น้ำสับปะรด ยางมะละกอ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (MR10) เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เชื้อรา *Aspergillus oryzae* พงษ์ภักดิ์ 2 ยีสต์ และโปรติเอสบริสุทธิ์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ถูกนำมาทดสอบ ผลการทดลองพบว่า โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ซึ่งมีค่า Specific activity 193.07 unit/ mg protein สามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางสดได้ดีที่สุด และจากการหาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยใช้โปรติเอสจาก *B. subtilis* (MR10) พบว่าสถานะที่เหมาะสมได้แก่ การใช้โปรติเอส 6 unit/ น้ำยาง 20 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางสดได้ดีกว่าโปรติเอสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วยลดการใช้สาร SDS ลงได้ถึง 5 เท่า แต่อย่างไรก็ตามโปรติเอสที่ผลิตได้นี้มีอายุการเก็บรักษาค่อนข้างสั้น ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมในการเตรียมโปรติเอสให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานขึ้น และใช้งานได้สะดวกในระดับอุตสาหกรรม

Abstract

Some proteins containing in natural rubber latex are allergen for human who contact with them. Consequently, these allergenic proteins have to be eliminated in the process of medical grove production. Original method is a centrifugation to remove protein. However, proteins that are attached to rubber particle cannot be effectively removed. Therefore, protein elimination using proteases enzyme is alternatively used. This work was subsequently conducted to select the suitable protease for protein degradation in natural rubber latex. Proteases from golden apple snail, fig, pineapple juice, papaya latex, *Bacillus subtilis* (MR10), *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus oryzae*, meat tenderizer (2 brands) and commercial purified protease from *Bacillus* spp. were studied for the degradation of protein in natural rubber latex. It was found that protease from *B. subtilis* (MR10) that had the specific activity at 193.07 Unit/ mg of protein showed the best protein degradation activity. Moreover, the optimization for protein degradation of natural rubber latex was studied. It was investigated that the optimal conditions were addition of 6 Unit of protease per 20 ml of latex and incubating temperature at 45 °C. The partial purified protease showed higher protein degradation activity than crude protease. It was also found that SDS usage was 5 folds decreasing. However, shelf life of protease from this study was short, thus the process to prepare protease with higher stability and convenient application in industrial scale should be further studied.

ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากยางธรรมชาติในหลายๆ รูปแบบ ซึ่งการแปรรูปน้ำยางขึ้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสกับผิวหนังมนุษย์ เช่น ถุงมือยางและถุงยางอนามัย ก็เป็นอีกหนึ่งอัตรประโยชน์ พบว่าในปี พ.ศ. 2549 ประเทศไทยมีการใช้น้ำยางเพื่อการนี้รวมกันมากถึง 52,522 ตัน (ข้อมูลจากสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร: www.rubberthai.com) แต่เนื่องจากน้ำยางสดมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ แม้จะมีเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ก็มีโปรตีนบางชนิดที่ก่อให้เกิดอาการแพ้แก่ผู้สวมใส่ได้ เช่น เกิดอาการคัน เป็นตุ่ม ประเด็นนี้เป็นที่ทราบกันอย่างกว้างแล้วและความรุนแรงของอาการจะขึ้นอยู่กับแต่ละบุคคล ดังนั้นในกระบวนการผลิตจึงได้มีการกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยางสดโดยอาศัยสารเคมีร่วมกับเอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้เพื่อการนี้คือ โปรติเอส เช่น ปาเปน (papain) จากมะละกอ โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด แต่แท้ที่จริงแล้วโปรติเอสสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายๆ กลุ่มทั้งสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งโปรติเอสจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ ต่างก็มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนที่แตกต่างกันไปอีก งานวิจัยหลายๆ ชิ้นมักจะศึกษาการใช้เอนไซม์จากพืชหรือไม่ก็จากจุลินทรีย์เพียงอย่างเดียวอย่างใดอย่างหนึ่ง จึงเป็นที่มาของโครงการวิจัยชิ้นนี้ที่จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยใช้โปรติเอสที่เตรียมจากสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด แล้วตัดสินใจว่าโปรติเอสจากแหล่งใดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยางสดและมีความน่าสนใจเชิงพาณิชย์ทั้งในแง่ปริมาณที่ผลิตได้ (yield) และความสะดวกในการเตรียมเอนไซม์ให้อยู่ในรูปพร้อมใช้งาน นอกจากนี้โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพดียังจะช่วยลดการใช้สารเคมีในกระบวนการย่อยโปรตีนลงได้อีกด้วย

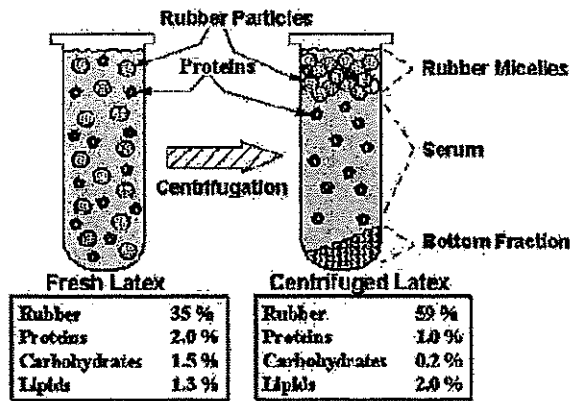
วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกแหล่งของโปรติเอสที่ดีที่สุดในกำจัดโปรตีนในน้ำยางสด

ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลวิชาการยางพาราจากสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ได้แสดงให้เห็นว่าปัจจุบันประเทศไทยมีมูลค่าการผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์ถุงมือยางและถุงยางอนามัยไปยังต่างประเทศรวมกันกว่า 29,083 ล้านบาทในปี 2549 และถุงมือยางทางการแพทย์ก็เป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์หลัก โดยประเทศไทยได้ผลิตถุงมือยางใช้ในทางการแพทย์แบบต่างๆ เช่น ถุงมือสำหรับตรวจโรค (Examination glove) ถุงมือผ่าตัด (surgical glove) และถุงมือสำหรับงานทันตกรรม (dental glove) (นุชนาฏ และ วราภรณ์, 2539) แต่อย่างไรก็ตามกลับพบว่าผู้ใช้หลายรายมีปัญหากการแพ้ต่อโปรตีนในน้ำยางเกิดขึ้น ซึ่งมีทั้งการแพ้แบบเฉียบพลันหรือค่อยเป็นค่อยไป (ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์, 2540) อาการที่เกิดขึ้นมีตั้งแต่อาการระคายเคืองเมื่อสวมใส่ถุงมือ (irritant contact dermatitis) ไปจนถึงอาการที่เรียกว่า anaphylaxis ซึ่งมีความรุนแรงมาก (Sussman *et al.*, 2002)

Sakdapipanich (2007) รายงานว่าน้ำยางธรรมชาติ (natural rubber) มีส่วนประกอบที่ไม่ใช่เนื้อยางประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนนี้แบ่งออกได้เป็นโปรตีน ไขมัน น้ำตาล และเถ้า ในส่วนของโปรตีนนั้นพบว่ามีสัดส่วนประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำยางธรรมชาติ โปรตีนและเปปไทด์ที่พบในน้ำยางธรรมชาติมีกว่า 240 ชนิด (Sussman *et al.*, 2002) ซึ่งกระจายอยู่ทั้งในส่วนของยาง (rubber phase) และส่วนของชั้นซีรัม (serum phase) ดังแสดงในภาพที่ 1 โปรตีนที่สำคัญได้แก่ alpha-globulin, hevein, hevamine และ REF (นุชนาฏ และ วราภรณ์, 2539) โปรตีนบางชนิดจัดเป็นสารก่อภูมิแพ้ (allergen) ทั้งนี้มีชนิดของโปรตีนประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์จากทั้งหมดที่สามารถจับกับแอนติบอดีชนิด IgE ที่อยู่ในซีรัมของมนุษย์ และพบว่าอีกประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์สามารถจับได้กับ IgG (Sussman *et al.*, 2002) โปรตีนที่ทำให้เกิดอาการแพ้มีด้วยกันหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 โปรตีนก่อภูมิแพ้เหล่านี้จะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นในขั้นตอนการทำน้ำยางขึ้นสำหรับกระบวนการผลิตถุงมือยาง และโปรตีนก่อภูมิแพ้จะกระจายอยู่ทั่วไปบนพื้นผิวของถุงมือหลังจากกระบวนการทำแห้งและ heat vulcanization (นุชนาฏ และ วราภรณ์, 2539; Perraella and Gaspari, 2002) แม้จะใช้การล้างด้วยน้ำเปล่าแต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปได้หมดเสียทีเดียว แต่ก็มีรายงานว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำยางธรรมชาติสามารถถูกทำลายได้โดยการปรับสภาวะให้เป็นด่างแก่ เช่นการเติมแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำยางจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณสมบัติกายภาพของน้ำยางได้ (Moris and Lakin, 1995 อ้างโดย Perraella and Gaspari, 2002)



ภาพที่ 1 การกระจายตัวของโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติและน้ำยางธรรมชาติที่ผ่านการเหวี่ยง
ที่มา: Perrella and Gaspari, 2002.

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

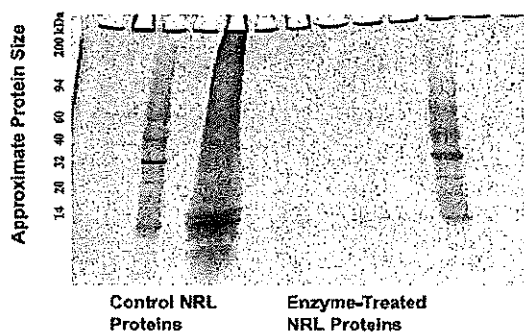
IUIS code	ชื่อ	Molecular mass (kDa)	แหล่งที่พบ
Hev b 1	Rubber elongation factor (REF)	14.6, 58	อนุภาคยาง
Hev b 2	Beta-1,3-glucanase	34-36	B-serum
Heb b 3	Small rubber particle protein (SRPP)	22-23	อนุภาคยาง
Heb b 4	Microhelix, cyanogenic glucosidase	50-57	B-serum
Heb b 5	Acidic protein	16	C-serum
Heb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

ที่มา: Yeang *et al.*, 2002.

จากข้อมูลที่ว่าโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติจะพบในส่วนของ serum phase 75 เปอร์เซ็นต์ และพบในส่วนของ rubber phase 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในส่วนนี้จะเกาะอยู่กับพื้นผิวของอนุภาคยาง (rubber particle) ดังนั้นแม้จะทำการเหวี่ยงเพื่อกำจัดโปรตีนออกไปแต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนส่วนที่เกาะกับอนุภาคยางออกไปได้ ซึ่งยังทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำยางชั้นเพิ่มขึ้นจาก 25 เปอร์เซ็นต์เป็น 50 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย (Perrella and Gaspari, 2002) จึงได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteases) เข้าช่วยในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางเนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งในส่วน serum และ rubber phase โดยโปรติเอสที่ได้รับความนิยมนำมาใช้นั้น ยกตัวอย่างเช่น ปาเปน (papain) จากมะละกอ โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด (พรรษา และ กฤษณา, 2543) โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR25 รวมทั้งการใช้โปรติเอสที่มีการผลิตในทางการค้าจากบริษัทต่างประเทศ เช่น บริษัท KaO เป็นต้น (Klinklai *et al.*, 2003; Sakaki *et al.*, 1995 อ้างโดย ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์, 2540) นอกจากนี้จากการทดลองจะพบว่าการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ร่วมลงไปด้วยทั้งที่ SDS จัดว่าเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ คาดว่าน่าจะเพื่อเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนด้วย เพราะ SDS มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) (บุษนาฏ และ วรารัตน์, 2539) บางรายงานก็พบว่าเป็นการเติมผงซักฟอกลงไป (พรรษา และ กฤษณา, 2543)

จากการวิจัยของ ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์ (2540) พบว่าหลังจากทำการเติมน้ำยางธรรมชาติด้วยเอนไซม์ Alcalase ซึ่งเป็นโปรติเอสชนิดหนึ่งร่วมกับการเติม SDS จากนั้นทำการเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 6,000-12,000 rpm 3 ครั้ง จะพบว่าสามารถลดสารประกอบ N (โปรตีน) ในน้ำยางธรรมชาติลงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Perrella และ Gaspari (2002) รายงานว่า น้ำยางที่บ่มด้วยเอนไซม์ alkaline protease 1-2 วัน แล้วจากนั้นนำมาวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE จะพบว่าโปรตีนที่ปรกติมีอยู่ในน้ำยางจะหายไป ดังแสดงในภาพที่ 2 ทำให้ลดสารก่อภูมิแพ้ในผลิตภัณฑ์ถุงมือยางได้ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าน้ำยางธรรมชาติที่ผ่านกระบวนการย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์นี้มีความเหมาะสมที่จะใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ยางที่สัมผัสกับผิวหนังมนุษย์ได้เป็นอย่างดี เช่นถุงมือทางการแพทย์ และถุงยางอนามัย เป็นต้น ส่วนอีกหนึ่งวิธีที่ช่วยลดปัญหาการแพ้ถุงมือยางได้แต่เป็นเพียงการแก้ที่ปลายเหตุคือการใช้ผงแป้งเคลือบที่ผิวถุงมือยางก็จะช่วยลดอาการแพ้ของผู้ใช้อันเนื่องมาจากโปรตีนก่อภูมิแพ้และสารเคมีร่วมในการผลิต ทั้งยังป้องกันการติดกันของผิวถุงมือยางด้วย (Truscott, 2002) อย่างไรก็ตามแม้จะสามารถกำจัดโปรตีนที่ก่อภูมิแพ้ได้แล้วนั้น คุณภาพของน้ำยางหลังการย่อยโปรตีนก็ควรให้ความสำคัญเช่นกัน เพราะคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ยางจะขึ้นกับองค์ประกอบในน้ำยางด้วยดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว แต่ก็มีรายงานรับรองแล้วเช่นกันว่า ถุงมือยางที่ผลิตจากน้ำยางที่ผ่านการย่อยโปรตีนหรือที่เรียกว่า deproteinized natural

rubber (DPNR) ยังมีคุณสมบัติสูงกว่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์ยางที่กำหนดไว้ ทั้งในเรื่องของค่าความต้านทานต่อแรงดึงและการฉีกขาด (tensile strength and elongation at break) ความทนต่ออากาศร้อน (heat aging) และการเกิดรูร้าว (Perrella and Gaspari, 2002)



ภาพที่ 2 โปรตีนที่พบในน้ำยางที่ไม่ถูกย่อยโดยโปรติเอส (ซ้าย) และที่ถูกย่อยโดยโปรติเอส (ขวา) :
หมายเหตุ-Lane ซ้ายและขวาสุดคือโปรตีนมาตรฐาน (protein marker)
ที่มา: Perrella and Gaspari, 2002.

ที่ได้รวบรวมเอกสารสรุปมาทั้งหมดข้างต้นนี้ เพื่อแสดงให้เห็นว่าปัญหาที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมการผลิตยางมียางและยางขางอนามัยคืออะไร เกิดจากอะไร และปัจจุบันมีการแก้ปัญหาอย่างไร ซึ่งก็คือการใช้เอนไซม์โปรติเอสเข้าช่วยนั่นเอง แต่อย่างไรก็ตาม โปรติเอสก็ผลิตได้มาจากหลายๆ แหล่ง ซึ่งโปรติเอสจากแต่ละแหล่งก็จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไปทั้งในแง่ประสิทธิภาพในการทำงาน กระบวนการผลิต และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต จึงอาจจะมีโปรติเอสชนิดอื่นที่มีศักยภาพสูงกว่าโปรติเอสที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งปกติมักใช้โปรติเอสจากพืช เช่น มะละกอและตับเป็ด แต่ใช้ระยะเวลาการผลิตค่อนข้างนานเนื่องจากอาศัยเวลาในการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับโปรติเอสจากผลไม้ที่มีรายงานว่าพบเช่นกัน (Cormier *et al.*, 1989; Devaraj *et al.*, 2008) แต่ไม่ได้มีการผลิตในเชิงการค้าซึ่งอาจมาจากเหตุผลในในเรื่องระยะเวลาการเพาะปลูกเช่นกัน จึงหันมามองที่โปรติเอสจากจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ แทน ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียและเชื้อราซึ่งสามารถผลิตโปรติเอสที่มีความจำเพาะ (substrate specificity) ก่อนข้างสูงอยู่แล้ว (Frankena *et al.*, 1985; Chu, 2007; Macchione *et al.*, 2008; Baumann and Bisping, 1995) รวมทั้งใช้เวลาในการเจริญเติบโตเพียง 1-7 วันเท่านั้น จึงน่าจะมีศักยภาพในการผลิตในเชิงพาณิชย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีสิ่งมีชีวิตอีกกลุ่มคือสัตว์จำพวกหอย แม้ว่าจะมีข้อเสียในแง่ต้องใช้เวลาในการเจริญเติบโตค่อนข้างนานเหมือนพืช แต่หากเป็นการใช้หอยที่เป็นศัตรูพืชและพบในไร่นาทัวไปแล้ว ก็นับได้ว่าเป็นแหล่งโปรติเอสที่น่าสนใจนำมาศึกษาทีเดียว จึงจะได้มีการผลิตโปรติเอสจากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้แล้วนำมาเปรียบเทียบ

ประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางธรรมชาติเทียบกับโปรตีนในทางการค้าเพื่อหาโปรตีน
เอสชนิดใหม่ที่มีศักยภาพมากกว่าโปรตีนชนิดเดิม

วิธีการทดลอง

(1) เตรียมเอนไซม์จากตัวอย่างแต่ละชนิด

หอยเชอรี่และผลมะเดื่อ

ผสมตัวอย่างและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M และมีอุณหภูมิ
ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1:1(w/v) ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหาร จากนั้นนำมา
กรองผ่านผ้าขาวบาง และกำจัดตะกอนโดยการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm สารละลายส่วนใส
(supernatant) ที่ได้ให้เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอศึกษาต่อไป

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (MR10)

ทำการถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว enrichment medium เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว
รอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งที่
ประกอบไปด้วยกากถั่วเหลือง 1.5 กรัมและน้ำกลั่น 3 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น
เวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 อุณหภูมิประมาณ
4 องศาเซลเซียส โดยผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เหวี่ยง
แยกตะกอนขนาดเล็กทิ้งไปที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4
องศาเซลเซียสเพื่อรอศึกษาต่อไป

เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* และ *Aspergillus oryzae*

ทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วยกากถั่วเหลืองและน้ำกลั่นในอัตราส่วน
1.5 กรัม : 3 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดเอนไซม์
ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0 อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส โดย
ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เหวี่ยงแยกตะกอนขนาดเล็ก
ทิ้งไปที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอ
ศึกษาต่อไป

ผงหมักเนื้อยีส์ข้อที่ 1 และ ผงหมักเนื้อยีส์ข้อที่ 2

ละลายผงหมักเนื้อในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M ในอัตราส่วน 1 กรัม : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 25 ml อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอศึกษาต่อไป

เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. (SIGMA[®])

ละลายผงเอนไซม์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ความเข้มข้น 0.1 M ในอัตราส่วน 0.05 กรัม : สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 5 ml อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอศึกษาต่อไป

น้ำสับประรด

ใช้สับประรดสายพันธุ์นางแลมีขนาดน้ำหนักของลูกประมาณ 1 กิโลกรัม มาคั้นน้ำแล้วกรองด้วยผ้าขาวบางเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอศึกษาต่อไป

ยางมะละกอ

ใช้มะละกอแขกดำที่ยังมีหัวขั้วอยู่ โดยทำการฝานบางๆ บริเวณหัวขั้วให้น้ำยางไหลออกมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอศึกษาต่อไป

(2) การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและปริมาณโปรตีน

การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Chantawannakul และคณะ (2002) โดยใช้ Casein from bovine milk เป็นสับสเตรท มีวิธีการดังนี้

เตรียมสารละลายผสม 4 หลอดได้แก่

หลอดที่ 1 (ES): สารละลายเอนไซม์ 1 ml + สารละลาย 1% Casein from bovine milk 1 ml

หลอดที่ 2 (EB): สารละลายเอนไซม์ 1 ml + 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 1 ml

หลอดที่ 3 (SB) : สารละลาย 1% Casein from bovine milk 1 ml + 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 1 ml

หลอดที่ 4 (BB): 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 2 ml

นำสารแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 8,000 rpm

10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสุมา 0.5 ml รวมกับ 0.4 M Na_2CO_3 2.5 ml และ Folin – Ciocalteu phenol reagent 0.5 ml ทิ้งไว้ 30 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงสุทธิ (ΔA_{660} ; $\Delta A_{660} = \text{ES-EB-SB-BB}$) ไปคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Tyrosine ที่เตรียมไว้แล้ว ทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

นิยาม 1 ยูนิต ของเอนไซม์โปรติเอส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย tyrosine ออกมา 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่วิเคราะห์

ส่วนการวัดปริมาณ โปรตีนในสารละลายเอนไซม์จะใช้วิธี Lowry's method (Wongputtisiri, 2008) หลังจากนั้นก็คำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) จาก

$$\text{Specific activity (unit/ mg protein)} = \frac{\text{protease activity (unit / ml)}}{\text{Protein concentration (mg / ml)}}$$

(3) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดด้วยโปรติเอสแต่ละชนิด

เลือกตัวอย่างที่พบว่ามีกิจกรรมของโปรติเอสมาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด วิธีการมีดังต่อไปนี้ น้ำยางเจือจางถูกเตรียมขึ้นโดยผสมกับน้ำในสัดส่วนน้ำยาง 20 ml และน้ำกลั่น 80 ml จากนั้นเติมเอนไซม์ 1 ยูนิต ลงไป แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายชั้นซั้วร้อมออกมาวัดปริมาณ โปรตีน โดยใช้วิธี Modified Lowry's method (พร้อมศักดิ์, 2550) จากนั้นคัดเลือกโปรติเอสจากแหล่งที่ทำให้มีปริมาณโปรตีนละลายอยู่ในชั้นซั้วร้อมมากที่สุดมาศึกษาขั้นต่อไป แต่ละทริตเมนต์ทำ 3 ซั้ว

(4) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยโปรติเอสที่คัดเลือกได้

4.1 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

ในการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ทริตเมนต์ แต่ละทริตเมนต์ประกอบไปด้วยน้ำยางเจือจาง 100 ml และเอนไซม์ดังต่อไปนี้ Trt 1 : 0 ยูนิต, Trt 2 : 1 ยูนิต, Trt 3 : 2 ยูนิต, Trt 4 : 4 ยูนิต, Trt 5 : 6 ยูนิต แต่ละทริตเมนต์จะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm

เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดก็จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คัดสารละลายชั้นซีรัมออกมาวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Modified Lowry's method แต่ละทริตเมนต์ทำ 3 ซ้ำ

4.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่มที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

ในการทดลองจะทำการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด ในการทดลองแบ่งออกเป็น 4 ทริตเมนต์ โดยใช้สภาวะที่ได้จาก (4.1) ซึ่งสามารถแบ่งทริตเมนต์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ Trt 1: อุณหภูมิห้อง, Trt 2 : 37 องศาเซลเซียส, Trt 3 : 45 องศาเซลเซียส, Trt 4 : 55 องศาเซลเซียส แต่ละทริตเมนต์จะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดก็จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คัดสารละลายชั้นซีรัมออกมาวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Modified Lowry's method แล้วเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางได้ดีที่สุดสำหรับใช้ศึกษาขั้นตอนต่อไป แต่ละทริตเมนต์ทำ 3 ซ้ำ

4.3 ผลของการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

ทำการศึกษาการเติม sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยใช้สภาวะที่ได้จากการทดลอง 4.1 และ 4.2 ในการทดลองแบ่งออกเป็น 6 ทริตเมนต์ ซึ่งจะแบ่งออกเป็นทริตเมนต์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ Trt 1: 0 %, Trt 2 : 0.2 %, Trt 3 : 0.4%, Trt 4 : 0.6 %, Trt 5 : 0.8 % และ Trt 6 : 1.0% แต่ละทริตเมนต์จะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดก็จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คัดสารละลายชั้นซีรัมออกมาวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Modified Lowry's method จากนั้นสรุปปริมาณ SDS ที่เหมาะสมในการใช้ร่วมกำจัดโปรตีนในน้ำยางสด ซึ่งแต่ละทริตเมนต์ทำ 3 ซ้ำ

4.4 ผลของความบริสุทธิ์ของโปรตีนต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

ทำการเตรียมให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 438 กรัม (80 % saturation) อย่างช้าๆ ลงใน crude enzyme 730 ml คัดสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมงด้วย magnetic stirrer แล้วนำไปเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นาน 30 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายกลับในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05M pH 7.0 จากนั้นนำไปใส่ในถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 mm ที่มี molecular weight cut-off 12 kDa แล้วแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 6 ชั่วโมง ก็จะได้โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purified protease)

ในการทดลองจะทำการศึกษาความบริสุทธิ์ของโปรตีนต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด โดยในการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ทริตเมนต์ ใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 ซึ่งสามารถแบ่งทริตเมนต์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ Trt 1: ไม่เติมเอนไซม์ (control), Trt 2: เอนไซม์โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน และ Trt 3: เอนไซม์โปรตีนไม่บริสุทธิ์ แต่ละทริตเมนต์จะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดก็จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายชั้นซีรัมออกมาวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Modified Lowry's method ทุกทริตเมนต์ทำ 3 ซ้ำ

(1) กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่างที่ศึกษา

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จากตัวอย่างหลายๆ ชนิดทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ รวมทั้งสิ้น 10 ชนิด เพื่อนำไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด เบื้องต้นพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในตัวอย่าง 6 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* (MR10), *A. oryzae*, น้ำสับปะรด, ยางมะละกอ, เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* spp. (SIGMA®) และ ผงหมักเนื้อยี่ห้อที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 2 จึงได้คัดเลือกนำไปใช้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงผลกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ของตัวอย่างแต่ละชนิด

แหล่งเอนไซม์	Protease activity	Specific activity (Unit/mg protein)
หอยเชอร์รี่	ไม่พบ	ไม่พบ
มะเดื่อ	ไม่พบ	ไม่พบ
<i>B. subtilis</i> (MR10)	204.3 Unit/g substrate	193.1
<i>R. oligosporus</i>	ไม่พบ	ไม่พบ
<i>A. oryzae</i>	157.7 Unit/g substrate	69.1
น้ำสับปะรด	739 Unit/ ml juice	84.5
ยางมะละกอ	2,745 Unit/ml latex	80.2
เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> spp.(SIGMA®)	19,100 Unit/g	33
ผงหมักเนื้อยี่ห้อที่ 1	5 Unit/g	0.4
ผงหมักเนื้อยี่ห้อที่ 2	ไม่พบ	ไม่พบ

(2) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดด้วยโปรติเอสแต่ละชนิด

ทำการศึกษาผลของการใช้เอนไซม์โปรติเอส จากแหล่งที่คัดเลือกได้ในการทดลองก่อนหน้านี้มาทำการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด โดยประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดสามารถวัดได้จากปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในชั้นซีรัม พบว่าโปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) สามารถย่อยโปรตีนในน้ำยางสด จนกระทั่งตรวจพบปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในชั้นซีรัมถึง 25,575 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าโปรติเอสจากแหล่งอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 จึงได้เลือกใช้โปรติเอสจากแบคทีเรียชนิดนี้มาใช้ในการทดลองและศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานต่อไป

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ที่อยู่ในชั้นซีรัมของน้ำยางสดหลังจากย่อยด้วยโปรติเอสแต่ละแหล่ง

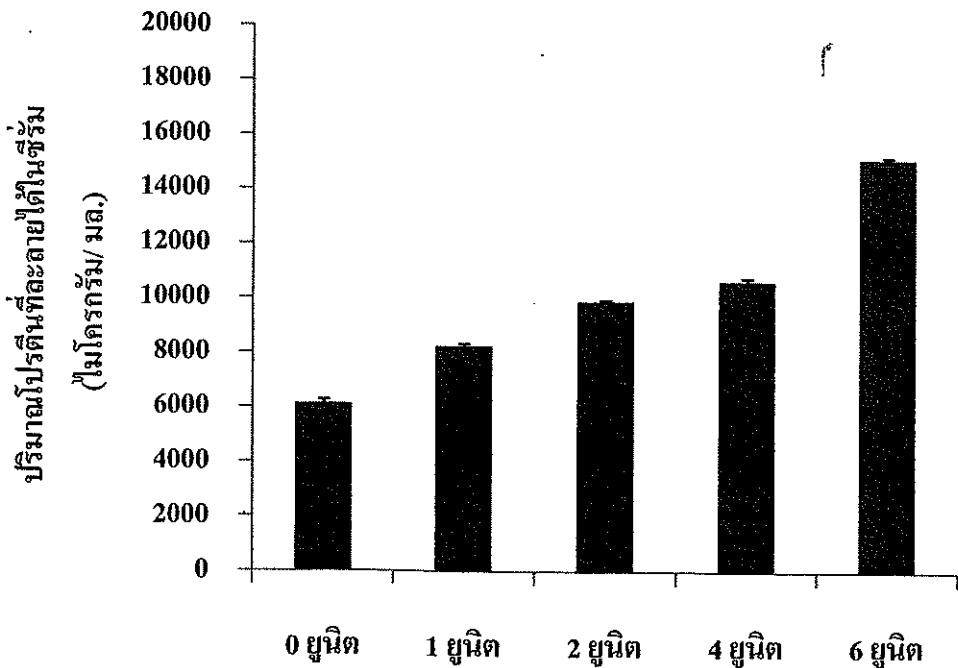
ทรีตเมนต์	ปริมาณโปรตีนในชั้นซีรัม($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ SD
ไม่เติมโปรติเอส (control)	11,400 $\pm$ 160.7
<i>A. oryzae</i>	24,750 $\pm$ 208.2
<i>B. subtilis</i> (MR10)	25,575 $\pm$ 229.1
ยางมะละกอ	ND
น้ำสับปะรด	13,500 $\pm$ 104.1
เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> spp.	12,012 $\pm$ 50.0

หมายเหตุ : ND (Not detected) คือ ไม่สามารถตรวจวัดได้

(3) การหาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยใช้โปรติเอสที่คัดเลือกได้

3.1 ผลของปริมาณเอนไซม์ที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

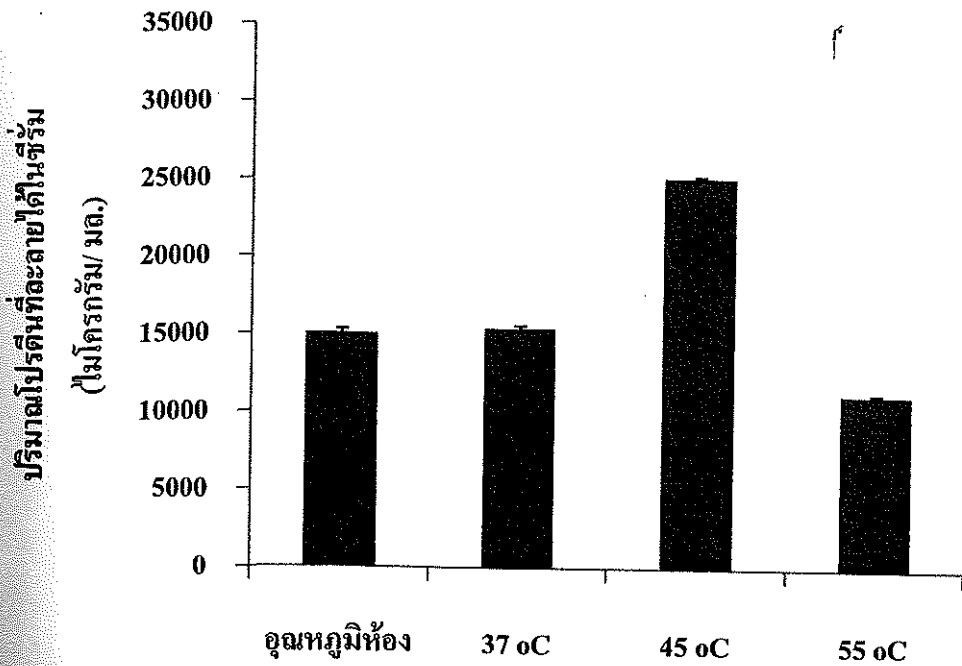
จากผลการทดลองข้างต้นสามารถทราบว่าแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดที่ดีที่สุดคือ เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ซึ่งในการทดลองขั้นนี้จะศึกษาปริมาณเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ที่เติมลงในน้ำยางสด ปริมาณเท่าใดจึงจะมีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดที่ดีที่สุด พบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ 6 ยูนิตสามารถย่อยโปรตีนในน้ำยางได้มากที่สุดและสามารถวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในชั้นซีรัมเท่ากับ 15,100 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งมากกว่าการเติมปริมาณเอนไซม์ในระดับอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงค่าปริมาณ โปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ที่อยู่ในชั้นซีรัมจากการเติมปริมาณเอนไซม์ในระดับต่างๆ

3.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่มที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

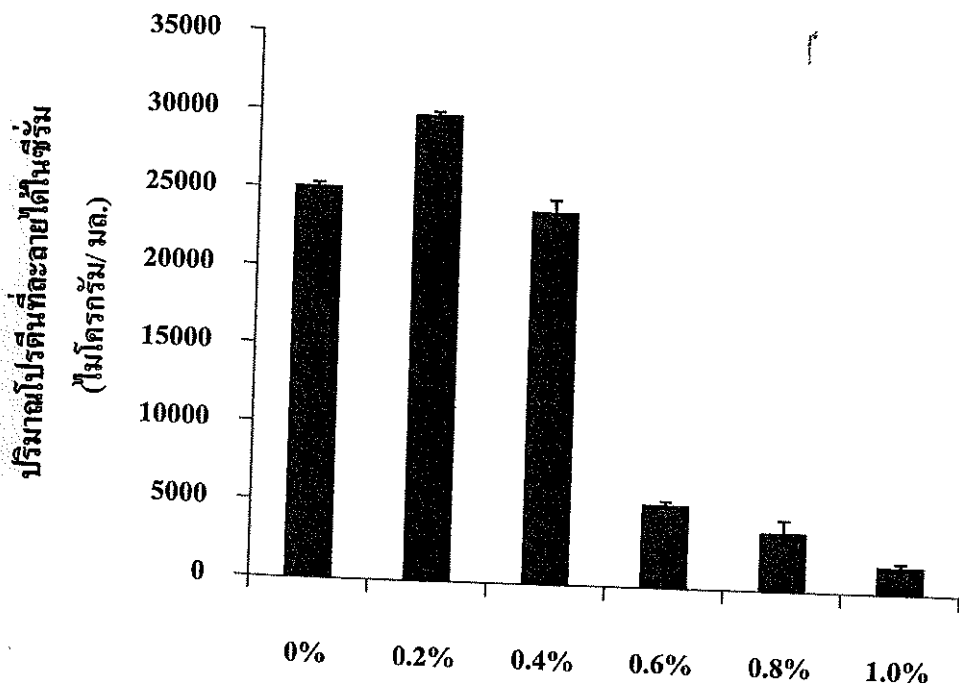
จากผลการทดลอง พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนโดยโปรติเอสจะเพิ่มขึ้น แต่จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าระดับที่เหมาะสม โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดคือ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้ได้โปรตีนละลายในชั้นซีรัม 25,112 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงค่าปริมาณ โปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ที่อยู่ในชั้นซีรัมจากการใช้อุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกัน

3.3 ผลของการเติม Sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่มีต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

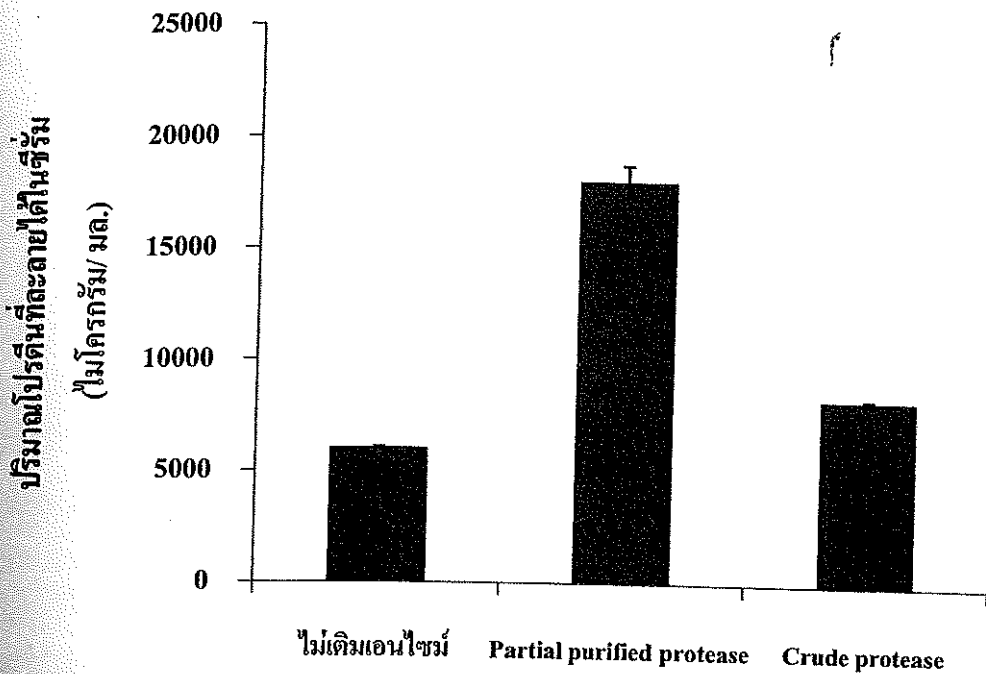
จากผลการทดลองในการศึกษาผลของการเติม Sodium dodecyl sulfate (SDS) เพื่อทำงานร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด พบว่าการเติม Sodium dodecyl sulfate (SDS) ในปริมาณเล็กน้อยจะช่วยให้ย่อยโปรตีนในน้ำยางสดได้ดีขึ้น แต่หากเติมในปริมาณที่สูงกลับทำให้เอนไซม์ทำงานได้ลดลงดังแสดงผลในภาพที่ 5 ซึ่งพบว่าการเติม SDS ในปริมาณ 0.2% ร่วมกับการเติมเอนไซม์โปรติเอส จะช่วยให้มีโปรตีนละลายอยู่ในชั้นซีรัมได้สูงสุดที่ 29,797 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 5 แสดงค่าปริมาณ โปรตีนที่ละลายได้ (Soluble protein) ที่อยู่ในชั้นซีรัม จากการทำงานร่วมกันของ โปรติเอสและ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ในปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

3.4 ผลของความบริสุทธิ์ของโปรติเอสต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด

ในการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้น ได้ทำการผลิตโปรติเอสโดยเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยสามารถผลิตได้ทั้งสิ้น 283,140 ยูนิต แต่เมื่อผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว พบว่าเหลือเอนไซม์เพียง 65,866.8 ยูนิต แต่ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 8.69 เท่า นั่นคือโปรตีนปนเปื้อนลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4 เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purified protease) ที่เตรียมได้นี้ จะถูกนำไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดต่อไป และเมื่อนำโปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วนนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ก็พบว่าสามารถทำงานได้ดีกว่าการใช้โปรติเอสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้สามารถวัดโปรตีนที่ละลายได้สูงถึง 18,050 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผ่านและไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 4 แสดงผลได้ (yield) จากการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน

Protease	Units	Protein (mg)	Specific activity	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude protease	283,140.0	2238.6	126.5	1.00	100
partial purified protease	65,866.8	59.93	1099.1	8.69	23.26

วิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์โปรตีนเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เพราะเกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนก่อนการดูดซึมไปใช้ประโยชน์ต่อไป อย่างไรก็ตามปริมาณที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดก็แตกต่างกันออกไป ดังที่พบในผลการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าแม้บางตัวอย่างจะมีค่ากิจกรรมของโปรตีนเอสที่สูง แต่กลับมีค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ต่ำ ซึ่งหมายถึงมีการปนเปื้อนโปรตีนชนิดอื่นอยู่สูง ดังนั้นจึงอาจจะส่งผลต่อปริมาณโปรตีนในน้ำยางสดภายหลังการย่อยโปรตีนได้ ข้อสังเกตอีกประการคือพบว่า โปรตีนเอสจากจุลินทรีย์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าโปรตีนเอสจากพืชและสัตว์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนเอสจากจุลินทรีย์เป็นเอนไซม์ประเภท extracellular enzyme นั้นคือถูกผลิตแล้วถูกส่งออกมานอกเซลล์ กระบวนการเก็บเกี่ยวโปรตีนจึงไม่จำเป็นต้องมีการทำให้เซลล์แตก จึงมีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อนออกมาน้อยลง ในขณะที่การเก็บเกี่ยวโปรตีนจากสัตว์และพืชนั้นจะรุนแรงจนกระทั่งเซลล์แตก นอกจากนี้ข้อดีอีกประการของการใช้โปรตีนเอสจากจุลินทรีย์คือใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้น วัตถุดิบในการเพาะเลี้ยงราคาถูกและยังให้ผลผลิตสูงกว่าโปรตีนเอสจากพืชและสัตว์ด้วย

โปรตีนเอสมีหลายชนิดขึ้นกับแหล่งที่มา ซึ่งก็จะมีคุณสมบัติและลักษณะการทำงานแตกต่างกันไป ดังนั้นหากจะเลือกโปรตีนเอสสำหรับใช้งานในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสด ต้องคำนึงถึงว่าสถานะต่างๆ ในน้ำยางสดเหมาะสมกับการทำงานของโปรตีนเอสที่เลือกหรือไม่ ซึ่งจากผลการทดลองก็พบว่าโปรตีนเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* (MR10) มีประสิทธิภาพย่อยโปรตีนในน้ำยางสดดีที่สุด อาจเนื่องจากโปรตีนชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีในสถานะที่เป็นกลางไปถึงด่างอ่อนประมาณ pH 7.5-8.5 (Wongputtisins, 2008) โดยแบคทีเรียชนิดนี้ถูกแยกได้มาจากถั่วเน่า ซึ่งเป็นอาหารหมักท้องถิ่นภาคเหนือของประเทศไทย ทั้งนี้ก็มีรายงานอีกมากมายที่ระบุว่าโปรตีนเอสจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาพด่าง (Alkali proteases) (Chantawannakul *et al.*, 2002; Haddar *et al.*, 2010; Chu, 2007) ผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับสถานะของ

น้ำยางสดที่มี pH ประมาณ 6.8-7.5 ส่วนโปรติเอสจากยางมะละกอและโปรติเอสจากน้ำสับปะรดจะทำงานได้ดีในสถานะที่เป็นกรด (Acid proteases) ดังเช่นในการศึกษาของ พรธยาและกฤษณา (2543) ที่ทดสอบทำการกำจัดโปรตีนออกจากน้ำยางสด โดยพบว่าโปรติเอสจากยางมะละกอไม่สามารถใช้กับน้ำยางสดที่ต้องการผลิตเป็นน้ำยางข้นได้เนื่องจากมีความเป็นกรดมากกว่าโปรติเอสจากน้ำสับปะรด ด้วยเหตุผลดังที่กล่าวมาจึงทำให้เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) สามารถย่อยโปรตีนในน้ำยางสดได้ดีกว่าโปรติเอสจากแหล่งอื่นๆ

จากการทดลองหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่ 6 ยูนิตเท่านั้น จึงไม่สามารถบอกได้ว่าหากเติมเอนไซม์มากกว่า 6 ยูนิต ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในชั้นซีรัมจะเพิ่มมากขึ้นด้วยหรือไม่ อย่างไรก็ตามคาดว่าเมื่อเติมปริมาณเอนไซม์สูงที่ระดับหนึ่ง อัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับปะรดจะคงที่ เนื่องจากถึงแม้อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการจับระหว่างเอนไซม์กับสับปะรด เช่น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นสองเท่าจะทำให้อัตราเร็วเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าด้วย แต่เมื่อมีการการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ต่อไปเรื่อยๆ อัตราการเกิดปฏิกิริยาจะคงที่ เพราะสับปะรดมีปริมาณคงที่ (www.agri.cmu.ac.th, 28 กุมภาพันธ์ 2553) กล่าวคือความเข้มข้นของสับปะรดในระบบจะเป็นตัวกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยา

ในส่วนของการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสนั้น โดยปกติแล้วอัตราการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้นเหมือนอัตราเร็วของปฏิกิริยาจากสารเคมีทั่วไป แต่เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ที่พบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงถึงระดับหนึ่งเท่านั้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปแล้วอัตราการทำงานกลับลดลง ทั้งนี้เป็นเพราะโครงร่าง (Conformation) ของเอนไซม์เสียสภาพไป (พัชรา, 2541) ซึ่งคาดว่าที่อุณหภูมิ 55°C อาจสูงเกินไปจนกระทั่งทำให้โครงรูปของโปรติเอสจาก *B. subtilis* (MR10) เสียสภาพไป และไม่สามารถทำงานได้ส่งผลให้ย่อยโปรตีนในน้ำยางสดได้น้อยลง

SDS (Sodium dodecyl sulfate) เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวจึงช่วยให้โปรตีนที่เกาะในส่วนของเนื้อเยื่อสามารถหลุดลงมาอยู่ในส่วนของซีรัมเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเติม SDS ในปริมาณสูงจะเกิดผลเสียต่อโครงร่างของเอนไซม์ได้ เนื่องจาก SDS จะทำให้เอนไซม์เสียโครงรูปจนไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ SDS ยังเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ โดยทำให้ระคายเคืองเมื่อสัมผัส เป็นสารก่อมะเร็ง และเมื่อได้รับในปริมาณสูงอาจเสียชีวิตได้ (<http://www.sciencelab.com>; 15 มิถุนายน 2553) ดังนั้นจึงไม่ควรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับมนุษย์ ดังเช่นถุงมือยาง เป็นต้น จากการศึกษาของ สราวุธดิและนภา (2541) ซึ่งได้ศึกษาการลดลงโปรตีนในน้ำยางสดโดยใช้โปรติเอสร่วมกับการเติม SDS โดยใช้ในปริมาณ 1% แต่ในการศึกษาค้าง

นี้พบว่าการใช้ SDS เพียง 0.2% ก็ให้ประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนดีที่สุด นั่นคือสามารถลดการใช้ SDS ได้ถึง 5 เท่า แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดของโปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ที่เหนือกว่าโปรติเอสอื่นๆ ไป แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของโปรติเอนไซม์นี้โดยปราศจากการเติม SDS ก็ให้ผลดีเช่นกัน

โปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจะมีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่น้อยลง ดังนั้นเมื่อทำงานในน้ำยางสด ก็คาดว่าโปรติเอสสามารถย่อยสลายโปรตีนที่เป็นโปรตีนในน้ำยางสดได้อย่างเฉพาะเจาะจง แต่ในขณะที่โปรติเอสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นั้น มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่มากทำให้โปรติเอสเข้าแรงปฏิกิริยากับโปรตีนเหล่านี้ด้วย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดโดยโปรติเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนสูงกว่าการใช้โปรติเอสไม่บริสุทธิ์ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตโปรติเอสให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นนั้น ต้องมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมสำหรับกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งกระทบต่อต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์ถุงมือยางได้ อาจเกิดข้อกังวลบางประการเกี่ยวกับการใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* (MR10) ในการย่อยโปรตีนในน้ำยางสดสำหรับใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ถุงมือยาง เพราะเกรงว่าโปรตีนปนเปื้อนที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดนี้อาจก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ได้เช่นเดียวกับโปรตีนบางชนิดในน้ำยางสด แม้คณะผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการทดลองพิสูจน์ข้อกังวลดังกล่าว แต่เบื้องต้นคาดว่าโอกาสก่ออาการภูมิแพ้มีน้อยมาก เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์หลักที่ถูกรับและถูกคัดแยกได้มาจาก “ถั่วเน่า” (Wongputtisins, 2008) ซึ่งเป็นอาหารหมักท้องถิ่นในเขตภาคเหนือของประเทศไทยที่มีการบริโภคมาเป็นเวลานาน และยังไม่พบรายงานการก่อให้เกิดอาการแพ้ อันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารชนิดนี้แต่อย่างใด

ตลอดการทดลองครั้งนี้ มีปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้คือ ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในน้ำยางสดที่มีความแปรปรวน ทำให้ตรวจพบปริมาณโปรตีนในน้ำยางสดไม่เท่ากันในแต่ละการทดลอง อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยก็ได้มีชุดควบคุม (Control) ควบคู่ทุกครั้งแต่ละการทดลอง

สรุปผลการวิจัย

โดยสรุปแล้ว พบว่าโปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (MR10) มีประสิทธิภาพกำจัดโปรตีนในน้ำยางสดดีที่สุดเหนือโปรติเอสแหล่งอื่นๆ โปรติเอสจากแหล่งนี้สามารถผลิตได้ง่าย ในเวลาอันสั้นและปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโปรติเอสจากพืชและสัตว์หรือแม้แต่เทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น โปรติเอสที่ได้นี้มีสถานะที่เหมาะสมในการทำงานย่อยโปรตีนในน้ำยางสด ได้แก่การใช้ปริมาณ 6 unit/ น้ำยาง 20 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการเติมสาร SDS ในปริมาณ 0.2% และการใช้โปรติเอสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางสดได้ดีกว่าโปรติเอสที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามการใช้โปรติเอสโดยปราศจากการเติม SDS ก็ให้ผล

เป็นที่น่าพอใจเช่นกัน เนื่องจากโปรติเอสชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูง จึงคาดว่าน่าจะมีศักยภาพนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตถั่วมีอย่างทางการแพทย์ได้ แต่อาจทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากค่าใช้จ่ายในการเตรียมโปรติเอส

ข้อเสนอแนะที่คิดว่าควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

แม้ว่าโปรติเอสจาก *B. subtilis* (MR10) จากงานวิจัยนี้จะมีประสิทธิภาพกำจัดโปรตีนในน้ำยางสดดีเพียงใด โปรติเอสที่ผลิตขึ้นมานี้ก็มีข้อจำกัด คือโปรติเอสจะย่อยโปรตีนทุกชนิดรวมถึงโมเลกุลของโปรติเอสเอง ทำให้เก็บรักษาไว้ไม่ได้นาน ต้องเตรียมใหม่อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหากจะพัฒนาใช้โปรติเอสดังกล่าวนี้ในอุตสาหกรรมยางพารา จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในการเตรียมโปรติเอสในรูปแบบที่สะดวกใช้งาน และมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น เช่น รูปแบบผงหรือของเหลวเข้มข้น เป็นต้น ก็จะสร้างความสะดวกต่อการใช้งานในกระบวนการผลิตได้

เอกสารอ้างอิง

- นุชนาฏ ฅ วรรณอง และ วราภรณ์ ขจรไชยกุล “เทคโนโลยีการลดโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในผลิตภัณฑ์จากยางธรรมชาติ” วารสารยางพารา, 2539, 16, 81-90.
- พรรษา อุดลยธรรม และ กฤษณา คงศิลป์. รายงานการวิจัยเรื่อง การใช้เอนไซม์ในการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางเพื่อการผลิตน้ำยางข้น. ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง, 2543.
- พร้อมศักดิ์ สงวนรัมย์ค์ “การเปรียบเทียบวิธีทดสอบมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในผลิตภัณฑ์จากน้ำยาง: วิธีไหนดีที่สุด” วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการยาง, 2550, 1, 18-22.
- พัชรา วีระกะลัส. เอนไซม์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2541.
- ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ และ พรสิทธิ์ วงศ์บุญทริก. “การเตรียมและสมบัติบางประการของยางโปรตีนต่ำ”. วารสารสงขลานครินทร์, 2540, 19, 223-229.
- ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์. 2010. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.agri.cmu.ac.th> (วันที่ค้นคว้า 28 กุมภาพันธ์ 2553)
- อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ยาง. 2009. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.rubberthai.or.th>. (วันที่ค้นคว้า 22 สิงหาคม 2552).
- Baumann, U., and Bisping, B. 1995. Proteolysis during tempe fermentation. *Food Microbiology* 12: 39-47.

- 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.
- Chu, W. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34: 241-245.
- Cormier, F., Charest, C., and Dufresne, C. 1989. Partial purification and properties of proteases from Fig (*Ficus carica*) cultures. *Biotechnology Letters* 11: 797-802.
- Devaraj, K.B., Gowda, L. R., and Prakash, V. 2008. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry* 69: 647-655.
- Frankena, J., Bulthuis, B. A., Verseveld, H.W.V., and Stouthamer, A.H. 1985. Protease production in a *Bacillus licheniformis* strain. *Antonie van Leeuwenhoek* 51: 550.
- Haddar, A., Fakhfakh-Zouari, N., Hmidet, N., Frikha, F., Nasri, M., and Kamoun, A.S. 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* (article in press).
- Klinklai, W., Kawahara, S., Mizumo, T., Yoshizawa, M., Sakdapipanich, J.T., Isono, Y., and Ohno, H. 2003. Depolymerization and ionic conductivity of enzymatically deproteinized natural rubber having epoxy group. *European Polymer Journal* 39:1707-1712.
- Macchione, M.M., Merheb, C.W., Gomes, E., and Silva, R.d. 2008. Protease production by different thermophilic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 146: 223-230.
- Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.
- Sakdapipanich, J.T. 2007. Structure characterization of natural rubber based on recent evidence from enzymatic treatments. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103: 287-292.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy : historical perspective. *Methods* 27:3-9.
- Truscott, W. 2002. Immunology and allergy clinics of North America, *Journal Fink (Ed.)*,89-121.
- Wongputtisiri, P. 2008. Fermented corticate soybean meal production and quality test for animal feed. Ph.D Thesis of Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Yeang, H.Y., Arif, S.A.M., Yusof, F., and Sunderasan, E. 2002. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods* 27: 32-45.

ภาคผนวก

เอกสารคำชี้แจงข้อคิดเห็นผู้ทรงคุณวุฒิต่อโครงการ

1. ระบุน้ำยางดิบที่รายงานนั้น คือน้ำยางสดหรือน้ำยางข้น และได้มีการหา soluble protein กับส่วนของยางหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยหรือไม่ เนื่องจากจะเป็นค่าสำคัญที่จะบอกประสิทธิภาพของการลด soluble protein ในปริมาณรวมของน้ำยาง

คำชี้แจง

- น้ำยางที่นำมาศึกษาตลอดโครงการนี้เป็นน้ำยางสด ดังนั้นจึงได้มีการแก้ไขคำว่า “น้ำยางดิบ” เป็น “น้ำยางสด” แต่ไม่ได้แก้ไขในส่วนข้อหัวข้อ เนื่องจากเกรงจะมีผลกระทบต่อสัญญาฉบับหนึ่งที่ได้ใช้คำว่า “น้ำยางดิบ” ก่อนหน้านี้
- ไม่ได้วัดค่า soluble protein ของส่วนเนื้อยางหลังการปั่นเหวี่ยง เพราะมีการกำหนด scope ชัดเจนในโครงร่างงานวิจัยว่าจะประเมินทางอ้อมโดยดูจาก soluble protein ของชั้นชีรัม อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยมีแผนที่จะตรวจวัดค่าไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) ในส่วนเนื้อยางหลังการย่อยด้วยโปรติเอส ในแผนการดำเนินงานปีที่ 2 ซึ่งได้รับทุนวิจัยต่อเนื่อง

2. การรายงานผลการศึกษาปริมาณเอนไซม์, ปริมาณ SDS และอุณหภูมิที่เหมาะสม ตารางที่ 4, 5 และ 6 ควรรายงานในรูปของเส้นกราฟเพื่อให้เห็นแนวโน้มของอิทธิพลของปัจจัยที่ต้องการศึกษาต่อประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน ซึ่งจะช่วยให้เห็นแนวโน้มได้ง่ายกว่าการรายงานในรูปตาราง

คำชี้แจง

- ได้ทำการปรับเปลี่ยนและแก้ไขเป็นที่เรียบร้อยแล้ว แต่ได้รายงานในรูปกราฟแท่งแทนกราฟเส้น เนื่องจากผู้วิจัยเห็นว่าข้อมูลที่แสดงไม่ได้เป็นข้อมูลที่ต่อเนื่องกันแบบ time course

3. การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม ควรใช้เอนไซม์ให้มากกว่า 6 ยูนิต เพราะแนวโน้มยังเพิ่มขึ้นจนกว่าจะมีแนวโน้มลดลง เพื่อให้ได้จุด optimum ที่แท้จริง

คำชี้แจง

- ผู้วิจัยเห็นด้วยกับข้อคิดเห็นนี้ แต่เป็นไปได้ยากที่จะย้อนกลับไปแก้ไข จึงขออนุญาตใช้ผลการทดลองนี้อธิบายเพียงในบริบทของการทดลองนี้เท่านั้น

4. การรายงานค่าประสิทธิภาพของแต่ละปัจจัยต่อการย่อยโปรตีนนั้น ทำโดยการเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เนื่องจากปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในน้ำยางดิบมีความแปรปรวน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยควร

เปรียบเทียบผลของอิทธิพลของแต่ละปัจจัยได้ โดยการ normalize ค่าของแต่ละชุดทดลองคิด
เปรียบเทียบกับค่าของชุดควบคุมของชุดการทดลองนั้นๆ

คำชี้แจง

- ได้แก้ไขค่าตัวเลขเป็นที่เรียบร้อยแล้วตามคำแนะนำ

5. นักวิจัยควรมีแผนวิจัยต่อตามที่เสนอไว้ และควรวิจัยต่อเพื่อหาสมบัติของน้ำยางภายหลังการ treat
ด้วย protease ที่เหมาะสม ทั้งด้าน processibility และ vulcanisate properties ของ film จากน้ำยางที่
treat แล้ว

คำชี้แจง

- ได้มีการกำหนดไว้ในแผนงานวิจัยปี SPR 2553 เป็นที่เรียบร้อยแล้ว