

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ MR10 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสด ซึ่งคาดว่าจะสามารถใช้เตรียมยางโปรตีนต่ำที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาการผลิตโปรติเอสผงจากเชื้อชนิดนี้เพื่อให้เกิดความสะดวกในการใช้งานระดับอุตสาหกรรม และสามารถเก็บรักษาโปรติเอสได้นานขึ้น ผลการศึกษาพบว่าหลังกระบวนการเตรียมสารละลายเอนไซม์โปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน (Partial purified protease) โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (80% Saturation) และการกำจัดไอออนเกลือด้วยวิธีไดอะไลซิส (12 kDa cut off) สามารถเก็บเกี่ยวโปรติเอสได้ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า จากนั้นนำสารละลายโปรติเอสที่บริสุทธิ์บางส่วนนี้ไปผ่านกระบวนการทำแห้งซึ่งผลการศึกษาพบว่า การทำแห้งโปรติเอสด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze drying) เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด โดยคงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจำเป็นต้องเติมสารสื่อ (Carrier) ลงไปในสารละลายเอนไซม์ด้วยเพื่อลดการเสียสภาพของเอนไซม์ระหว่างการทำแห้ง และสารสื่อที่เหมาะสมที่สุดคือน้ำตาลแมนนิทอลในปริมาณ 1 % (w/v) โปรติเอสผงมีกิจกรรมลดลงเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน ที่อุณหภูมิต่ำตั้งแต่ -20°C ถึง 4°C และในขั้นตอนสุดท้าย ประสิทธิภาพของโปรตีนเอนไซม์ในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ถูกทดสอบ ผลการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อที่ผ่านการเติมโปรติเอสผงมีค่าต่ำกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่มีการเติมโปรติเอสผงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลใกล้เคียงกับการใช้โปรติเอสผงยี่ห้อ SigmaTM นอกจากนี้จากการศึกษาโปรตีนในชั้นซีรัมด้วยวิธี SDS-PAGE ยังพบว่า โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 15, 50 และ 80 kDa ได้หายไปหลังจากที่เติมโปรติเอสผงลงไป

Abstract

Bacillus subtilis strain MR10 is able to produce protease enzyme that eliminates protein moiety containing in natural rubber latex. It was expected to be used for a preparation of low protein rubber without allergic protein. Therefore, the production of powdered protease from this strain was studied to be used conveniently and also longer shelf life. The results showed that the percent recovery of protease was 15 percent, while the purification fold of protease was approximately 10 folds after the partial purification process; including protein precipitation using ammonium sulfate (80% saturation) and dialysis (12 kDa cut off). Drying process of the partial purified protease solution was subsequently studied. It was found that freeze drying was the suitable method that retained the protease activity at 90%. Moreover, addition of carrier to the enzyme solution was necessary to prevent the denaturation of enzyme during drying process. We found that the mannitol at 1% (w/v) was the most suitable carrier. The shelf life of powdered protease was studied. It was found that 70% of protease activity was remained after the powder was stored at low temperature (-20°C – 4°C) for 2 months. Finally, the efficiency of powdered protease to eliminate the protein content in natural rubber latex was tested. The results showed that the protein content of protease-treated rubber was 70% lower than rubber without protease treatment and similar to the rubber treated with commercial protease (SigmaTM). Moreover, protein molecules with MW approximately 15, 50 and 80 kDa that normally found in rubber serum were disappeared in a protease treated group when SDS-PAGE analysis was used.