



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรตีนจาก
แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 (ปีที่2)

โดย นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และคณะ

มิถุนายน 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรตีนจาก
แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 (ปีที่2)

คณะผู้วิจัย

- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| 1. นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน | มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 2. นางสาวช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ | มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 3. นายเอกวิทย์ ตรีเนตร | มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 4. นางสาวสุทธธิพร นันติ | มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |

ชุดโครงการวิจัยแห่งชาติ : ยางพารา

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 (ปีที่2)
Biological and physical properties of deproteinized rubber prepared by *Bacillus subtilis* MR10 protease

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

ชื่อผู้ร่วมวิจัย หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ผศ.ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์
หน่วยงาน สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์ 053-875249 โทรสาร 053-878225

ชื่อ-สกุล อาจารย์เอกวิทย์ ตรีเนตร
หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225

ชื่อนักศึกษาผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาวสุทธิพร นันติ
หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ 63 หมู่ 4 ถ.เชียงใหม่-พร้าว ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์ 053-873540 โทรสาร 053-878225

งบประมาณทั้งโครงการ 350,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 กันยายน 2556 ถึง 31 สิงหาคม 2557

ปัญหาที่ทําวิจัยและความสำคัญ

โปรตีนเอสพจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 สามารถใช้ย่อยโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ อย่างไรก็ตามแม้ผลการทดลองจะพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ แต่ยังไม่มียหลักฐานแสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนเป้าหมายที่ภาคอุตสาหกรรมต้องการกำจัดทิ้งได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความสามารถของโปรตีนเอสพจาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค two-dimensional gel electrophoresis นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้วางแผนในการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญบางประการของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำนี้ด้วย ด้วยแผนดำเนินงานทั้งหมดดังกล่าวนี้ คาดว่าจะช่วยให้สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรตีนเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 นี้สามารถใช้เตรียมยางโปรตีนต่ำที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้และมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับยางทั่วไปได้หรือไม่

วัตถุประสงค์

11. เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10
2. เพื่อทดสอบสมบัติของถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการสลายกรรมชนิดใช้ครั้งเดียวที่เตรียมจากยางโปรตีนต่ำซึ่งเตรียมโดยใช้โปรตีนเอส จาก *Bacillus subtilis* MR10 ตามที่มาตรฐานกำหนด (มอก.538-2548)

ผลการดำเนินงาน

ภายหลังจากทำการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อใช้ในการผลิตน้ำยางโปรตีนต่ำสำหรับงานวิจัยครั้งนี้แล้ว ในเบื้องต้นโปรตีนเอสดังกล่าวก็ได้ถูกนำไปทดสอบความสามารถในการทำงานในสภาวะที่มีการเติมสารรักษาสภาพน้ำยางพาราจำนวนสองชนิด ได้แก่ แอมโมเนีย (0-0.8%) และโซเดียมซัลไฟท์ (0-0.2%) ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์โปรตีนเอสยังคงทำงานได้ดีในสภาวะที่มีการเติมโซเดียมซัลไฟท์ แต่ในสภาวะที่เติมแอมโมเนียในปริมาณสูงนั้น กลับทำให้โปรตีนเอสทำงานได้น้อยลง โดยประสิทธิภาพลดลงเหลือเพียง 20% เมื่อเติมแอมโมเนียให้มีความเข้มข้นเป็น 0.8% ดังนั้นจึงควรใช้โซเดียมซัลไฟท์เป็นสารรักษาสภาพน้ำยางพาราสดก่อนนำมาบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรตีนเอส ในขณะที่เดียวกันผลการทดลองก็แสดงให้เห็นอีกว่าเอนไซม์โปรตีนเอสไม่ทำให้น้ำยางพาราสดเสียสภาพเมื่อวัดออกมาในรูปของค่า Mechanical stability time (MST)

ในการวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำ ผู้วิจัยได้ทำการสกัดโปรตีนทั้งหมดออกมาจากแผ่นฟิล์มยางที่เตรียมขึ้นโดยใช้เทคนิคที่ดัดแปลงและพัฒนาขึ้นใหม่ ได้แก่ การแช่ฟิล์มยางในไนโตรเจนเหลว บดเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของยางและสกัดด้วย HEPES buffer ซึ่งก็พบว่าสามารถสกัดโปรตีนออกมาได้มากกว่าการใช้สารละลาย PBS buffer ถึง 4-5 เท่า สารละลายโปรตีนดังกล่าวก็ได้ถูกนำไปวิเคราะห์การมีอยู่ของโปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis ต่อไป ซึ่งผลการทดสอบก็พบว่าโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้หายไปจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนี้ภายใน

หลังการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าน้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่ผลิตด้วยโปรติเอสชนิดนี้มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน

ต่อมาได้มีการทดลองบ่มน้ำยางชั้นร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส จากนั้นนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการขึ้นรูปเป็นถุงมือยางพารา เปรียบเทียบกับถุงมือยางพาราที่ผลิตขึ้นด้วยสูตรอื่นๆ ได้แก่ ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมเอนไซม์) สูตรเติมเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า (PROTEX7L) และสูตรเติมสาร SDS แล้วนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพบางประการซึ่งพบว่าแรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ยทั้งก่อนและหลังบ่มแรงของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอสของงานวิจัยนี้มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับถุงมือสูตรอื่นๆ ในขณะที่ค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยก่อนบ่มแรงของถุงมือทุกสูตรมีความแตกต่างกันแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่ภายหลังการบ่มแรงแล้วค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยมีค่าสูงกว่าสูตรพื้นฐานและสูตรที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่บ่มร่วมกับโปรติเอสทางการค้า ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ข้อมูลก็ยังได้พบข้อมูลที่น่าสนใจอีกหนึ่งประการคือ ภายหลังการบ่มแรงแล้วค่าแรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ยของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอส MR10 มีค่าเพิ่มสูงขึ้นในขณะที่สูตรพื้นฐานและสูตรที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่บ่มร่วมกับโปรติเอสทางการค้ากลับมีค่าที่ลดลง ค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยก็เช่นเดียวกัน ที่ถุงมือสูตรน้ำยางโปรตีนต่ำจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงสูตรเดียวที่มีค่าที่แทบจะไม่เปลี่ยนแปลง ทั้งนี้กระบวนการพัฒนาคุณภาพถุงมือยางที่ใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ร่วมในกระบวนการผลิตจึงยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยครั้งนี้รวมถึงผลงานวิจัยที่ผ่านมา (RDG5650082) สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 มีความสามารถในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นๆ นั้นก็พบว่าสามารถถูกกำจัดได้เช่นเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าน้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่ผลิตด้วยโปรติเอสชนิดนี้มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งานอีกทั้งไม่ทำให้น้ำยางพาราเสียสภาพ แต่ถุงมือยางทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำยังมีคุณสมบัติบางประการที่ต่ำกว่ามาตรฐานถุงมือปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว (มอก. 538-2548) ซึ่งต้องมีพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

ควรมีการวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรถุงมือยางที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานต่อไป

ผลงานวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

บทความวิชาการระดับนานาชาติ “Proteome analysis of deproteinized rubber produced by bacterial protease and some mechanical properties” และสิทธิบัตร “กระบวนการผลิตน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสดที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 โดยใช้เทคนิค 2D gel electrophoresis และเพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของถุงมือยางทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางพาราโปรตีนต่ำ ได้แก่ ความหนา แรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ย และความยืดเมื่อขาดเฉลี่ย ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ อีกทั้งไม่ทำให้ค่าความเสถียรของน้ำยางพาราลดลง แต่ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจะลดลงเหลือเพียง 20 % เมื่ออยู่ในสถานะที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 0.8% โดยปริมาตร เป็นสารรักษาสภาพน้ำยาง แต่ในขณะที่สารโซเดียมซัลไฟท์ความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนัก ไม่ทำให้ประสิทธิภาพเอนไซม์ลดลง เมื่อทดลองขึ้นรูปถุงมือยางพาราด้วยน้ำยางชั้นที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสแล้วทำการศึกษาคุณสมบัติบางประการของถุงมือยาง ก็พบว่าแรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ยทั้งก่อนและหลังบ่มเร่งของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอสของงานวิจัยนี้มีค่าต่ำกว่ามาตรฐาน มอก. 538-2548 แต่ความหนาและค่าความยืดเมื่อขาดของถุงมือมีค่าสูงกว่ามาตรฐาน ดังนั้นกระบวนการพัฒนาคุณภาพถุงมือยางที่ใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ร่วมในกระบวนการผลิตจึงยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไป

ABSTRACT

This research aimed to analyze the remaining of allergenic proteins in natural rubber latex that was co-incubated with protease produced from *Bacillus subtilis* MR10 using 2D gel electrophoresis technique. Moreover, to study some properties of medical gloves produced from deprotenized natural rubber latex; i.e. tensile and elongation at break, was another objective. The results showed that this protease could be able to eliminate rubber proteins; furthermore, the mechanical stability time (MST) of rubber latex was not decreased. However, only 20% of protease activity was remained, when exposed in 0.8% by vol. of ammonia as latex-stabilizing agent. But 0.05% by wt. of sodium sulfite could not effect to protease activity. Medical gloves were produced using concentrated rubber latex that was co-incubated with protease and some mechanical properties were investigated. It was found that average tensile and elongation at break of both before and after aging were lower than the Thai Industrial Standard (มอก. 358-2548). However, their thickness and average elongation at break of both before and after aging were higher than standard. Thus quality development of medical gloves produced by *B. subtilis* MR10 protease need to be improved.

ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

จากงานวิจัยหัวข้อ การคัดเลือกโปรตีนที่เหมาะสมเพื่อการย่อยโปรตีนในน้ำยางดิบ (สัญญาเลขที่ RDG5250027) และ การเตรียมโปรตีนในรูปทางการค้าสำหรับย่อยโปรตีนในน้ำยางสด (สัญญาเลขที่ RDG5350029) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจาก สกว. ในปี 2552 และ 2553 ตามลำดับ พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ โปรตีนเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 สำหรับใช้ย่อยโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ อย่างไรก็ตามแม้ผลการทดลองจะพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถลดปริมาณโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้ แต่ยังไม่มีความชัดเจนแสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนเป้าหมายที่ภาคอุตสาหกรรมต้องการกำจัดทิ้งได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้รับการอนุมัติทุนอีกครั้งในปี 2554 ภายใต้โครงการการวิเคราะห์โปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางโปรตีนต่ำ (สัญญาเลขที่ RDG5450045) ที่มุ่งเน้นศึกษาความสามารถของโปรตีนเอสจาก *B. subtilis* ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ด้วยเทคนิค Western blot ซึ่งเป็นเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่ได้รับการยอมรับ ทั้งนี้เพื่อยืนยันว่าน้ำยางโปรตีนต่ำที่ผลิตได้นี้ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้จริงและปลอดภัยต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ยางพารา แต่ด้วยข้อจำกัดทางเทคนิคและงบประมาณของโครงการขนาด SPR ทำให้สามารถวิเคราะห์การมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ได้เพียงชนิดเดียวนั่นคือ Rubber Elongation Factor (REF) ดังนั้นงานวิจัยที่จะเสนอขอครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาเพิ่มเติมถึงการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิค Western blot และ two-dimensional gel electrophoresis นอกจากนี้ จากข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิที่แนะนำให้คำนึงถึงคุณภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมด้วยโปรตีนชนิดนี้ด้วยว่าอาจจะด้อยลงหลังการกำจัดโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วางแผนในการศึกษาคุณสมบัติเชิงกลที่สำคัญบางประการของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำนี้ด้วย ด้วยแผนดำเนินงานทั้งหมดดังกล่าวนี้ คาดว่าจะช่วยให้สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรตีนเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 นี้สามารถใช้เตรียมยางโปรตีนต่ำที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้และมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับยางทั่วไปได้หรือไม่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10
2. เพื่อทดสอบสมบัติของยางมีอย่างปราศจากเชื้อสำหรับการสลายกรรมชนิดใช้ครั้งเดียวที่เตรียมจากยางโปรตีนต่ำซึ่งเตรียมโดยใช้โปรตีนเอส จาก *Bacillus subtilis* MR10 ตามที่มาตรฐานกำหนด (มอก.538-2548)

ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

โปรตีนหลายชนิดที่อยู่ในน้ำยางดิบสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ (Allergy) ขึ้นแก่ผู้สวมใส่ผลิตภัณฑ์ยางพาราโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ลูกมียาง โดยอาการแพ้มีทั้งแบบเฉียบพลันและค่อยเป็นค่อยไป (ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์, 2540) อาการมีตั้งแต่เพียงระคายเคืองเมื่อสวมใส่ถุงมือ (Irritant contact dermatitis) ไปจนถึงอาการที่เรียกว่า anaphylaxis ซึ่งมีความรุนแรงมาก (Sussman et al., 2002) ดังนั้น ในกระบวนการผลิตจึงต้องกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกเสียก่อน วิธีการกำจัดโปรตีนมีตั้งแต่การล้างด้วยน้ำเปล่า แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปได้หมดเสียทีเดียว มีรายงานว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำยางธรรมชาติสามารถถูกทำลายได้โดยการปรับสภาวะให้เป็นด่างแก่ เช่น การเติมแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำยางจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณสมบัติกายภาพของน้ำยางได้ (Moris and Lakin, 1995 อ้างโดย Perrella and Gaspari, 2002) ปัจจุบันวิธีที่ใช้กำจัดโปรตีนคือ การนำน้ำยางดิบไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนซีรัมทิ้งไป แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนส่วนที่เกาะกับอนุภาคยางออกไปได้ ช้ำยังทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำยางเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 25 เปอร์เซ็นต์เป็น 50 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย (Perrella and Gaspari, 2002) จึงได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์โปรติเอส (Proteases) เข้าช่วยในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางเนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งในส่วน serum และ rubber phase

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาของผู้วิจัยเอง พบว่าโปรติเอสที่ผลิตได้มาจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ซึ่งแยกได้มาจากถั่วเน่า (อาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือของประเทศไทย) มีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางดิบได้ดีเมื่อเทียบกับโปรติเอสแหล่งอื่น และผู้วิจัยก็ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงกระบวนการเตรียมเอนไซม์ดังกล่าวนี้ให้อยู่ในรูปผงซึ่งสะดวกต่อการนำไปใช้งานจริงเป็นที่เรียบร้อยแล้ว แต่อย่างไรก็ตามแม้โปรติเอสที่ผลิตได้นี้จะสามารถย่อยโปรตีนได้มากเพียงใด แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าโปรติเอสไม่มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อโปรตีนภูมิแพ้ที่สนใจ ทำให้โปรตีนภูมิแพ้เหล่านี้อยู่คงอยู่ในน้ำยาง เกิดเป็นประเด็นที่ยังสงสัยอยู่ ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ข้อสงสัยดังกล่าวจึงควรมีการทดสอบความสามารถของโปรติเอส จาก *B. subtilis* MR10 ในการย่อยโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสด ซึ่งมีหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 ข้อมูลจำเพาะและคุณสมบัติการก่อภูมิแพ้ของโปรตีนแต่ละชนิดต่อผู้ป่วยได้มีการรายงานในรายงานต่างๆ มากมาย เช่น รายงานของ Palosuo (1997), Ylitalo et al. (1998), Sussman et al. (2002), Raulf-Heimsoth et al. (1997), Yeang et al. (2002) และ Yeang et al. (2004) เป็นต้น

ในการวิเคราะห์โปรตีนที่อยู่ในน้ำยางพารานั้นหากใช้วิธีทางเคมีเช่น Lowry's method, Modified Lowry's method หรือ Bradford's method ก็จะสามารถบอกได้เพียงปริมาณโปรตีนโดยรวมเท่านั้น ไม่สามารถระบุถึงโปรตีนแต่ละชนิดได้ ดังนั้นหากต้องการศึกษาถึงโปรตีนแต่ละชนิดทั้งเชิงคุณภาพและ/หรือปริมาณแล้ว พบว่าวิธีในเชิงหลักการของ electrophoresis (เช่น SDS-PAGE และ 2-dimensional electrophoresis) และ Immunoblotting (เช่น LEAP, RAST inhibition assay และ ELISA inhibition test) ได้รับความนิยมมากจากนักวิจัย (Raulf-Heimsoth et al., 1997; Breezhold et al., 2002; Tomazic-Jezic and Lucas, 2002) นอกจากนี้การใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนก็มีรายงานเช่นกัน (Tomazic and Lucas, 2002) วิธีการทาง Immunoblotting จะมีความถูกต้องของข้อมูลมากกว่าวิธี electrophoresis เพราะแอนติบอดีที่เติม

ลงไปจะจับกับโปรตีนภูมิแพ้ได้อย่างจำเพาะทำให้สามารถระบุการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ได้อย่างถูกต้องแม้จะมีโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันอยู่ด้วยก็ตาม อย่างไรก็ตาม วิธีการทาง Immunoblotting นี้แม้จะมีความจำเพาะและความถูกต้องสูง แต่ก็เป็วิธีการที่ค่อนข้างซับซ้อน และ มีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากต้องมีการเตรียมแอนติบอดีของโปรตีนภูมิแพ้แต่ละชนิดซึ่งต้องเตรียมจาก สัตว์ทดลอง ดังที่ Tomazic และ Lucas (2002) ได้สรุปข้อดี-ข้อเสียของการวิเคราะห์โปรตีนบางวิธีไว้ในตารางที่ 2

แต่หากต้องการเพียงศึกษาการกระจายตัวตามขนาดโมเลกุลของโปรตีนผสมในน้ำยารพารา แล้วนั้น พบว่าการใช้วิธีการทาง electrophoresis ก็เพียงพอและเป็นที่ยอมรับ เทคนิคนี้มีหลักการคือ เมื่อโปรตีนอยู่ในสนามไฟฟ้า โปรตีนที่แตกต่างกันจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่ตรงข้ามกันด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ขึ้นกับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุล รูปร่างและขนาดโมเลกุล นอกจากศึกษาการกระจายตัวได้แล้วยังสามารถบอกถึงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดได้โดยเทียบกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานซึ่งทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว ยกตัวอย่างเช่น มีการใช้เทคนิค SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) ในการศึกษาโปรตีนผสมในน้ำยารพารา โดย Tomazic et al. (1995) และการตรวจหาเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดหนึ่งในน้ำยารพาราโดย Yagami et al. (1995) แต่มีข้อเสียที่ไม่สามารถแยกโปรตีนต่างชนิดกันที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกันได้ จึงมีการพัฒนาเทคนิค 2-dimensional electrophoresis ขึ้น และใช้ศึกษาจำแนกโปรตีนในน้ำยารพาราได้ เช่นในการศึกษาของ Posch et al. (1997) เป็นต้น

จากข้อมูลทั้งหมด อาจจะพอสรุปได้ว่าวิธีที่มีประสิทธิภาพและน่าเชื่อถือที่สุดในการตรวจหาโปรตีนภูมิแพ้ก็คือการใช้วิธีการทาง Immunoblotting แต่จำเป็นต้องมี antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีนชนิดที่สนใจนั้นเสียก่อน แต่ถ้าไม่สามารถจัดหาหรือผลิต antibody ออกมาได้ ก็อาจใช้เทคนิค 2-D electrophoresis ช่วยในการศึกษาโปรตีนผสมเหล่านี้ เนื่องจากสามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้ แม้จะมีขนาดโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันก็ตาม แต่ก็อาจมีโอกาสปะปนผลคลาดเคลื่อนไปบ้างเล็กน้อย งานวิจัยนี้จึงเสนอให้มีการวิเคราะห์การมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยารพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิคทาง

Immunoblotting ที่มีชื่อว่า Western blot และเทคนิค 2-D electrophoresis ควบคู่กัน

แต่อย่างไรก็ตาม คุณภาพของผลิตภัณฑ์ยางที่ผลิตมาจากน้ำยางที่ผ่านการกำจัดโปรตีนออกไปโดยโปรติเอสจากเชื้อ MR10 ยังไม่สามารถคาดการณ์ว่าจะยังคงได้มาตรฐานหรือไม่ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาถึงคุณสมบัติบางประการของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นอย่างยิ่ง ถึงแม้ว่าจะมีรายงานวิจัยบางฉบับที่ระบุว่าถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางที่เติมโปรติเอสยังคงมีค่า tensile strength at break และ ultimate elongation สูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดก็ตาม (Perrella and Gaspari, 2002) แต่ก็เป็เอนไซม์คนละชนิดกันที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ด้วยแนวคิดของการวิจัยดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นนี้ ก็คาดว่าเมื่อเสร็จสิ้นงานวิจัยแล้วจะได้หลักฐานยืนยันความปลอดภัยต่อผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ยางพาราที่สัมผัสผิวหนังว่าปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ และความเชื่อมั่นถึงคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากยางโปรตีนต่ำที่เตรียมด้วยโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* MR10 ได้

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

IUIS code	ชื่อ	Molecular mass (kDa)	pI	แหล่งที่พบ
Hev b 1	Rubber elongation factor (REF)	14.6, 58	4.9	อนุภาคยาง
Hev b 2	Beta-1,3-glucanase	34-36	9.5	B-serum
Heb b 3	Small rubber particle protein (SRPP)	22-23	4.8	อนุภาคยาง
Heb b 4	Microhelix, cyanogenic glucosidase	50-57	4.5	B-serum
Heb b 5	Acidic protein	16	3.5	C-serum
Heb b6.01	Prohevein	19-20	5.6	B-serum
Heb b 6.02	Hevein	4.7	4.9	B-serum
Heb b 6.03	Prohevein C terminus	14	6.4, 7.0, 7.4	B-serum
Heb b 7.01	Patatin homolog, rubber biosynthesis inhibitor	43-44	-	C-serum
Heb b 8	Profilin	10.2-15.7	4.9	C-serum
Heb b 9	Enolase	48-51	5.6-6.4	C-serum
Heb b 10	Mn-superoxide dismutase	23-45	6.3	B-serum

ที่มา: Yeang et al., 2002. และ Sussman et al., 2002.

ตารางที่ 2 Methods for measurement of natural rubber latex proteins, antigens, and allergens

Method	Type	Advantages	Disadvantages
Modified Lowry method (D5712)	Chemical method, measures total proteins	Standardized, available as a kit	Insufficient sensitivity, chemical interference
Amino acid analysis (HPLC)	Chemical method, measures amino acids	Sensitive, reproducible	Expensive equipment, technical expertise
LEAP	Immunologic method, Measures antigenic protein	Sensitive, available as kit	Assay format, not standardized
RAST inhibition assay	Immunologic method, measures antigenic or allergenic proteins	Good assay format, very sensitive	Radioactive isotope, not standardized

ELISA inhibition test	Immunologic method, measure allergenic protein	Good assay format, colorimetric, good sensitivity	Uses human serum, can not be standardized
ELISA inhibition test (D6499)	Immunologic method, measure antigenic proteins	Sensitive, standardized	New as a standard, unknown reproducibility of standard reagents

ที่มา: Tomazic และ Lucas, 2002.

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรติเอส จาก *Bacillus subtilis* MR10
2. เพื่อทดสอบสมบัติของถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียวที่เตรียมจากยางโปรตีนต่ำซึ่งเตรียมโดยใช้โปรติเอส จาก *Bacillus subtilis* MR10 ตามที่มาตรฐานกำหนด (มอก.538-2548)

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

Bacillus subtilis MR10

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient broth ยี่ห้อ Himedia®

3. น้ำยางพารา

- น้ำยางพาราสดจากสวนยางในพื้นที่อำเภอฟัว จังหวัดเชียงใหม่
- น้ำยางข้น (60% DRC) จากบริษัท ลักกี้ไฟร์ จำกัด จังหวัดนนทบุรี

4. สารเคมี

	ยี่ห้อ
Casein from bovine milk	FLUKA
Albumin from chicken white egg	SIGMA
Tyrosine	MERCK
K ₂ HPO ₄	MERCK
KH ₂ PO ₄	SCHARLUA
Trichloroacetic acid (CCl ₃ COOH)	MERCK
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	MERCK
Folin-ciocalteau reagent	MERCK
Sodium hydroxide (NaOH)	J.T BAKER
Copper sulphate (Cu ₂ SO ₄ .5H ₂ O)	AJAX
Potassium sodium tartrate tetra hydrate (NaKC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O)	MERCK
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	MERCK
HCL	LAB SCAN
GBX DEV/REPL	KODAK
GBX Fix/REPL	KODAK
Glycine	Research Organics
Sodium Dodecyl Sulfate	BIO BASIC
Tris	Research Organics
Skim milk	MERCK
Acrylamide(C ₃ H ₅ NO)	Merck
Ammonium persulfate	Fluka
Acetic acid	Merck
Aluminium sulphate octadecahydrate	Loba
Agarose NA	Amersham biosciences
Bromophenol blue	Fluka
β-mercaptoethanol	Acros
Copper(II)sulfatepentahydrate	Univar
Coomassie brilliant blue G 250	Fluka
Coomassie brilliant blue R 250	Fluka
Dithiothreitol, DTT	U.S.B
Drystrip cover fluid	Amersham biosciences
Ethanol	Merck
Folin-ciocalteau's phenol	Merck
Formaldehyde	QReC

ยี่ห้อ

Glycine	Fisher
Glycerol	Carlo Erba
Hydrochloric acid	Carlo Erba
Iodoacetamide, IAA	Amersham biosciences
IPG buffer pH 3-10NL	Amersham biosciences
Methanol	Loba
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	Fluka
N,N'-methylenebisacrylamide	Fluka
Orthophosphoric acid	Merck
Phosphoric acid	Sigma
Sodium dodecyl sulfate, SDS	Sigma
Sodium hydroxide	Merck
Sodium carbonate	Merck
Sodium potassiumtartrate	Fisher
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck
2D Clean-up kit	Amersham biosciences
2D Quant kit	Amersham biosciences

5. อุปกรณ์

ยี่ห้อ

เครื่องเขย่าชนิดแบบควบคุมอุณหภูมิได้	RATEK
ตู้เป่าเชื้อ (Laminar airflow)	FLUFRANCE
ตูบ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Incubator)	MEMERT
เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ	HETTICH ZENTRIFUGER
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	SPECTRONIC GENESYS 5
เครื่องกวนสารแบบใช้ความร้อน (Hot plate stirrer)	CLIFTON CERASTIR
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	BINDER
เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	VORTEX GENIC 2
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	METTLER TOLEDO
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	MEMMERT
เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer)	DURA-DRY μ P
เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator)	BU CHI
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 ml	PYREX
หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 ml	CORNING
ขวดปริมาตร (Volumetric flask)	PYREX

ยี่ห้อ

ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 500 ml, 1000 ml	DURAN
กระบอกตวง (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 ml, 500 ml, 1000 ml	PYREX
หลอดทดลอง (Test tube)	PYREX
ถุงไดอะไลซิส (Dialysis tubing)	CELLU SEP
จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)	PYREX
Amersham ECL Gel 12%	AMERSHAM
X-ray film	KODAK
Ettan IPG Strip holder	Amersham Biosciences
Image Scanner	Amersham Biosciences
Immobilin Drystrip pH 3-10 NL	Amersham Biosciences
Isoelectric focusing system	Amersham Biosciences
Vertical electrophoresis system	Hoefer SE 250

วิธีการทดลอง

(1) การเตรียมโปรตีนจากเชื้อ *Bacillus subtilis* (MR10)

อ้างอิงจากกระบวนการที่ได้จากงานวิจัยเลขที่ RDG5350029 กล่าวโดยย่อคือ เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ในอาหารเหลว NB ปริมาณ 150 ml เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 °C เก็บสารละลายส่วนใส นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ให้มีเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวที่ร้อยละ 85 กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนโปรตีนที่ 10,000 rpm อุณหภูมิไม่เกิน 10 °C เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายกลับในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 15 ml จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปบรรจุลงในถุงไดอะไลซิสขนาด 12 kDa cut-off แล้วแช่ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 6 ชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซิสไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง โปรตีนที่ได้ให้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 10 °C หากต้องการนำมาใช้ก็จะทำการละลายกลับด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 50 ml ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนด้วยวิธีการที่อ้างอิงจาก Chantawannakul และคณะ (2002) และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Lowry's method และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

(2) การวัดกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

เอนไซม์โปรติเอสทั้งที่เตรียมเองและโปรติเอสในทางการค้า จะมีการวัดปริมาณในรูปของค่ากิจกรรมโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Chantawannakul และคณะ (2002) โดยใช้ Casein from bovine milk เป็นสับสเตรท วิธีการทำได้โดยเตรียมสารละลายผสม 4 หลอดได้แก่

หลอดที่ 1 (ES): สารละลายเอนไซม์ปริมาณ 1 ml + สารละลาย Casein from bovine milk เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ปริมาณ 1 ml

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

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

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

นำสารแต่ละหลอดไปปั่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid 2 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 8,000 rpm 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมา 0.5 ml เติม 0.4 M Na_2CO_3 2.5 ml และ Folin – Ciocalteu phenol reagent 0.5 ml ทิ้งไว้ 30 นาที

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 nm นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาปริมาณของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยของเอนไซม์โปรติเอส โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ tyrosine ที่เตรียมไว้แล้ว ทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์โปรติเอส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย tyrosine ออกมา 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่วิเคราะห์ และค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์คำนวณจากค่ากิจกรรมของโปรติเอส (unit/ ml)หารด้วยปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ (mg/ ml)

(3) การทดสอบผลของแอมโมเนียและโซเดียมซัลไฟต์ที่มีต่อการทำงานของโปรติเอส

ทำการเติมเอนไซม์โปรติเอสปริมาณ 500 ยูนิต ลงในสารละลายแอมโมเนียปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่ซึ่งเตรียมในความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.8% จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหลืออยู่ ในขณะที่ผลของโซเดียมซัลไฟต์ต่อประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอส ก็ทำการทดลองเหมือนกัน แต่ใช้สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้น 0-0.05%

(4) การทดสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสที่มีต่อเสถียรภาพทางกลของน้ำยางพาราสด

ทำการทดสอบเบื้องต้นหาความเสถียรทางกลของน้ำยางพาราสดด้วยเครื่องหา MST (Mechanical stability time) ยี่ห้อ Klaxon การทดลองนี้จะได้ทดลองเติมเอนไซม์ปริมาณ 500 ยูนิต

ในน้ำยาราสด 100 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ค่า MST ตามกระบวนการ แล้วเปรียบเทียบกับน้ำยาราสดที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอส

(5) การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยาราสดโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis

5.1 การเตรียมน้ำยาราสดโปรตีนต่ำและแผ่นฟิล์มยางสำหรับใช้ในงานวิจัย

ผสมน้ำยาราสดกับโปรติเอสในสัดส่วนโปรติเอส 500 ยูนิตต่อน้ำยาราสด 100 ml พร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 45 °C 6 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำยาราสด 3.0 กรัม ลงใน Petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่อน้ำยาราสดกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอจนทั่วจานแล้ว ก็ทำการอบที่อุณหภูมิ 45 °C จนกระทั่งแห้ง (น้ำหนักคงที่) ลอกแผ่นฟิล์มยางเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ระหว่างรอการวิเคราะห์ต่อไป

ทั้งนี้ฟิล์มยางดังกล่าว จะถูกเตรียมขึ้นทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่

- Control: น้ำยาราสด
- MR10: น้ำยาราสด + โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10
- PRO: น้ำยาราสด + โปรติเอส PROTEX7L (เอนไซม์ทางการค้า)

5.2 การสกัดโปรตีนจากแผ่นฟิล์มยาง

บันทึกน้ำหนักแผ่นฟิล์มยางแห้ง จากนั้นทำให้แข็งตัวด้วยการแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ทำการสกัดโปรตีนออกมาด้วยสารละลาย HEPES-Tris บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 mM pH 7.6 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ดังกล่าวประกอบไปด้วย 50mM HEPES-Tris (pH7.6) และเสริมด้วย 7M urea, 2M thiourea, 10 mM mercaptoethanol, 60 mM DTT, 4% CHAPS, 5mM EDTA-Na₂H₂O, 1% NP-40 และ 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride นำส่วนผสมเหล่านี้ไปเขย่าด้วยความถี่ที่สูงด้วยเครื่อง Sonicator เป็นเวลา 10 นาที และสุดท้ายจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเก็บสารละลายโปรตีน สารละลายโปรตีนดังกล่าวนี้ จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ระหว่างรอการวิเคราะห์ต่อไป

5.3 ทำการกำจัดสิ่งเจือปน

เพื่อให้ตัวอย่างเข้มข้นมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จะทำการกำจัดสิ่งเจือปนโดยใช้ 2-D Clean-Up Kit รุ่น Code No. 80-6483-51 (GE-Healthcare) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Micro assay ใช้ 2D-Quant Kit รุ่น Code No. 80-6483-56 (GE-Healthcare) ก่อนดำเนินการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่องมือ 2-D gel electrophoresis จากศูนย์เครื่องมือ หน่วยวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

5.4 การแยกโปรตีนมิติที่ 1 ด้วยวิธี IEF

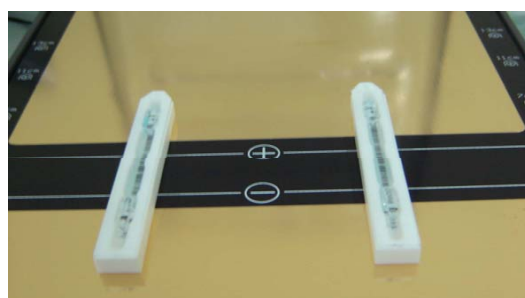
เตรียมสารละลายสำหรับทำ IEF ปริมาตร 125 µl ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนตัวอย่าง 6 µg, 20 mM DTT, 0.8% v/v IPG buffer และ rehydration stock solution จากนั้นถ่ายตัวอย่างลงไปใน strip holder ขนาด 7 cm ดังภาพที่ 1(A) จากนั้นปิดฝาของ strip holder แล้วนำไปวางบนเครื่อง

Ettan IPGphor II ดังภาพ 1(B) และดำเนินระบบดังโปรแกรมต่อไปนี้ เมื่อโปรแกรมสิ้นสุดจึงนำ strip ออกจาก strip holder ไปทำการแยกโปรตีนมิติที่ 2 ด้วยวิธี SDS-PAGE ต่อไป

Step 1 step and hold	150 V	200	V/hr
Step 2 step and hold	300 V	200	V/hr
Step 3 Gradient	1000 V	300	V/hr
Step 4 Gradient	5000 V	4500	V/hr
Step 5 step and hold	5000 V	6500	V/hr
Total		11,700	V/hr



(A)



(B)

ภาพที่ 1 การถ่ายสารละลายโปรตีนลงใน strip holder (A) และการวาง strip holder บนพื้นที่ electrode ของเครื่อง Ettan IPGphor II (B)

5.5 การแยกโปรตีนมิติที่ 2 ด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการ equilibrate IPG strip ก่อนทำ SDS-PAGE โดยแช่ IPG strip จากข้อที่ 1) ลงในสารละลาย DTT (0.05 g ใน SDS equilibration buffer 5 ml) จากนั้นย้ายมาล้างในสารละลาย IAA (1.25 g ใน SDS equilibration buffer 5 ml) แต่ละขั้นตอนจะทำการแช่เป็นเวลา 15 นาที แช่ IPG strip ที่ได้จากลงใน 1X SDS electrophoresis running buffer (tank buffer) เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อล้าง glycerol ที่เป็นองค์ประกอบใน SDS equilibration buffer ออก แล้ววาง strip ลงบน polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้ เตรียม protein marker ปริมาตร 0.75 μ l ลงบนกระดาษกรอง (ขนาด 3x5 mm) แล้วทิ้งไว้จนแห้ง จากนั้นวางกระดาษกรองลงตรงช่องว่างด้านซ้ายของ IPG strip แล้วปิดผิวหน้า IPG strip ด้วย agarose sealing solution และเริ่มดำเนินระบบ ดังภาพที่ 2 ด้วยโปรแกรมดังนี้

Step 1: current 10 mA/gel	0:15 hr
Step 2: current 20 mA/gel	1:30 hr
Max 150 V and 100 W	

เมื่อสิ้นสุดโปรแกรม จึงทำการย้อมสีเพื่อตรวจสอบผลการกระจายตัวของโปรตีน



ภาพที่ 2 การต่อเครื่อง mini VE เข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเพื่อทำ SDS-PAGE

(6). การทดสอบขึ้นรูปถุงมืออย่างทางการแพทย์

ทำการทดลองผลิตถุงมืออย่างทั้งสิ้น 4 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรจะมียุคประกอบพื้นฐานเหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่มีการบ่มด้วยเอนไซม์แตกต่างกัน ได้แก่

สูตรที่ 1 (Con) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมเอนไซม์)

สูตรที่ 2 (MR10) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 (500 ยูนิต/ น้ำยาง 100 มิลลิลิตร)

สูตรที่ 3 (PRO) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอส PROTEx7L (500 ยูนิต/ 100 มิลลิลิตร)

สูตรที่ 4 (SDS) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + SDS (0.2% by vol.)

น้ำยางพารา (น้ำยางชั้น 60% DRC) จะผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์และสารเคมีในแต่ละสูตร อย่างน้อย 6 ชั่วโมงก่อนที่นำไปผสมกับสารเคมีของสูตรพื้นฐาน แล้วขึ้นรูปต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1) นำน้ำยางคอมปาวด์ที่ผสมไว้แล้ว และทดสอบคลอโรฟอร์มได้ เบอร์ 3 ใส่ภาชนะที่จะใช้จุ่ม
- 2) ปิดภาชนะแล้วตั้งทิ้งไว้เพื่อให้ฟองอากาศลอยขึ้นมา ประมาณ 20 นาที
- 3) ปาดเอาฟองที่ลอยอยู่ข้างบนผิวน้ำยางออกไป
- 4) ล้างแบบพิมพ์ (หลังล้างแบบพิมพ์ห้ามใช้มือสัมผัส) แล้วนำไปอบให้แห้ง ปล่อยให้แห้ง
- 5) นำแบบพิมพ์จุ่มน้ำยางแช่ทิ้งไว้ 30 วินาที
- 6) ค่อย ๆ ยกขึ้น ตั้งทิ้งไว้ให้น้ำยางแห้งพอสมควร ๆ แล้วทำการจุ่มซ้ำอีกครั้ง เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส
- 7) เมื่ออบยางแห้ง นำแบบพิมพ์มาทาแป้งทาลัม เพื่อป้องกันยางติดกัน
- 8) แกะยางออกจากแบบพิมพ์

ถุงมืออย่างดังกล่าวนี้ จะถูกส่งไปวิเคราะห์คุณภาพเชิงกล ณ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กรุงเทพมหานคร โดยวิเคราะห์แรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ย (นิวตัน) ความยืดเมื่อขาดเฉลี่ย (ร้อยละ) ทั้งก่อนและหลังบ่มแรง นอกจากนี้ยังวัดค่าความหนาของถุงมือ ณ ตำแหน่งที่กำหนดโดยมาตรฐาน มอก. 538-2548

ตารางที่ 3 แสดงสูตรพื้นฐานที่ใช้ในการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์

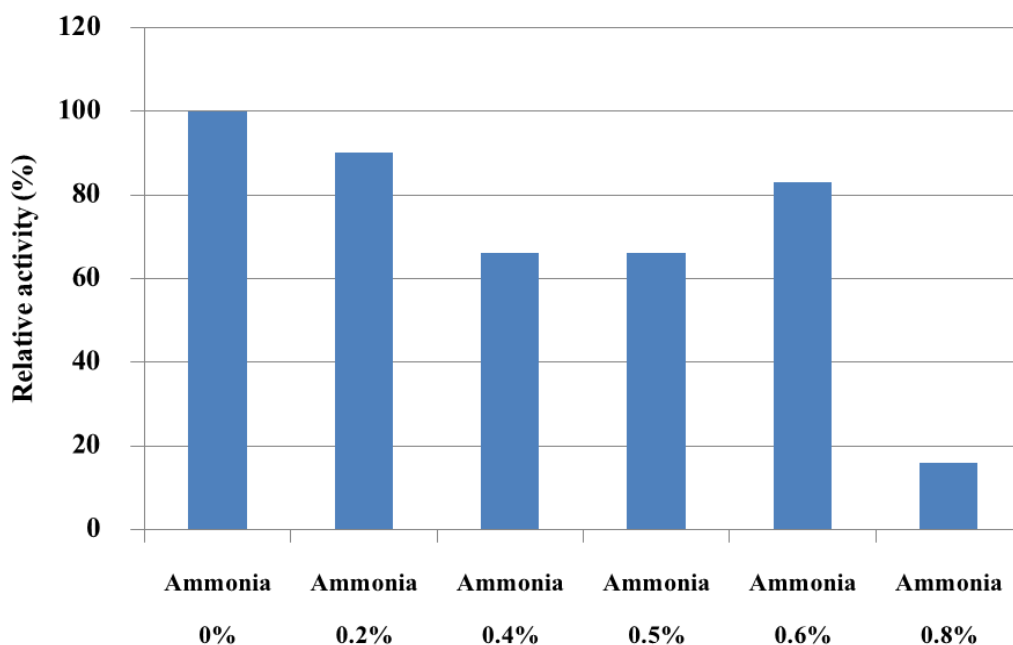
องค์ประกอบ	ปริมาณที่ใช้
น้ำยางชั้น 60%	167
20 % Potassium oleate	1
10 % KOH	3
50% กำมะถัน	0.4
50% TMTD	1
50% ZDEC	2
50% ZnO	0.5
50% Antioxidant	2

ผลการวิจัย

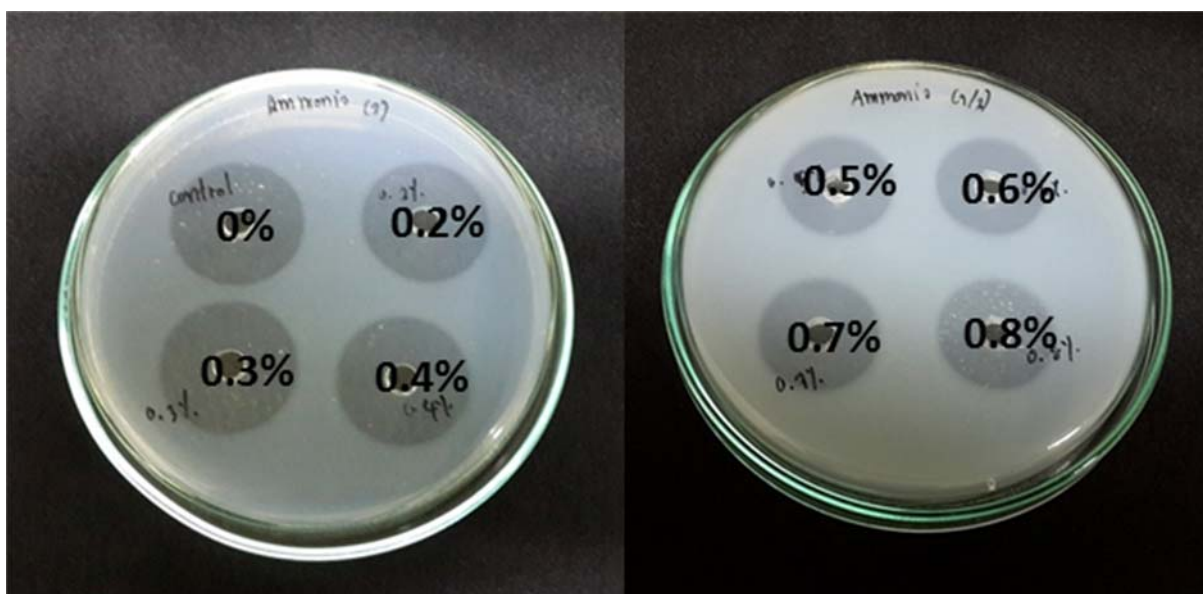
เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตขึ้นครั้งนี้ เป็นเอนไซม์ผงที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 100,000-120,000 Unit/กรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะประมาณ 150 unit/มิลลิกรัมของโปรตีน เอนไซม์โปรติเอสดังกล่าว ได้ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งผลการศึกษาที่มีดังต่อไปนี้

(1). ผลของแอมโมเนียและโซเดียมซัลไฟท์ที่มีต่อการทำงานของโปรติเอส

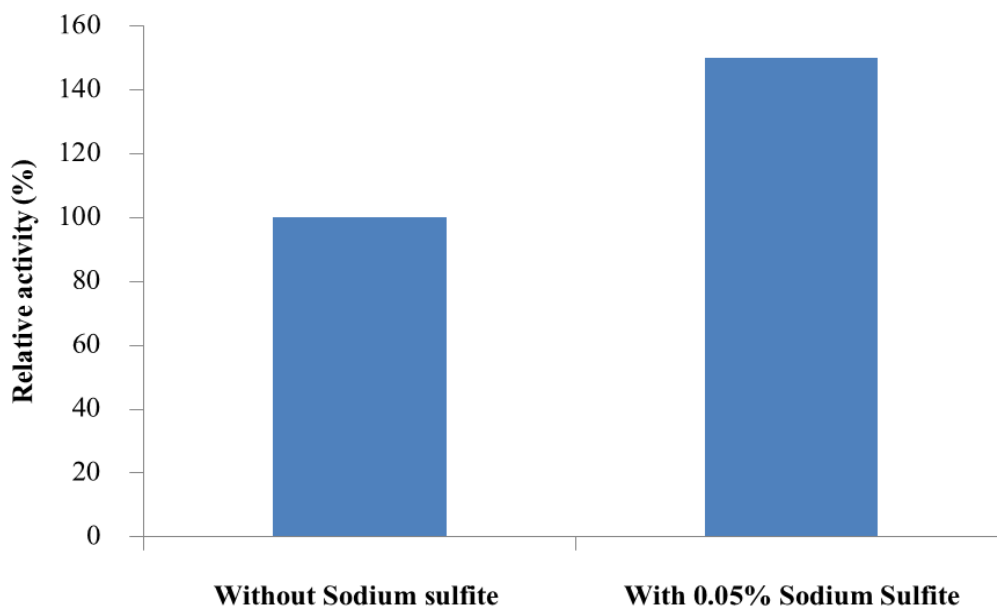
เนื่องจากรูปแบบการใช้งานของโปรติเอสในอุตสาหกรรมการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์นั้น คาดว่าจะทำการผสมลงในน้ำยางพาราสดและบ่มทิ้งไว้ ซึ่งน้ำยางพาราสดนี้จะมีการรักษาสภาพด้วยการเติมแอมโมเนียหรือโซเดียมซัลไฟท์ลงไป ดังนั้นจึงมีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในสถานะที่มีสารดังกล่าวเป็นส่วนผสม ผลการทดลองก็ได้แสดงดังภาพที่ 3 เห็นได้ว่าที่ระดับแอมโมเนีย 0.8% เอนไซม์เหลือความสามารถในการทำงานน้อยกว่า 20% เมื่อเทียบกับสภาพที่ไม่เติมแอมโมเนีย ซึ่งอาจเป็นเพราะค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงเกินไปจึงไม่สามารถทำงานได้เต็มที่ อย่างไรก็ตามถึงแม้ความสามารถในการทำงานจะลดลงแล้ว แต่ผู้วิจัยคาดว่าโครงสร้างเอนไซม์น่าจะยังคงสภาพอยู่ เพราะเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ดังกล่าว (ในสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 0.8%) มาหยดลงบนจานวุ้นที่ผสมโปรตีนเคซีน (pH 7.0) แล้วทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ก็พบว่าโปรตีนเคซีนถูกย่อยจนกระทั่งเห็นแต่วุ้นใส เหมือนกับการทำงานของโปรติเอสที่ไม่มีการเติมแอมโมเนีย ดังแสดงในภาพที่ 4 เหตุการณ์นี้ยืนยันว่าโปรติเอสยังคงสภาพอยู่และสามารถกลับมาทำงานได้อีกครั้งเมื่ออยู่ในสภาพ pH ที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตาม ในการปฏิบัติงานจริงผู้วิจัยเสนอว่า ไม่ควรใช้แอมโมเนียในการรักษาสภาพน้ำยางสด เพราะทำให้โปรติเอสทำงานได้ไม่เต็มที่ ในขณะที่กิจกรรมของโปรติเอสเมื่อใช้โซเดียมซัลไฟท์เป็นสารรักษาสภาพน้ำยางนั้น พบว่า โซเดียมซัลไฟท์กลับทำให้การทำงานของโปรติเอสสูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อนำมาหยดในวุ้นผสมเคซีน ก็พบว่าโปรติเอสสามารถทำงานได้ไม่แตกต่างกับโปรติเอสที่ไม่ผ่านการเติมโซเดียมซัลไฟท์ ดังแสดงในภาพที่ 6 ดังนั้นการรักษาสภาพน้ำยางในระหว่างการบ่มน้ำยางพาราสดร่วมกับเอนไซม์ควรใช้สารโซเดียมซัลไฟท์มากกว่าแอมโมเนีย



ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นระดับต่างๆ



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพการที่ย่อยเคซีนในวุ้นของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นระดับต่างๆ



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.05%



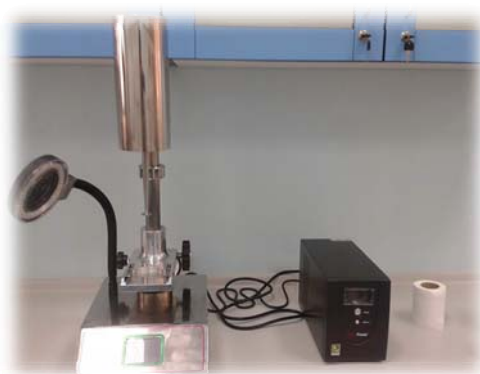
ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพการทำงานย่อยเคซินในวุ้นของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารละลายโซเดียมซัลไฟต์

(2). การทดสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสที่มีต่อเสถียรภาพทางกลของน้ำยางพาราสด

เอนไซม์โปรติเอสที่เติมลงไปในน้ำยางพาราสดอาจจะส่งผลให้น้ำยางเสียสภาพและไม่สามารถนำไปใช้งานได้ จึงมีการทดสอบเบื้องต้นหาความเสถียรทางกลของน้ำยางพาราสดเมื่อมีการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4 ที่พบว่าเอนไซม์ไม่ทำให้ค่า MST ของน้ำยางพาราลดลง ทั้งยังมีค่าสูงขึ้นกว่าน้ำยางที่ไม่เติมเอนไซม์ จึงอาจจะสรุปได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมขึ้นนี้ไม่ได้ปัจจัยที่ทำให้ น้ำยางพาราสดเสียสภาพ

ตารางที่ 4 แสดงค่า MST ของน้ำยางพาราสดที่เติมและไม่เติมเอนไซม์โปรติเอสลงไป

ตัวอย่าง	MST (Sec.)
น้ำยางพาราสด	50
น้ำยางพาราสด+โปรติเอส (500 U/100 ml)	74



(A)



(B)

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของเครื่องหาค่า MST ที่ใช้ (A) และลักษณะตามดที่เกิดขึ้นในน้ำยางพาราที่เริ่มเสียสภาพ (B)

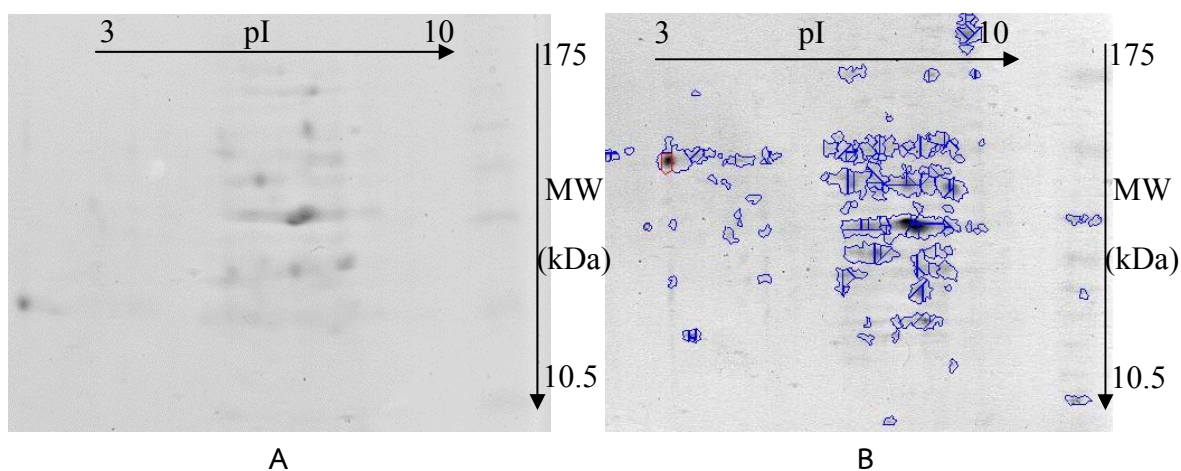
(3). การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis

การทดลองสกัดโปรตีนจากแผ่นฟิล์มยางพาราเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis นั้น พบว่าสารละลาย HEPES buffer มีประสิทธิภาพในการสกัดมากเมื่อเทียบกับการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ซึ่งเคยใช้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังแสดงในภาพที่ 8 โดยจะเห็นว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏจากการสกัดด้วย HEPES buffer มีความเข้มกว่าการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารสกัด สารละลายโปรตีนที่สกัดจากแผ่นฟิล์มยางพาราชนิดต่างๆ นี้ จะถูกนำไปสู่กระบวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ต่อไป ซึ่งผลการวิเคราะห์ก็แสดงดังภาพที่ 9-11 โดยจะเห็นได้ว่าน้ำยางพารามีโปรตีนชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบที่หลากหลาย โดยมีขนาดโมเลกุลและค่า pI ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ มีโปรตีนหลายชนิดที่มีปริมาณสูงจนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เมื่อทำการย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue (ภาพที่ 9A) เรียกโปรตีนกลุ่มนี้ว่า “high abundant proteins” ในขณะที่น้ำยางพาราที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอส MR10 จากงานวิจัยนี้ ก็จะพบว่าโปรตีนกลุ่ม high abundant ได้หายไปทั้งหมด (ภาพที่ 10A) เหลือเพียงโปรตีนบางชนิดในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ต้องใช้เครื่องมือ Image scanner ช่วยในการตรวจสอบ เรียกโปรตีนกลุ่มนี้ว่า “low abundant proteins” (ภาพที่ 10B) ซึ่งอาจเป็นเพียงโปรตีนที่ปนเปื้อนมากับสารละลายเอนไซม์โปรติเอส MR10 ก็เป็นไปได้ (เปรียบเทียบกับภาพ 9B) ผลการทดสอบดังกล่าวนี้ ค่อนข้างยืนยันได้ถึงประสิทธิภาพของโปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ว่าสามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางพารารวมถึงโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ โดยไม่จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ต่อไปด้วย เครื่องมือ MALDI-TOF MS เช่นเดียวกับการย่อยโปรตีนในน้ำยางพาราด้วยโปรติเอสในทาง

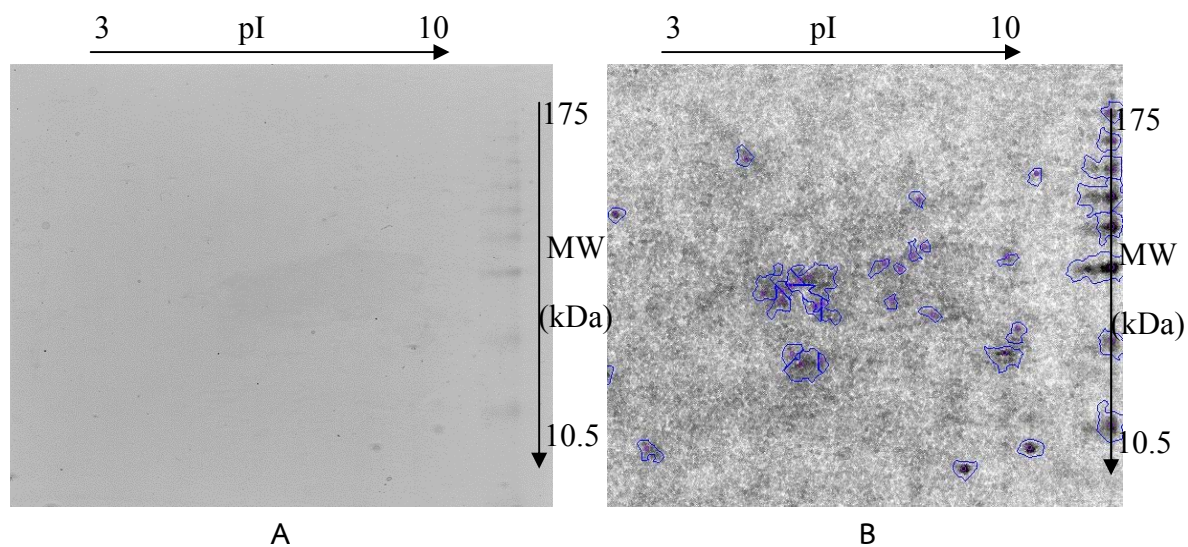
การค้ำ ที่ก็พบว่าประสิทธิภาพสูงใกล้เคียงกับโปรตีนจากแบคทีเรีย MR10 (ภาพที่ 11A) แต่ภาพจาก Image scanner ก็แสดงให้เห็นว่าพบโปรตีนชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้นมา (ภาพที่ 11B) ซึ่งอาจจะไม่ใช่โปรตีนจากน้ำยางพารา (เปรียบเทียบกับภาพ 9B) ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเป็นโปรตีนปนเปื้อนมาจากสารละลายเอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้ำเช่นกัน



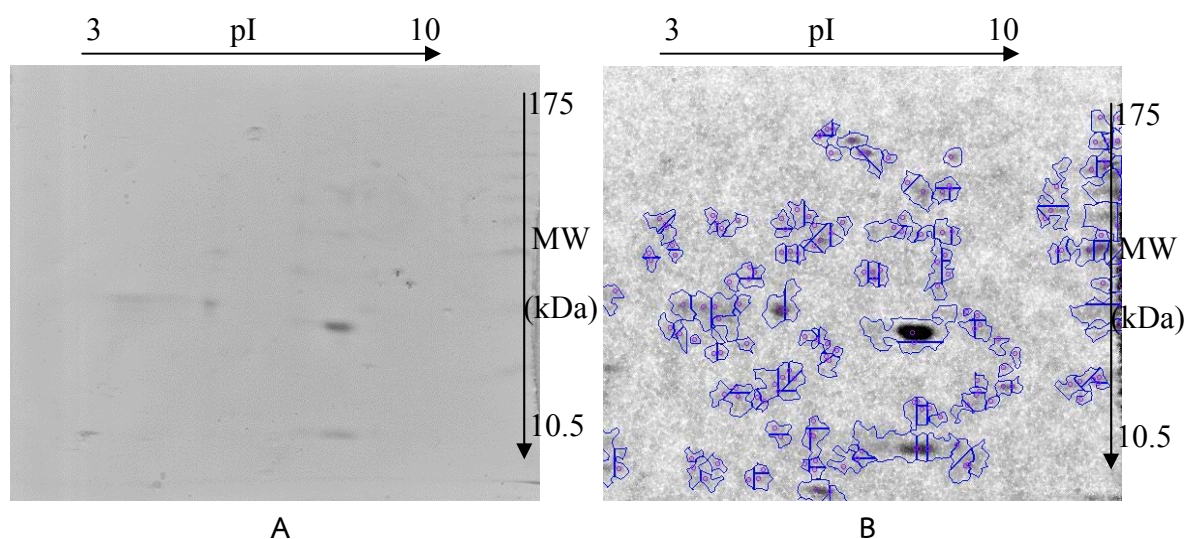
ภาพที่ 8 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากแผ่นฟิล์มยางที่ถูกสกัดด้วย HEPES และ Phosphate buffer



ภาพที่ 9 การกระจายตัวของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis โดย (A) คือภาพจากการย้อมสี (B) คือภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Image scanner



ภาพที่ 10 การกระจายตัวของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราที่บ่มด้วยโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis โดย (A) คือภาพจากการย้อมสี (B) คือภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Image scanner



ภาพที่ 11 การกระจายตัวของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราที่บ่มด้วยโปรติเอสทางการค้า (PROTEX7L) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis โดย (A) คือภาพจากการย้อมสี (B) คือภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Image scanner

(4). การขึ้นรูปถุงมืออย่างทางการแพทย์

ภายหลังทดลองผลิตถุงมืออย่างทางการแพทย์ด้วยน้ำยางขึ้นที่ผ่านการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสแล้วก็พบว่าสามารถขึ้นรูปถุงมืออย่างได้ ดังแสดงในภาพที่ 12 โดยถุงมือแต่ละสูตรก็มีลักษณะทางกายภาพไม่ว่าจะเป็นสี ความหนา ความยืดหยุ่น ที่แตกต่างกัน ดังบรรยายไว้ในตารางที่ 5 ซึ่งจะเห็นว่าน้ำยางที่ผ่านการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสทั้งจากงานวิจัยนี้และทางการค้าล้วนทำให้ได้ถุงมือที่มีความหนาน้อยกว่าสูตรพื้นฐานและสูตรที่เติมสาร SDS แต่ลักษณะความเหนียวและความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับถุงมือสูตรพื้นฐาน



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะของถุงมือที่ผลิตได้ด้วยสูตรต่างๆ

หมายเหตุ: สูตร CON : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมเอนไซม์)

สูตร MR10 : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

สูตร PRO : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอส PROTEX7L

สูตร SDS : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + SDS

ตารางที่ 5 การบรรยายลักษณะของถุงมือยางที่ผลิตได้ในแต่ละสูตร

สูตร	ค ว า ม ห น า (mm) $\pm$ SD	ลักษณะปรากฏ
สูตร 1 : สูตรพื้นฐาน	0.188 ± 0.014	ถุงมือมีความหนากว่าถุงมือที่มีวางขายในท้องตลาดและเหนียว
สูตร 2 : +โปรติเอส (MR10)	0.145 ± 0.008	ได้ถุงมือที่มีความหนาเทียบเท่ากับถุงมือที่มีวางขายในท้องตลาด และมีความเหนียว
สูตร 3 : +โปรติเอส (PROTEX7L)	0.149 ± 0.008	ได้ถุงมือที่มีความหนาเทียบเท่ากับถุงมือที่มีวางขายในท้องตลาด และมีความเหนียว
สูตร 4 : +SDS	0.295 ± 0.014	ได้ถุงมือที่มีความหนามากกว่าสูตรที่ 1 แต่สังเกตว่าไม่มีความเหนียวเท่าสูตรอื่นๆ และขาดง่ายกว่า

หมายเหตุ: ความหนาของถุงมือ ได้ทำการวัดที่ตำแหน่งฝ่ามือ และทำการวัดจำนวน 9 ตัวอย่าง



ภาพที่ 13 แสดงการวัดความหนาของถุงมือยางที่ผลิตได้

เมื่อนำถุงมือที่ผลิตขึ้นไปทำการวิเคราะห์ค่าแรงดึงที่จุดขาดและความยืดเมื่อขาด ณ กรมวิทยาศาสตร์บริการ ผลการวิเคราะห์ก็ได้แสดงดังตารางที่ 6 ซึ่งพบว่าแรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ยทั้งก่อนและหลังบ่มแรงของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอสของงานวิจัยนี้มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับถุงมือสูตรอื่นๆ ในขณะที่ค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยก่อนบ่มแรงของถุงมือทุกสูตรมีความแตกต่างกันแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่ภายหลังจากบ่มแรงแล้วค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยมีค่าสูงกว่าสูตรพื้นฐานและสูตรที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่บ่มร่วมกับโปรติเอสทางการค้า ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ข้อมูลก็ยังได้พบข้อมูลที่น่าสนใจอีกหนึ่งประการคือ ภายหลังจากบ่มแรงแล้วค่าแรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ยของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอส MR10 มีค่าเพิ่มสูงขึ้นในขณะที่สูตรพื้นฐานและสูตรที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่บ่มร่วมกับโปรติเอสทางการค้ากลับมีค่าที่ลดลง ค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยก็เช่นเดียวกัน ที่ถุงมือสูตรน้ำยางโปรตีนต่ำจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงสูตรเดียวที่มีค่าที่แทบจะไม่เปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 6 สรุปผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของถุงมือยางแต่ละสูตร

สูตร	แรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ย (นิวตัน)			ความยืดเมื่อขาดเฉลี่ย (ร้อยละ)		
	ก่อนบ่มแรง	หลังบ่มแรง	%ความแตกต่าง	ก่อนบ่มแรง	หลังบ่มแรง	%ความแตกต่าง
CON	10.5 ± 2.6 ^b	8.9 ± 3.3 ^b	-15.5	871.1 ± 45.2 ^a	816.1 ± 69.1 ^b	-6.37
MR10	4.2 ± 1.2 ^c	5.1 ± 0.87 ^c	+30.4	839.5 ± 34.7 ^a	839.4 ± 105.9 ^{ab}	+1.08
PRO	10.1 ± 1.7 ^b	9.1 ± 2.6 ^b	-9.6	859 ± 48.7 ^a	826.8 ± 36.2 ^b	-3.63
SDS	20.1 ± 4.2 ^a	20.9 ± 4.6 ^a	+5.6	880.7 ± 34.6 ^a	873.5 ± 52.4 ^a	-0.83

หมายเหตุ: สูตร CON : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมเอนไซม์)

สูตร MR10 : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

สูตร PRO : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอส PROTEX7L

สูตร SDS : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + SDS

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a, b, c, d}) หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

วิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์โปรติเอสเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถถูกทำให้เสียสภาพ (Denaturation) ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม สารเคมีก็เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ ดังนั้นเมื่อพิจารณาในกระบวนการผลิตถุงมือทางการแพทย์ซึ่งเป็นกลุ่มอุตสาหกรรมเป้าหมายที่จะนำโปรติเอสจากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้แล้ว ก็จะต้องพิจารณาการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปในน้ำยางพาราสดก่อนการปั่นเหวี่ยงเป็นน้ำยางข้น น่าจะเป็นขั้นตอนที่เหมาะสมที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม น้ำยางพาราสดนั้นจะต้องมีการเติมสารรักษาสภาพชนิดต่างๆ ลงไป ผลการศึกษาก็แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีแอมโมเนียสูง (High-ammonia; HA) 0.8% นั้น โปรติเอสจะมีประสิทธิภาพการทำงานที่ลดลง คาดว่าน่าจะเกิดจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงมากเกินไป (ประมาณ 11-12) ที่ทำให้โครงรูป (conformation) ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป แต่ในขณะที่โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 นี้ทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 6-7 ดังนั้นโซเดียมซัลไฟท์น่าจะเป็นสารรักษาสภาพน้ำยางที่เหมาะสมมากกว่าแอมโมเนีย เพราะไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอสให้สูงขึ้นด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Kunert (1992) และ Laba and Szczekala (2013)

โดยปกติแล้วน้ำยางพาราสดยังคงสภาพอยู่ได้ด้วยปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ (1) ชั้นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคยาง (2) อนุโมลของหมู่ Carboxylate บนพื้นผิว ที่ก่อให้เกิดการผลักกันของอนุภาคยาง (วรารณ, 2549) การเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไป จึงเกิดเป็นข้อกังวลว่าอาจทำให้น้ำยางพาราเสียสภาพก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตต่อไป อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองครั้งนี้ก็ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 นี้ ไม่ทำให้น้ำยางเกิดการเสียสภาพ ซึ่งมีหลายรายงานที่ได้กล่าวถึงการเติมเอนไซม์โปรติเอสเพื่อกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสด แต่ก็ไม่มีรายงานถึงการเสียสภาพของน้ำยางพารา ไม่ว่าจะเป็นรายงานของ ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์ (2540), Klinklai et al. (2003), Rattanasom et al. (2005), George et al. (2009) ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปยางพาราได้

ในการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราสดและน้ำยางพาราโปรตีนต่ำในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองให้ลดปัจจัยที่ก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนในประเด็นต่างๆ ผู้วิจัยตระหนักดีว่าน้ำยางพาราสดที่จะใช้เป็นตัวอย่างสำหรับตรวจวิเคราะห์นั้น ไม่สามารถจัดหาได้ตลอดทั้งปีและไม่สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน ผู้วิจัยจึงแก้ไขปัญหาด้วยการเตรียมน้ำยางพาราด้วยสูตรต่างๆ ให้เป็นรูปแบบฟิล์มบางเสียก่อน แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีตัวอย่างที่เพียงพอสำหรับศึกษาตลอดเวลา อีกทั้งจะเป็นที่ยอมรับว่าเป็นตัวอย่างชุดเดียวกันอีกด้วย แผ่นฟิล์มดังกล่าวที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร มีความหนาประมาณ 0.15 มิลลิเมตร ดังนั้นโปรตีนที่สกัดได้จากแผ่นฟิล์มยางก็จะเป็นโปรตีนทั้งจากชั้นซีรัมและอนุภาคนื้อยาง กระบวนการสกัดโปรตีนจากเนื้อยางทำให้ค่อนข้างยาก ซึ่งส่วนใหญ่ทำได้โดยการใช้สารละลาย PBS หรือ TES บัฟเฟอร์เป็นสารสกัดตามวิธีมาตรฐานของ ISO 12243:2003 แต่ในมาตรฐานของ ASTM D5712-95 ให้ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นสารสกัด (พร้อมศักดิ์, 2550; Yeang et al., 2004) แต่ผู้วิจัยพบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากการใช้สารเหล่านี้มีค่อนข้างน้อย จึงได้มีการดัดแปลงเทคนิคการสกัดจากวิธีการของ Xiang et al. (2012) พร้อมกับการเพิ่มอัตราการสกัดจากการเพิ่มพื้นที่แผ่นฟิล์มยางด้วยการแช่ในไนโตรเจนเหลวและบดด้วยโกร่ง ด้วยเทคนิคเหล่านี้ จึงทำให้สามารถสกัดโปรตีนจากฟิล์มได้สูงกว่า 3-4 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้ PBS และน้ำเป็นสารสกัด ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้ก็มีความมั่นใจที่สูงขึ้นว่าเป็นตัวอย่างโปรตีนทั้งหมดที่พบได้ในน้ำยางพารา

เมื่อพิจารณาที่คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของถุงมือทางการแพทย์ที่ผลิตขึ้นจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่ผ่านการบ่มด้วยโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 เทียบกับมาตรฐานถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว (มอก. 538-2548) ก็พบว่ากระบวนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการนี้ ที่ซึ่งได้มีการควบคุมปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSC) และเวลาในการจุ่มของแต่ละสูตร ทำให้ได้ความหนาทึบที่สูงกว่ามาตรฐานประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ แม้ไม่ได้เติมสารช่วยจับตัว (coagulants) ก็ตาม ค่าความยืดเมื่อขาดก่อนและหลังบ่มแรงสูงกว่ามาตรฐานประมาณ 20 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ค่าแรงดึงเมื่อขาดก่อนและหลังบ่มแรงกลับต่ำกว่ามาตรฐานประมาณ 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ถุงมือสูตรพื้นฐานและสูตรที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอสทางการค้านี้ก็มีค่าแรงดึงเมื่อขาดทั้งก่อนและหลังบ่มที่ต่ำกว่ามาตรฐานเช่นกัน แต่ต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย ผู้วิจัยคาดว่าค่าที่ต่ำกว่ามาตรฐานนี้อาจจะเกิดจากเทคนิคการขึ้นรูปถุงมือยางของผู้วิจัยเองที่ยังไม่เชี่ยวชาญ แต่ข้อมูลที่น่าสนใจที่พบได้จากผลการวิเคราะห์นี้คือ ค่าความยืดเมื่อขาดของถุงมือที่ผลิตจากการบ่มด้วยโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 นั้นแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงภายหลังการบ่มแรง ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในถุงมือสูตรใดในการทดลองครั้งนี้ รวมทั้งรายงานอื่นๆ เช่น ไพโรจน์และพรสิทธิ์ (2540) ที่ก็พบว่ายางโปรตีนต่ำที่ผลิตขึ้นจากการเติมเอนไซม์โปรติเอส (alkalase) ก็มีค่าความยืดเมื่อขาดที่ลดลงภายหลังการบ่มแรง นี่อาจจะเป็นข้อดีของการใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือยาง หรืออาจจะเนื่องมาจากการบวนการอบเพื่อขึ้นรูปถุงมือยางยังไม่สมบูรณ์ (Under cure) ก็เป็นได้ ทั้งนี้กระบวนการพัฒนาคุณภาพถุงมือยางที่ใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ร่วมในกระบวนการผลิตยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยครั้งนี้รวมถึงผลงานวิจัยที่ผ่านมา (RDG5650082) สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 มีความสามารถในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นๆ นั้นก็พบว่าสามารถถูกกำจัดได้เช่นเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าน้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่ผลิตด้วยโปรติเอสชนิดนี้มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งานอีกทั้งไม่ทำให้น้ำยางพาราเสียสภาพ แต่ถ้ามองอย่างทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำยังมีคุณสมบัติด้านความหนา แรงดึงที่จุดขนาดเฉลี่ย และความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยที่ต่ำกว่ามาตรฐานถ่มมือปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว (มอก. 538-2548) ซึ่งต้องมีพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่อไป

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

ควรมีการวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรถ่มมือยางที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเป็นไปตามมาตรฐานต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- พร้อมศักดิ์ สงวนอำมรงค์. “การเปรียบเทียบวิธีทดสอบมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในผลิตภัณฑ์จากน้ำยาง: วิธีไหนดีที่สุด” *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการยาง*, 2550, 1, 18-22.
- ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ และ พรสิทธิ์ วงศ์บุญทริก. “การเตรียมและสมบัติบางประการของยางโปรตีนต่ำ”. *วารสารสงขลานครินทร์*, 19(2540): 223-229.
- วรารณ ขจรไชยกุล. 2549. ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ซีโน ดีไซน์, กทม.
- 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. *ScienceAsia* 28: 241-245.
- George, K.M., Alex, R., Joseph, S. and Thomas, K.T. 2009. Characterization of enzyme-deproteinized skim rubber. *Journal of Applied Polymer Science* 114: 3319-3324.
- 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.

- Kunert, J. 1992. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses* 35: 343-348.
- Laba, W. and Szczekala, K.B. 2013. Keratinolytic proteases in biodegradation of pretreated feathers. *Pol. J. Environ. Stud.* 22: 1101-1109.
- Rattanasom, N., Thammasiripong, U. and Suchiva, K. 2005. Mechanical properties of deproteinized natural rubber in comparison with synthetic *cis*-1,4 polyisoprene vulcanizates: gum and black-filled vulcanizates. *Journal of Applied Polymer Science* 97: 1139-1144.
- Palosuo, T. 1997. Latex allergens. *Rev. fr. Allergol.* 37: 1184-1187.
- Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.
- Posch, A., Chen, Z, Wheeler, C., Dunn, M.J., Raulf-Heimsoth, M. and Baur, X. 1997. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis protein microsequencing. *J Allergy Clin Immunol.* 99:385-395.
- Raulf-Heimsoth, M., Posch, A. Chen, Z. and Baur, X. 1997. Cross-reactivity between natural rubber latex and food allergens. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 4: 169-173.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Kurup, V.P. 2002. Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol.* 110: S33-S39.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Liss, G. 2002. Latex allergy: historical perspective. *Methods* 27: 3-9.
- Tomazic, V.J. and Lucas, A.D. 2002. Protein and allergen assays for natural rubber latex products. *J Allergy Clin Immunol.* 110: S40-S46.
- Tomazic, V.J., Withrow, T.J. and Hamilton, R.G. 1995. Characterization of the allergen(s) in latex protein extracts. *J Allergy Clin Immunol.* 95: 635-642.
- Yagami, T., Sato, M., Nakamura, A., and Shono, M. 1995. One of the rubber latex allergens is a lysozyme. *J Allergy Clin Immunol.* 96: 677-686.
- Yeang, H.Y., Arif, S.A.M., Yusof, F., and Sunderasan, E. 2002. Allergenic proteins of natural rubber latex. *Methods* 27: 32-45.
- Yeang, H., Arif, S.A.M. Raulf-Heimsoth, M., Loke, Y., Sander, I., Sulong, S.H., Lau, C. and Hamilton, R.G. 2004. Hev b 5 and Hev b 13 as allergen markers to estimate the allergenic potency of latex gloves. *J Allergy Clin Immunol.* 114: 593-598.
- Ylitalo, L., Alenius, H., Turjanmaa, K., Palosuo, T., and Reunala, T. 1998. IgE antibodies to prohevein, and rubber elongation factor in children with latex allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 102: 659-664.
- Xiang, Q, Xia, K., Dai, L., Kang, G., Li, Y., Nie, Z., Duan, C. and Zeng, R. 2012. Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasiliensis* using 2D-DIGE. *Plant Physiology and Biochemistry* 60: 207-213

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผน กิจกรรมที่ดำเนินการ และผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อศึกษาการมีอยู่ของโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ ในยางโปรตีนต่ำที่เตรียมขึ้นโดยโปรติเอส จาก <i>Bacillus subtilis</i> MR10	1. วิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราสดและน้ำยางพาราโปรตีนต่ำโดยเทคนิค 2D gel electrophoresis	- ผลิตเอนไซม์โปรติเอส - ผลิตน้ำยางโปรตีนต่ำโดยบ่มร่วมกับโปรติเอส - สกัดโปรตีนจากยางพาราที่เตรียม - วิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิค 2D gel electrophoresis	พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมขึ้นครั้งนี้ มีความสามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสดจริง
2. เพื่อทดสอบสมบัติของถุงมือทางการแพทย์ที่เตรียมจากยางโปรตีนต่ำซึ่งเตรียมโดยใช้โปรติเอส จาก <i>Bacillus subtilis</i> MR10 ตามที่มาตรฐานกำหนด	1. ผลิตถุงมือทางการแพทย์โดยใช้น้ำยางพาราที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอส	- ผลิตถุงมือทางการแพทย์โดยใช้น้ำยางพาราชั้นที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอส และถุงมือสูตรอื่นๆ	- ได้ถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำซึ่งบ่มด้วยโปรติเอสจากเชื้อ MR10 และสูตรอื่นๆ รวมทั้งสิ้น 4 สูตร
	2. วิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลบางประการของถุงมือยาง	- วัดความหนาของถุงมือ - วัดค่าแรงดึงเมื่อขาดทั้งก่อนและหลังบ่มของถุงมือ - วัดค่าความยืดเมื่อขาดทั้งก่อนและหลังบ่มของถุงมือ	- ความหนาของถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำซึ่งบ่มด้วยโปรติเอสจากเชื้อ MR10 มีค่าใกล้เคียงกับมาตรฐาน มอก.538-2548 - ค่าแรงดึงเมื่อขาดของถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำซึ่งบ่มด้วยโปรติเอสจากเชื้อ MR10 มีค่าต่ำกว่ามาตรฐาน มอก.538-2548 - ค่าความยืดเมื่อขาดของถุงมือที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำซึ่งบ่มด้วยโปรติเอสจากเชื้อ MR10 มีค่าสูงกว่ามาตรฐาน มอก.538-2548

ภาคผนวก 2

ตอบความเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิในการประเมินร่างรายงานฉบับสมบูรณ์

1. โดยรวมแล้วผลงานที่ได้นี้เป็นงานที่น่าท้าทายเพียงไร มีความยาก-ง่ายระดับใด และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่านักวิจัยได้ใช้ความอุตสาหพยายามเพียงไร

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
-		

2. เมื่อเทียบกับวัตถุประสงค์และ output (โปรดดูเอกสารแนบ 1 ท้ายสัญญา) ท่านพบว่าโครงการวิจัยได้

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
-		

3. ท่านมีความเห็นต่อคุณภาพของร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ในประเด็นต่าง ๆ ดังนี้

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. ต้องตรวจสอบการสังเคราะห์ข้อมูลใหม่ให้ถูกต้องตามหลักวิชาการ คือ 1.) ค่า tensile หลังการบ่มแรงที่เพิ่มสูงขึ้นไม่น่า (ทางวิชาการ) เกี่ยวกับ enzyme โดยปกติอาจเนื่องมาจากถุงมือ undercuse และ 2.) ทบทวนการวิจารณ์ผลเรื่องความหนาใหม่เพราะปกติความหนาของ film ยางเกี่ยวข้องกับ TSC ของน้ำยางและ/หรือจากการแช่พิมพ์(dwelling time) ในการจุ่มน้ำยาง 2. ความแม่นยำถูกต้อง ยังไม่น่าถูกต้องเพราะยังไม่ได้มีการ repeat และทดลองแปรสูตรส่วนผสมของ compound latex?	-ได้มีการระบุเพิ่มเติมในวิจารณ์ผลการทดลองเรียบร้อยแล้ว เช่น “.....ก็จะพบว่ากระบวนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการนี้ ที่ซึ่งได้มีการควบคุมปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (TSC) และเวลาในการจุ่มของแต่ละสูตร ทำให้ได้ความหนาที่ยิ่งสูงกว่ามาตรฐานประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์” -ผู้วิจัยรับทราบ และหากมีโอกาสทำวิจัยครั้งต่อไปก็จะได้ให้ความสำคัญในข้อนี้ให้มากขึ้น	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และสั่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

4. ความสมบูรณ์ของรายงาน

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. บทคัดย่อ สรุปล้นๆ โดยที่ไม่มีตัวชี้วัดเลยทำให้ขาดความเชื่อถือ ไม่สามารถนำไปอ้างอิงในงานวิจัยอื่นๆ ได้เลย 2. ควรทบทวนความเห็นข้อ 3 และปรับแก้ให้เหมาะสม/ ถูกต้อง ตามวิชาการเทคโนโลยีนี้บ้างในทุกๆ หน้า/ ส่วนที่เกี่ยวข้องกับประเด็นความเห็นข้อ 3 3. บทคัดย่อ บรรทัดที่ 3 ควรระบุไปเลยว่า ศึกษาสมบัติเชิงกล เรื่องอะไร ผู้วิจัยเขียนว่า บางประการ ไม่ควรอยู่ในบทคัดย่อ บทคัดย่อต้องชัดเจนว่าทำอะไรบ้าง ผลเป็นอย่างไรและต้องระบุ การทดสอบด้วยว่าเป็นการทดสอบถุงมือประเภทใดใน ABSTRACT บรรทัดที่ 9 ผู้วิจัยใช้ average tear strength ซึ่งไม่ตรงกับภาษาไทย 4. ความสำคัญ.....บรรทัดที่ 17 ..ในการศึกษาสมบัติทางกายภาพ ควรแก้เป็น สมบัติเชิงกล เพราะแรงดึงเป็นสมบัติเชิงกล 5. วัตถุประสงค์ ข้อ 2 ให้ระบุมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบไปเลย ว่าเป็นการทดสอบตามมาตรฐานตามมาตรฐานถุงมือปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรม.... 6. วัตถุประสงค์ในหน้า 9 วัตถุประสงค์ข้อ 2 ควรระบุว่าศึกษา สมบัติของถุงมือทางการแพทย์ประเภทใด และระบุมาตรฐานที่ใช้ด้วย 7. วิธีการทดลอง ในการทดลองถ้าเป็นมาตรฐานการทดลองที่ดี ควรระบุ tolerance ของวิธีที่ใช้ เช่น กำหนดอุณหภูมิที่เท่าใด	- มีการเพิ่มเติมข้อมูลในบทคัดย่อเป็นที่เรียบร้อยแล้ว -แก้ไขเรียบร้อยแล้ว -แก้ไขเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มประเด็นที่ทดสอบ และแก้ไข average tear strength เป็น tensile และ elongation at break -แก้ไขแล้ว -แก้ไขแล้ว -แก้ไขแล้ว -กรณีนี้ไม่สามารถระบุ $\pm$ ได้ เนื่องจากไม่ได้มีมาตรฐานกำหนดไว้ และไม่ได้ศึกษาด้วย ดังนั้น	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ให้บอก $\pm$ ด้วย จะได้ทราบว่าจุดไหนต้องการความแม่นยำของอุณหภูมิระดับใด เช่นในบรรทัดที่ 5 ควรทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หากเครื่องมือที่ใช้ไม่ได้รับการสอบเทียบ เมื่ออุณหภูมิ 4°C แล้วปรากฏว่าจริงๆ แล้วไม่ใช่ 4°C แต่เป็น 5°C หรือ 6°C ผลการทดสอบจะเปลี่ยนไปหรือไม่ อุณหภูมิ ณ จุดนี้มีความสำคัญมากน้อยเพียงใด ดังนั้นการบอก $\pm$ จะบอกได้ว่าจุดนั้นสำคัญต่อผลการทดสอบเพียงใด เพราะ $\pm 1^{\circ}\text{C}$ กับ $\pm 3^{\circ}\text{C}$ ก็ต่างกันมาก ดังนั้นการเขียนวิธีการทดสอบต้องระวังเรื่องนี้ให้มาก 8. การทดสอบขึ้นรูปถุงมือยาง... ควรระบุด้วยว่าผลิตถุงมือยาง 4 สูตรนั้น สูตรละกี่ชิ้น ผู้วิจัยแน่ใจได้อย่างไรว่าจำนวนชิ้นที่ผลิตเพียงพอต่อความน่าเชื่อถือ 9. สรุปผลการวิจัย ควรจะละเอียดไม่ใช่พูดไม่ชัดเจนอย่างที่ผู้วิจัยเขียน... สมบัติบางประการคืออะไร ควรจะบอกไปเลยว่าสมบัติอะไร 10. การวิจารณ์ผลการทดลอง ถ้าผู้วิจัยคาดว่าผลการทดสอบต่ำกว่ามาตรฐานอาจจะเกิดจากเทคนิคการขึ้นรูป นั่นจะทำให้ผลการวิจัยไม่น่าเชื่อถือเลย เพราะไม่อาจสรุปได้ว่าค่าต่างๆ ที่ได้ถูกต้อง การเตรียมวัสดุตัวอย่างที่นำมาทดสอบเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เพราะผลการทดสอบต่างๆ จะใช้ไม่ได้เลยหากการเตรียมตัวอย่างมายังไม่ถูกต้อง ฉะนั้นผู้วิจัยต้องเตรียมถุงมือที่มาทดสอบให้มั่นใจได้ว่าถุงมือออกมาทดสอบมีการทำที่	จึงแก้ไขข้อมูลเป็น “อุณหภูมิไม่เกิน 10°C” แทน - จำนวนชิ้นที่ส่งไปทดสอบ เป็นไปตามมาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์บริการ ดังนั้นน่าจะเป็นที่เชื่อถือได้ - ได้เพิ่มเติมรายละเอียดเรียบร้อยแล้ว - ผู้วิจัยรับทราบ และจะได้นำไปปรับปรุงงานวิจัยครั้งต่อไป	

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ถูกต้อง เชื่อถือได้		

5. ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม (เช่น ประเด็นที่ควรทำเพิ่ม, การขยายผลด้านผู้ใช้ ฯลฯ)

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
ควรทำการวิจัยอีกในหลายประเด็น เพื่อนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้ 1. วิธีพัฒนาศักยภาพการวัดโปรตีนที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ได้รวดเร็วถูกต้อง 2. การผลิตน้ำยางข้นที่ใช้เอนไซม์ลดปริมาณโปรตีนให้ได้ตามมาตรฐานน้ำยางข้น 3. การผลิตถุงมือที่มีโปรตีนต่ำให้ได้ตามมาตรฐานสากล 4. ศึกษากระบวนการสภาพน้ำยางสดให้เหมาะสมกับงานใช้เอนไซม์ของเรา 5. การผลิตถุงมืออย่างให้ได้มาตรฐานต้องศึกษาปัญหาและเทคนิคการผลิตจริงหลายๆ ครั้ง จึงจะได้ความแม่นยำ ข้อดี ข้อด้อย 6. ควรทดลองเพิ่มเติมโดยนำเทคโนโลยีน้ำยางที่มีประสบการณ์ด้านการจุ่มถุงมืออย่าง	ผู้วิจัยรับทราบ และขอขอบคุณในคำแนะนำทุกประเด็น	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

6. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ความเห็นผู้ทรงคุณวุฒิ	คำชี้แจงของนักวิจัย	การจัดการของผู้ประสานงาน
1. ผลงานวิจัยมีแนวโน้มว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ ใช้ผลิตน้ำยางชั้น และถุงมือที่มีโปรตีนภูมิแพ้ในยางต่ำ ศักยภาพวิจัยหลายๆ ปัญหา เพื่อนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ที่มีมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อไป และเกี่ยวข้องในการกำหนดมาตรฐานน้ำยางชั้นที่มีโปรตีนภูมิแพ้ต่ำ 2. ผลงานวิจัยมีแนวโน้มว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ ผู้วิจัยต้องเตรียมถุงมือที่นำมาทดสอบให้ดี	-	☐ ชี้แจงได้กระจ่างและเห็นชอบตามคำชี้แจงของนักวิจัย ☐ ชี้แจงไม่กระจ่าง ให้ความเห็นไม่ได้และ ส่งให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาใหม่แล้ว ซึ่งผู้ทรงคุณวุฒิเห็นชอบด้วยแล้ว ☐ นักวิจัยแก้ไขตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ

ภาคผนวก 3
โปสเตอร์เผยแพร่งานวิจัย

คุณสมบัติเชิงชีวภาพและกายภาพของยางโปรตีนต่ำที่เตรียมโดยใช้โปรติเอสจากแบคทีเรีย

Bacillus subtilis MR10

Biological and physical properties of deproteinized rubber prepared by

Bacillus subtilis MR10 protease

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน^{1*}, สุทธิพร นันดี¹, ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์², เอกวิทย์ ตรีเนตร³

¹ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

² สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

³ สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

*Corresponding author: pairote@mju.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพาราสดที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 โดยใช้เทคนิค 2D gel electrophoresis และเพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของถุงมือยางทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางพาราโปรตีนต่ำ ได้แก่ ความหนา แรงดึงที่จุดขาด ฉีก และความยืดเมื่อขาดฉีก ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสดได้อีกทั้งไม่ทำให้ค่าความเสถียรของน้ำยางพาราลดลง แต่ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนจะลดลงเหลือเพียง 20 % เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแอมโมเนียความเข้มข้น 0.8% โดยปริมาตร เป็นสารรักษาสภาพน้ำยาง แต่ในขณะที่สารโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนัก ไม่ทำให้ประสิทธิภาพเอนไซม์ลดลง เมื่อทดลองขึ้นรูปถุงมือยางพาราด้วยน้ำยางชั้นที่บ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสแล้วทำการศึกษาคุณสมบัติบางประการของถุงมือยาง ก็พบว่าแรงดึงที่จุดขาดฉีกทั้งก่อนและหลังบ่มแรงของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอสของงานวิจัยนี้มีค่าต่ำกว่ามาตรฐาน มอก. 538-2548 แต่ความหนาและค่าความยืดเมื่อขาดของถุงมือมีค่าสูงกว่ามาตรฐาน ดังนั้นกระบวนการพัฒนาคุณภาพถุงมือที่ใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ร่วมในกระบวนการผลิตจึงยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไป

ABSTRACT

This research aimed to analyze the remaining of allergenic proteins in natural rubber latex that was co-incubated with protease produced from *Bacillus subtilis* MR10 using 2D gel electrophoresis technique. Moreover, to study some properties of medical gloves produced from deproteinized natural rubber latex; i.e. tensile and elongation at break, was another objective. The results showed that this protease could be able to eliminate rubber proteins; furthermore, the mechanical stability time (MST) of rubber latex was not decreased. However, only 20% of protease activity was remained, when exposed in 0.8% by vol. of ammonia as latex-stabilizing agent. But 0.05% by wt. of sodium sulfite could not effect to protease activity. Medical gloves were produced using concentrated rubber latex that was co-incubated with protease and some mechanical properties were investigated. It was found that average tensile and elongation at break of both before and after aging were lower than the Thai Industrial Standard (มอก. 358-2548). However, their thickness and average elongation at break of both before and after aging were higher than standard. Thus quality development of medical gloves produced by *B. subtilis* MR10 protease need to be improved.

บทนำ

โปรตีนหลายชนิดที่อยู่ในน้ำยางพาราสามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ (Allergy) ขึ้นแก่ผู้สวมใส่ผลิตภัณฑ์พาราโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถุงมือยาง โดยอาการแพ้มีทั้งแบบเฉียบพลันและค่อยเป็นค่อยไป (ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์, 2540) อาการมีตั้งแต่เพียงระคายเคืองเมื่อสวมใส่ถุงมือ (Irritant contact dermatitis) ไปจนถึงอาการที่เรียกว่า anaphylaxis ซึ่งมีความรุนแรงมาก (Sussman et al., 2002) ดังนั้น ในกระบวนการผลิตจึงต้องกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกเสียก่อน วิธีการกำจัดโปรตีนมีตั้งแต่การล้างด้วยน้ำเปล่า แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนเหล่านี้ออกไปได้หมดเสียทีเดียว มีรายงานว่าโปรตีนบางชนิดในน้ำยางธรรมชาติสามารถถูกทำลายได้โดยการปรับสภาพให้เป็นต่างแก่ เช่น การเติมแอมโมเนีย แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของโปรตีนในน้ำยางจะทำให้เกิดผลกระทบต่อคุณสมบัติกายภาพของน้ำยางได้ (Moris and Lakin, 1995 อ้างโดย Perrella and Gaspari, 2002) ปัจจุบันวิธีที่ใช้กำจัดโปรตีนคือ การนำน้ำยางดิบไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนซีรัมทิ้งไป แต่ก็ไม่สามารถกำจัดโปรตีนส่วนที่เกาะกับอนุภาคยางออกไปได้ ชำยังทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำยางขึ้นเพิ่มขึ้นจาก 25 เปอร์เซ็นต์เป็น 50 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย (Perrella and Gaspari, 2002) ผู้วิจัยจึงได้เสนอวิธีการใช้เอนไซม์โปรติเอส (Proteases) เข้าช่วยในการกำจัดโปรตีนในน้ำยางเนื่องจากสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้งในส่วน serum และ rubber phase โดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* แต่อย่างไรก็ตามแม้โปรติเอสจะสามารถย่อยโปรตีนได้มากเพียงใด แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าโปรติเอสไม่มีความจำเพาะ (Specificity) ต่อโปรตีนภูมิแพ้ที่สนใจ ทำให้โปรตีนภูมิแพ้เหล่านี้อยู่คงค้างอยู่ในน้ำยางพารา ดังนั้นเพื่อพิสูจน์ข้อสงสัยดังกล่าวจึงควรมีการตรวจสอบการหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้ภายหลังการบ่มน้ำยางพาราสดร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส

จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาได้มุ่งใช้เทคนิค Western blot ในการวิเคราะห์การหลงเหลือของโปรตีนภูมิแพ้บางชนิด ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ก็แสดงให้เห็นแล้วว่าโปรติเอสจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ แต่โปรตีนชนิดอื่นๆ ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าถูกกำจัดได้หรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นในการศึกษาเพิ่มเติมถึงการมีอยู่ของโปรตีนชนิดอื่นๆ ด้วยเทคนิค two-dimensional gel electrophoresis นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้วางแผนในการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพที่สำคัญบางประการของถุงมือยางทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำนี้ด้วยด้วยแผนดำเนินงานทั้งหมดดังกล่าวนี้ คาดว่าจะช่วยให้สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 นี้สามารถใช้เตรียมยางโปรตีนต่ำที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้และมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับยางทั่วไปได้หรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เชื้อจุลินทรีย์

Bacillus subtilis MR10

2. น้ำยางพารา

น้ำยางพาราสดได้รับความอนุเคราะห์มาจากสวนยางในพื้นที่อำเภอพร้าวจังหวัดเชียงใหม่ ส่วนน้ำยางข้น (60% DRC) ซื้อจากบริษัท ลักกี้โฟร์ จำกัด จังหวัดนนทบุรี

3. การเตรียมโปรติเอสจากเชื้อ *B. subtilis* MR10

อ้างอิงจากกระบวนการที่ได้จากงานวิจัยเลขที่ RDG5350029 กล่าวโดยย่อคือ เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* (MR10) ในอาหารเหลว NB ปริมาณ 150 ml เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บสารละลายส่วนใส นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวที่ร้อยละ 85 กวนทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายกลับในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 15 ml จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปบรรจุลงในถุงไดอะไลซิสขนาด 12 kDa cut-off แล้วแช่ในสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุกๆ 6 ชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ในถุงไดอะไลซิสไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง โปรติเอสผงที่ได้ให้นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C หากต้องการนำมาใช้ก็จะทำการละลายกลับด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 mM pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 50 ml ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอสด้วยวิธีการที่อ้างอิงจาก Chantawannakul และคณะ (2002) และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Lowry's method และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

4. การทดสอบผลของแอมโมเนียและโซเดียมซัลไฟต์ที่มีต่อการทำงานของโปรติเอส

ทำการเติมเอนไซม์โปรติเอสปริมาณ 500 หน่วย ลงในสารละลายแอมโมเนียปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่ซึ่งเตรียมในความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.8% จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหลืออยู่ ในขณะที่ผลของโซเดียมซัลไฟต์ต่อประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอส ก็ทำการทดลองเหมือนกัน แต่ใช้สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่มีความเข้มข้น 0-0.05%

5. การทดสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสที่มีต่อเสถียรภาพทางกลของน้ำยางพาราสด

ทำการทดสอบเบื้องต้นหาความเสถียรทางกลของน้ำยางพาราสดด้วยเครื่องหา MST (Mechanical stability time) ยี่ห้อ Klaxon การทดลองนี้จะได้ทดลองเติมเอนไซม์ปริมาณ 500 หน่วย ในน้ำยางพาราสด 100 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ค่า MST ตามกระบวนการ แล้วเปรียบเทียบกับน้ำยางที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอส

6. การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis

6.1 การเตรียมน้ำยางพาราโปรตีนต่ำและแผ่นฟิล์มยางสำหรับใช้ในงานวิจัย

ผสมน้ำยางพาราสดกับโปรตีนในสัดส่วนโปรตีน 500 ยูนิ ตต่อน้ำยางพารา 100 ml พร้อมทั้งเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปปั่นบน เครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 45 °C 6 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำยาง 3.0 กรัม ลงใน Petridish ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่อน้ำยางกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอจน ทั่วจานแล้ว ก็ทำการอบที่อุณหภูมิ 45 °C จนกระทั่งแห้ง (น้ำหนัก คงที่) ลอกแผ่นฟิล์มยางเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ระหว่างรอการ วิเคราะห์ต่อไป

ทั้งนี้ฟิล์มยางดังกล่าว จะถูกเตรียมขึ้นทั้งสิ้น 3 สูตร ได้แก่

Control: น้ำยางพาราสด

MR10: น้ำยางพาราสด + โปรตีนจาก *B. subtilis* MR10

PRO: น้ำยางพาราสด + โปรตีน
PROTEX7L (เอนไซม์ทางการค้า)

6.2 การสกัดโปรตีนจากแผ่นฟิล์มยาง

บันทึกน้ำหนักแผ่นฟิล์มยางแห้ง จากนั้นทำให้แห้งตัวด้วยการ แขนในไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง ทำการสกัด โปรตีนออกมาด้วยสารละลาย HEPES-Tris บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 mM pH 7.6 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ดังกล่าว ประกอบไปด้วย 50mM HEPES-Tris (pH7.6) และเสริมด้วย 7M urea, 2M thiourea, 10 mM mercaptoethanol, 60 mM DTT, 4% CHAPS, 5mM EDTA-Na₂H₂O, 1% NP-40 และ 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride นำส่วนผสม เหล่านี้ไปเขย่าด้วยความถี่ที่สูงด้วยเครื่อง Sonicator เป็นเวลา 10 นาที และสุดท้ายจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยกเก็บสารละลายโปรตีน สารละลายโปรตีน ดังกล่าวนี้นี้ จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ระหว่างรอการ วิเคราะห์ต่อไป เพื่อให้ได้ตัวอย่างซีรัมมีความบริสุทธิ์มากขึ้น จะ ทำการกำจัดสิ่งเจือปนโดยใช้ 2-D Clean-Up Kit รุ่น Code No. 80-6483-51 (GE-Healthcare) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีนโดยใช้วิธี Micro assay ใช้ 2D-Quant Kit รุ่น Code No. 80-6483-56 (GE-Healthcare) ก่อนดำเนินการวิเคราะห์โปรตีน ด้วยเครื่องมือ 2-D gel electrophoresis จากศูนย์เครื่องมือ หน่วยวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6.3 การแยกโปรตีนมิติที่ 1 ด้วยวิธี IEF

เตรียมสารละลายสำหรับทำ IEF ปริมาตร 125 µl ซึ่ง ประกอบด้วยโปรตีนตัวอย่าง 6 µg, 20 mM DTT, 0.8% v/v IPG buffer และ rehydration stock solution จากนั้นถ่ายตัวอย่าง ลงไปใน strip holder ขนาด 7 cm บนเครื่อง Ettan IPGphor II และดำเนินการระบบตามโปรแกรมที่กำหนด ก่อนจะดำเนินการแยก โปรตีนในมิติที่ 2 ต่อไป

6.4 การแยกโปรตีนมิติที่ 2 ด้วยวิธี SDS-PAGE

ทำการ equilibrate IPG strip ก่อนทำ SDS-PAGE โดยแช่ IPG strip ลงในสารละลาย DTT (0.05 g ใน SDS equilibration buffer 5 ml) จากนั้นย้ายมาล้างในสารละลาย IAA (1.25 g ใน SDS equilibration buffer 5 ml) แต่ละขั้นตอนจะทำการเขย่า เป็นเวลา 15 นาที แช่ IPG strip ลงใน 1X SDS electrophoresis running buffer (tank buffer) เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อล้าง glycerol ที่เป็นองค์ประกอบใน SDS equilibration buffer ออก แล้ววาง strip ลงบน polyacrylamide gel ที่เตรียมไว้ เริ่มดำเนินการระบบ ด้วยโปรแกรม ตามที่กำหนดแล้วจึงย้อมสีโปรตีน

7. การทดสอบขึ้นรูปถุงมือยางทางการแพทย์

ทำการทดลองผลิตถุงมือยางทั้งสิ้น 4 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรจะมี องค์ประกอบพื้นฐานเหมือนกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่มีการบ่ม รวมด้วยเอนไซม์แตกต่างกัน ได้แก่

สูตรที่ 1 (Con) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมเอนไซม์)

สูตรที่ 2 (MR10) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรตีน
จาก *B. subtilis* MR10
(500 ยูนิต/ น้ำยาง 100 มิลลิลิตร)

สูตรที่ 3 (PRO) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรตีน
PROTEX7L (500 ยูนิต/ 100 มิลลิลิตร)

สูตรที่ 4 (SDS) : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + SDS (0.2% by vol.)

น้ำยางพารา (น้ำยางชั้น 60% DRC) จะผ่านการบ่มด้วย เอนไซม์และสารเคมีในแต่ละสูตรอย่างน้อย 6 ชั่วโมงก่อนที่นำไป ผสมกับสารเคมีของสูตรพื้นฐาน แล้วขึ้นรูป ถุงมือยางดังกล่าวนี้ จะถูกส่งไปวิเคราะห์คุณภาพเชิงกล ณ กรมวิทยาศาสตร์บริการ กรุงเทพมหานคร โดยวิเคราะห์แรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ย (นิวตัน) ความยืดเมื่อขาดเฉลี่ย (ร้อยละ) ทั้งก่อนและหลังบ่มแรง นอกจากนี่ยังวัดค่าความหนาของถุงมือ ณ ตำแหน่งที่กำหนดโดย มาตรฐาน มอก. 538-2548

ผลการวิจัย

เอนไซม์โปรตีนที่ผลิตขึ้นครั้งนี้ เป็นเอนไซม์ผงที่มีค่า กิจกรรมของเอนไซม์ประมาณ 100,000-120,000 Unit/กรัม และมีค่ากิจกรรมจำเพาะประมาณ 150 unit/มิลลิกรัมของโปรตีน เอนไซม์โปรตีนดังกล่าว ได้ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งผล การศึกษามีดังต่อไปนี้

1. ผลของแอมโมเนียและโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการทำงานของโปรตีน

เนื่องจากรูปแบบการใช้งานของโปรตีนในอุตสาหกรรม การผลิตถุงมือยางทางการแพทย์นั้น คาดว่า จะทำการผสมลงในน้ำ ยางพาราสดและบ่มทิ้งไว้ ซึ่งน้ำยางพาราสดนี้จะมีกรักษา สภาพ ด้วยการเติมแอมโมเนียหรือโซเดียมคลอไรด์ลงไป ดังนั้นจึงมี การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะที่มีสาร

ดังกล่าวเป็นส่วนผสม ผลการทดลองก็ได้แสดงดังภาพที่ 1 เห็นได้ว่าที่ระดับแอมโมเนีย 0.8% เอนไซม์เหลือความสามารถในการทำงานน้อยกว่า 20% เมื่อเทียบกับสภาพที่ไม่เติมแอมโมเนีย ซึ่งอาจเป็นเพราะค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงเกินไปจึงไม่สามารถทำงานได้เต็มที่ อย่างไรก็ตามถึงแม้ความสามารถในการทำงานจะลดลงแล้ว แต่ผู้วิจัยคาดว่าโครงสร้างเอนไซม์น่าจะยังคงสภาพอยู่ เพราะเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ดังกล่าว (ในสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 0.8%) มาหยดลงบนจานวันที่ผสมโปรตีนเคซีน (pH 7.0) แล้วทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ก็พบว่าโปรตีนเคซีนถูกย่อยจนกระทั่งเห็นแต่ไขมัน เหมือนกับการทำงานของโปรติเอสที่ไม่มีการเติมแอมโมเนีย ดังแสดงในภาพที่ 2 เหตุการณ์นี้ยืนยันว่าโปรติเอสยังคงสภาพอยู่และสามารถกลับมาทำงานได้อีกครั้งเมื่ออยู่ในสภาพ pH ที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตาม ในการปฏิบัติงานจริง ผู้วิจัยเสนอว่า ไม่ควรใช้แอมโมเนียในการรักษาสภาพน้ำยางสด เพราะทำให้โปรติเอสทำงานได้ไม่เต็มที่ ในขณะที่กิจกรรมของโปรติเอสเมื่อใช้โซเดียมซัลไฟต์เป็นสารรักษาสภาพน้ำยางนั้น พบว่าโซเดียมซัลไฟต์กลับทำให้การทำงานของโปรติเอสสูงขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 3 และเมื่อนำมาหยดในจานผสมเคซีน ก็พบว่าโปรติเอสสามารถทำงานได้ไม่แตกต่างกับโปรติเอสที่ไม่ผ่านการเติมโซเดียมซัลไฟต์ ดังแสดงในภาพที่ 4 ดังนั้นการรักษาสภาพน้ำยางในระหว่างการบ่มน้ำยางพาราสดร่วมกับเอนไซม์ควรใช้สารโซเดียมซัลไฟต์มากกว่าแอมโมเนีย

2. การทดสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสที่มีต่อเสถียรภาพทางกลของน้ำยางพาราสด

เอนไซม์โปรติเอสที่เติมลงไปในน้ำยางพาราสดอาจจะส่งผลให้น้ำยางเสียสภาพและไม่สามารถนำไปใช้งานได้ จึงมีการทดสอบเบื้องต้นหาความเสถียรทางกลของน้ำยางพาราสดเมื่อมีการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 ที่พบว่าเอนไซม์ไม่ทำให้ค่า MST ของน้ำยางพาราสดลดลง ทั้งยังมีค่าสูงขึ้นกว่าน้ำยางที่ไม่เติมเอนไซม์ จึงอาจจะสรุปได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมขึ้นนี้ไม่ได้ปัจจัยที่ทำให้น้ำยางพาราสดเสียสภาพ

3. การวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราโปรตีนต่ำด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis

การทดลองสกัดโปรตีนจากแผ่นฟิล์มยางพาราเพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis นั้น พบว่าสารละลาย HEPES buffer มีประสิทธิภาพในการสกัดมากเมื่อเทียบกับการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ซึ่งเคยใช้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังแสดงในภาพที่ 5 โดยจะเห็นว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏจากการสกัดด้วย HEPES buffer มีความเข้มกว่าการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นสารสกัด สารละลายโปรตีนที่สกัดจากแผ่นฟิล์มยางพาราชนิดต่างๆ นี้ จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ต่อไป ซึ่งผลการวิเคราะห์ก็แสดงดังภาพที่ 6-8 โดยจะเห็นว่าน้ำยางพาราสดมีโปรตีนชนิดต่างๆ เป็นองค์ประกอบที่หลากหลาย โดยมีขนาดโมเลกุลและค่า pI ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ มีโปรตีนหลายชนิดที่มีปริมาณสูงจนสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเมื่อทำการย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue (ภาพที่ 6A) เรียกโปรตีนกลุ่มนี้

ว่า “high abundant proteins) ในขณะที่น้ำยางพาราที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอส MR10 จากงานวิจัยนี้ ก็จะพบว่าโปรตีนกลุ่ม high abundant ได้หายไปทั้งหมด (ภาพที่ 7A) เหลือเพียงโปรตีนบางชนิดในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ต้องใช้เครื่องมือ Image scanner ช่วยในการตรวจสอบ เรียกโปรตีนกลุ่มนี้ว่า “low abundant proteins” (ภาพที่ 7B) ซึ่งอาจเป็นเพียงโปรตีนที่ปนเปื้อนมาจากสารละลายเอนไซม์โปรติเอส MR10 ก็เป็นไปได้ (เปรียบเทียบกับภาพ 6B) ผลการทดสอบดังกล่าวนี้ ค่อนข้างยืนยันได้ถึงประสิทธิภาพของโปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ว่าสามารถกำจัดโปรตีนในน้ำยางพารา รวมถึงโปรตีนภูมิแพ้ชนิดต่างๆ โดยไม่จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ต่อไปด้วย เครื่องมือ MALDI-TOF MS เช่นเดียวกับการย่อยโปรตีนในน้ำยางพาราด้วยโปรติเอสในทางการค้า ที่ที่พบว่าประสิทธิภาพสูงใกล้เคียงกับโปรติเอสจากแบคทีเรีย MR10 (ภาพที่ 8A) แต่ภาพจาก Image scanner ก็แสดงให้เห็นว่าพบโปรตีนชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้นมา (ภาพที่ 8B) ซึ่งอาจจะไม่ใช่โปรตีนจากน้ำยางพารา (เปรียบเทียบกับภาพ 6B) ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเป็นโปรตีนปนเปื้อนมาจากสารละลายเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าเช่นกัน

4. การขึ้นรูปถุงมือยางทางการแพทย์

ภายหลังทดลองผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยน้ำยางชั้นที่ผ่านการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสแล้วก็พบว่าสามารถขึ้นรูปถุงมือยางได้ ดังแสดงในภาพที่ 9 โดยถุงมือแต่ละสูตรก็มีลักษณะทางกายภาพไม่ว่าจะเป็นสี ความหนา ความยืดหยุ่น ที่แตกต่างกัน ดังบรรยายไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าน้ำยางที่ผ่านการบ่มร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสทั้งจากงานวิจัยนี้และทางการค้าล้วนทำให้ได้ถุงมือที่มีความหนาน้อยกว่าสูตรพื้นฐานและสูตรที่เติมสาร SDS แต่ลักษณะความเหนียวและความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับถุงมือยางสูตรพื้นฐาน

เมื่อนำถุงมือที่ผลิตขึ้นไปทำการวิเคราะห์ค่าแรงดึงที่จุดขาดและความยืดเมื่อขาด ณ กรมวิทยาศาสตร์บริการ ผลการวิเคราะห์ก็ได้แสดงดังตารางที่ 4 ซึ่งพบว่าแรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ยทั้งก่อนและหลังบ่มแรงของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอสของงานวิจัยนี้มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับถุงมือสูตรอื่นๆ ในขณะที่ค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยก่อนบ่มแรงของถุงมือทุกสูตรมีความแตกต่างกันแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) แต่ภายหลังการบ่มแรงแล้วค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยมีค่าสูงกว่าสูตรพื้นฐานและสูตรที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่บ่มร่วมกับโปรติเอสทางการค้า ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ข้อมูลก็ยังได้พบข้อมูลที่น่าสนใจอีกหนึ่งประการคือ ภายหลังการบ่มแรงแล้วค่าแรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ยของถุงมือจากน้ำยางโปรตีนต่ำจากโปรติเอส MR10 มีค่าเพิ่มสูงขึ้นในขณะที่สูตรพื้นฐานและสูตรที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่บ่มร่วมกับโปรติเอสทางการค้ากลับมีค่าที่ลดลง ค่าความยืดเมื่อขาดเฉลี่ยก็เช่นเดียวกัน ที่ถุงมือสูตรน้ำยางโปรตีนต่ำจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงสูตรเดียวที่มีค่าที่แทบจะไม่เปลี่ยนแปลง

วิจารณ์ผลการทดลอง

เอนไซม์โปรติเอสเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถถูกทำให้เสียสภาพ (Denaturation) ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม สารเคมีก็เป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ ดังนั้นเมื่อพิจารณาในกระบวนการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ซึ่งเป็นกลุ่มอุตสาหกรรมเป้าหมายที่จะนำโปรติเอสจากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้แล้ว ก็จะต้องพิจารณาการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปในน้ำยางพาราสดก่อนการปั่นเหวี่ยงเป็นน้ำยางข้น น่าจะเป็นขั้นตอนที่เหมาะสมที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม น้ำยางพาราสดนั้นจะต้องมีการเติมสารรักษาสภาพชนิดต่างๆ ลงไป ผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีแอมโมเนียสูง (High-ammonia; HA) 0.8% นั้นโปรติเอสจะมีประสิทธิภาพการทำงานที่ลดลง คาดว่าน่าจะเกิดจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงมากเกินไป (ประมาณ 11-12) ที่ทำให้โครงสร้าง (conformation) ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป แต่ในขณะที่โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 นี้ทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 6-7 ดังนั้นโซเดียมซัลไฟท์น่าจะเหมาะสำหรับรักษาสภาพน้ำยางที่เหมาะสมมากกว่าแอมโมเนีย เพราะไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอสให้สูงขึ้นด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Kunert (1992) และ Laba and Szczekala (2013)

โดยปรกติแล้วน้ำยางพาราสดยังคงสภาพอยู่ได้ด้วยปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ (1) ชั้นโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคน้ำยาง (2) อนุโมลของหมู่ Carboxylate บนพื้นผิว ที่ก่อให้เกิดการผลักกันของอนุภาคน้ำยาง (วรารณ, 2549) การเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปในน้ำยางพาราสดจะทำให้เกิดเป็นข้อกังวลว่าอาจทำให้น้ำยางพาราเสียสภาพก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตต่อไป อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองครั้งนี้ก็ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 นี้ไม่ทำให้น้ำยางเกิดการเสียสภาพ ซึ่งมีหลายรายงานที่ได้กล่าวถึงการเติมเอนไซม์โปรติเอสเพื่อกำจัดโปรตีนในน้ำยางพาราสด แต่ก็ไม่มียางพาราสดที่เสียสภาพของน้ำยางพาราไม่ว่าจะเป็นรายงานของ ไพโรจน์ และ พรสิทธิ์ (2540), Klinklai et al. (2003), Rattanasom et al. (2005), George et al. (2009) ดังนั้นน่าจะกล่าวได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปยางพาราได้

ในการวิเคราะห์โปรตีนในน้ำยางพาราสดและน้ำยางพาราโปรตีนต่ำในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองให้ลดปัจจัยที่ก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนในประเด็นต่างๆ ผู้วิจัยตระหนักดีว่าน้ำยางพาราสดที่จะใช้เป็นตัวอย่างสำหรับตรวจวิเคราะห์นั้น ไม่สามารถจัดหาได้ตลอดทั้งปีและไม่สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน ผู้วิจัยจึงแก้ไขปัญหาด้วยการเตรียมน้ำยางพาราด้วยสูตรต่างๆ ให้เป็นรูปแบบฟิล์มบางเสียก่อน แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีตัวอย่างที่เพียงพอสำหรับศึกษาตลอดเวลา อีกทั้งจะเป็นที่ยอมรับว่าเป็นตัวอย่างชุดเดียวกันอีกด้วย แผ่นฟิล์มดังกล่าวที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร มีความหนาประมาณ 0.15 มิลลิเมตร ดังนั้นโปรตีนที่สกัดได้จากแผ่นฟิล์มยางก็จะเป็นโปรตีนทั้งจากชั้นซีรัมและอนุภาคเนื้อเยื่อของกระบวนการสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อทำให้ค่อนข้างยาก ซึ่งส่วนใหญ่ทำได้โดยการใช้สารละลาย PBS หรือ TES บัฟเฟอร์เป็นสารสกัดตามวิธีมาตรฐานของ ISO 12243:2003 แต่ในมาตรฐานของ

ASTM D5712-95 ให้น้ำปราศจากไอออนเป็นสารสกัด (พร้อมคัทรี, 2550; Yeang et al., 2004) แต่ผู้วิจัยพบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากการใช้สารเหล่านี้มีค่อนข้างน้อย จึงได้มีการดัดแปลงเทคนิคการสกัดจากวิธีการของ Xiang et al. (2012) พร้อมกับมีการเพิ่มอัตราสารสกัดจากการเพิ่มพื้นที่แผ่นฟิล์มยางด้วยการแช่ในไนโตรเจนเหลวและบดด้วยโกรง ด้วยเทคนิคเหล่านี้ จึงทำให้สามารถสกัดโปรตีนจากฟิล์มได้สูงกว่า 3-4 เท่า เมื่อเทียบกับการใช้ PBS และน้ำเป็นสารสกัด ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้ก็มีความมั่นใจที่สูงขึ้นว่าเป็นตัวอย่างโปรตีนทั้งหมดที่พบได้ในน้ำยางพารา

เมื่อพิจารณาที่คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของถุงมือทางการแพทย์ที่ผลิตขึ้นจากน้ำยางโปรตีนต่ำที่ผ่านการบ่มด้วยโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 เทียบกับมาตรฐานถุงมือยางปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว (มอก. 538-2548) ก็จะพบว่ากระบวนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการนี้ทำให้ได้ความหนาที่ยังสูงกว่ามาตรฐานประมาณ 4-5 เปอร์เซ็นต์ แม้ไม่ได้เติมสารช่วยจับตัว (coagulants) ก็ตาม ค่าความยืดเมื่อขาดก่อนและหลังบ่มแรงสูงกว่ามาตรฐานประมาณ 20 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ค่าแรงดึงเมื่อขาดก่อนและหลังบ่มแรงกลับต่ำกว่ามาตรฐานประมาณ 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ถุงมือสูตรพื้นฐานและสูตรที่บ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าก็มีค่าแรงดึงเมื่อขาดทั้งก่อนและหลังบ่มที่ต่ำกว่ามาตรฐานเช่นกัน แต่ต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย ผู้วิจัยคาดว่าค่าที่ต่ำกว่ามาตรฐานนี้อาจจะเกิดจากเทคนิคการขึ้นรูปถุงมือยางของผู้วิจัยเองที่ยังไม่เชี่ยวชาญ แต่ข้อมูลที่น่าสนใจที่พบได้จากผลการวิเคราะห์นี้คือ ค่าความยืดเมื่อขาดของถุงมือที่ผลิตจากการบ่มด้วยโปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 นั้นแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงภายหลังการบ่มแรง ซึ่งคุณสมบัตินี้ไม่พบในถุงมือสูตรใดในการทดลองครั้งนี้ รวมทั้งรายงานอื่นๆ เช่น ไพโรจน์และพรสิทธิ์ (2540) ที่ก็พบว่ายางโปรตีนต่ำที่ผลิตขึ้นจากการเติมเอนไซม์โปรติเอส (alkalase) ก็มีค่าความยืดเมื่อขาดที่ลดลงภายหลังการบ่มแรง นี่อาจจะเป็นข้อดีของการใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือยางก็เป็นได้ ทั้งนี้กระบวนการพัฒนาคุณภาพถุงมือยางที่ใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10 ร่วมในกระบวนการผลิตยังคงต้องมีการพัฒนาต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยครั้งนี้รวมถึงผลงานวิจัยที่ผ่านมา (RDG5650082) สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 มีความสามารถในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ชนิด Rubber elongation factor (REF; Hev b1) Small rubber particle protein (SRPP; Hev b3) และ Acidic protein (Hev b5) ซึ่งเป็นโปรตีนภูมิแพ้ชนิดรุนแรงในคนได้ ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นๆ นั้นก็พบว่าสามารถถูกกำจัดได้เช่นเดียวกันเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าน้ำยางพาราโปรตีนต่ำที่ผลิตด้วยโปรติเอสชนิดนี้มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งานอีกทั้งไม่ทำให้น้ำยางพาราเสียสภาพ แต่ถุงมือทางการแพทย์ที่ผลิตจากน้ำยางโปรตีนต่ำยังมีคุณสมบัติบางประการที่ต่ำกว่ามาตรฐานถุงมือปราศจากเชื้อสำหรับการศัลยกรรมชนิดใช้ครั้งเดียว (มอก. 538-2548) ซึ่งต้องมีพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- พร้อมศักดิ์ สงวนธำรงค์. “การเปรียบเทียบวิธีทดสอบมาตรฐานการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในผลิตภัณฑ์จากน้ำยาง: วิธีไหนดีที่สุด” *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการยาง*, 2550, 1, 18-22.
- ไพโรจน์ กลิ่นพิทักษ์ และ พรสิทธิ์ วงศ์บุญทริก. “การเตรียมและสมบัติบางประการของยางโปรตีนต่ำ”. *วารสารสงขลานครินทร์*, 19(2540): 223-229.
- วรารณ ขจรไชยกุล. 2549. ยางธรรมชาติ: การผลิตและการใช้งาน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ซีโน ดีไซน์, กทม.
- George, K.M., Alex, R., Joseph, S. and Thomas, K.T. 2009. Characterization of enzyme-deproteinized skim rubber. *Journal of Applied Polymer Science* 114: 3319-3324.
- 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.
- Kunert, J. 1992. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses* 35: 343-348.
- Laba, W. and Szczekala, K.B. 2013. Keratinolytic proteases in biodegradation of pretreated feathers. *Pol. J. Environ. Stud.* 22: 1101-1109.
- Rattanasom, N., Thammasiripong, U. and Suchiva, K. 2005. Mechanical properties of deproteinized natural rubber in comparison with synthetic *cis*-1,4 polyisoprene vulcanizates: gum and black-filled vulcanizates. *Journal of Applied Polymer Science* 97: 1139-1144.
- Perrella, F.W., and Gaspari, A.A. 2002. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. *Methods* 27: 77-86.
- Sussman, G.L., Beezhold, D.H., and Kurup, V.P. 2002. Allergens and natural rubber proteins. *J Allergy Clin Immunol.* 110: S33-S39.
- Xiang, Q, Xia, K., Dai, L., Kang, G., Li, Y., Nie, Z., Duan, C. and Zeng, R. 2012. Proteome analysis of the large and the small rubber particles of *Hevea brasiliensis* using 2D-DIGE. *Plant Physiology and Biochemistry* 60: 207-213

ตารางที่ 1 แสดงสูตรพื้นฐานที่ใช้ในการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์

องค์ประกอบ	ปริมาณที่ใช้
น้ำยางชั้น 60%	167
20 % Potassium oleate	1
10 % KOH	3
50% กำมะถัน	0.4
50% TMTD	1
50% ZDEC	2
50% ZnO	0.5
50% Antioxidant	2

ตารางที่ 2 แสดงค่า MST ของน้ำยางพาราสดที่เติมและไม่เติมเอนไซม์โปรติเอสลงไป

ตัวอย่าง	MST (Sec.)
น้ำยางพาราสด	50
น้ำยางพาราสด+โปรติเอส (500 U/100 ml)	74

ตารางที่ 3 การบรรยายลักษณะของถุงมือยางที่ผลิตได้ในแต่ละสูตร

สูตร	ความหนา (mm) $\pm$ SD	ลักษณะปรากฏ
สูตร 1 : สูตรพื้นฐาน	0.188 $\pm$ 0.014	ถุงมือมีความหนากว่าถุงมือที่มีวางขายในท้องตลาดและเหนียว
สูตร 2 : +โปรติเอส (MR10)	0.145 $\pm$ 0.008	ได้ถุงมือที่มีความหนาเทียบเท่ากับถุงมือที่มีวางขายในท้องตลาด และมีความเหนียว
สูตร 3 : +โปรติเอส (PROTEX7L)	0.149 $\pm$ 0.008	ได้ถุงมือที่มีความหนาเทียบเท่ากับถุงมือที่มีวางขายในท้องตลาด และมีความเหนียว
สูตร 4 : +SDS	0.295 $\pm$ 0.014	ได้ถุงมือที่มีความหนามากกว่าสูตรที่ 1 แต่สังเกตว่าไม่มีความเหนียวเท่าสูตรอื่นๆ และขาดง่ายกว่า

หมายเหตุ: ความหนาของถุงมือ ได้ทำการวัดที่ตำแหน่งฝ่ามือ และทำการวัดจำนวน 9 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4 สรุปผลการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงกลของถุงมือยางแต่ละสูตร

สูตร	แรงดึงที่จุดขาดเฉลี่ย (นิวตัน)			ความยืดเมื่อขาดเฉลี่ย (ร้อยละ)		
	ก่อนบ่มแรง	หลังบ่มแรง	%ความแตกต่าง	ก่อนบ่มแรง	หลังบ่มแรง	%ความแตกต่าง
CON	10.5 $\pm$ 2.6 ^b	8.9 $\pm$ 3.3 ^b	-15.5	871.1 $\pm$ 45.2 ^a	816.1 $\pm$ 69.1 ^b	-6.37
MR10	4.2 $\pm$ 1.2 ^c	5.1 $\pm$ 0.87 ^c	+30.4	839.5 $\pm$ 34.7 ^a	839.4 $\pm$ 105.9 ^{ab}	+1.08
PRO	10.1 $\pm$ 1.7 ^b	9.1 $\pm$ 2.6 ^b	-9.6	859 $\pm$ 48.7 ^a	826.8 $\pm$ 36.2 ^b	-3.63
SDS	20.1 $\pm$ 4.2 ^a	20.9 $\pm$ 4.6 ^a	+5.6	880.7 $\pm$ 34.6 ^a	873.5 $\pm$ 52.4 ^a	-0.83

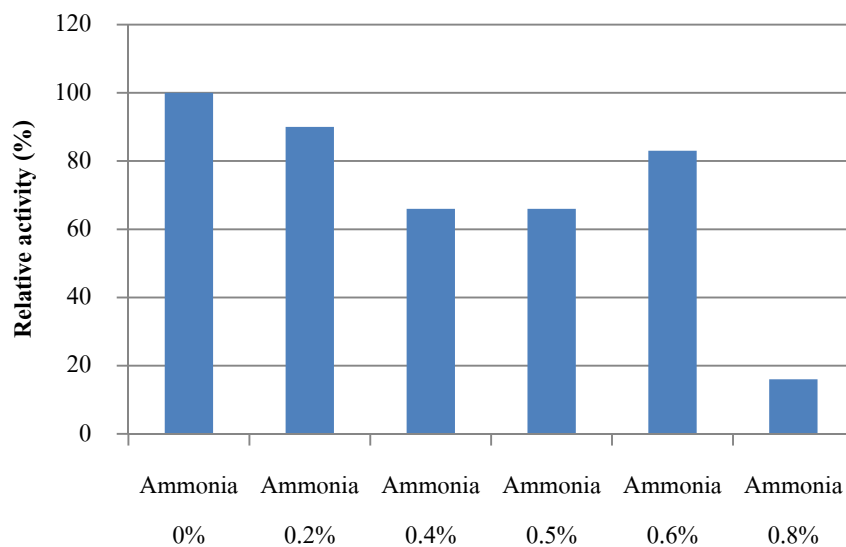
หมายเหตุ: สูตร CON : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมเอนไซม์)

สูตร MR10 : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* MR10

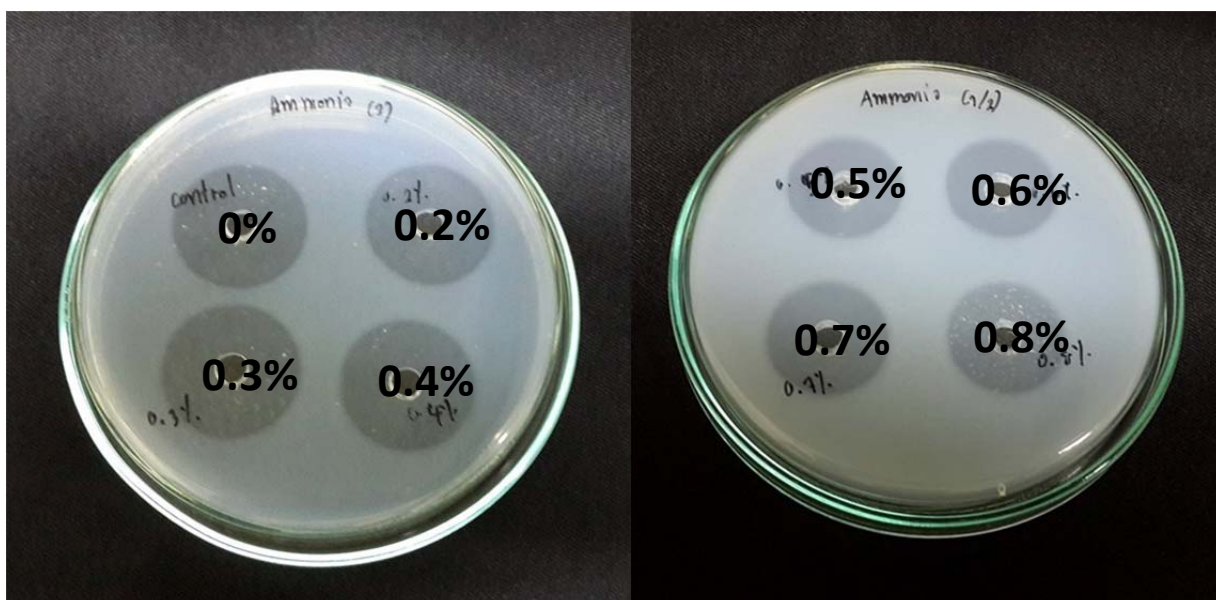
สูตร PRO : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรติเอส PROTEx7L

สูตร SDS : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + SDS

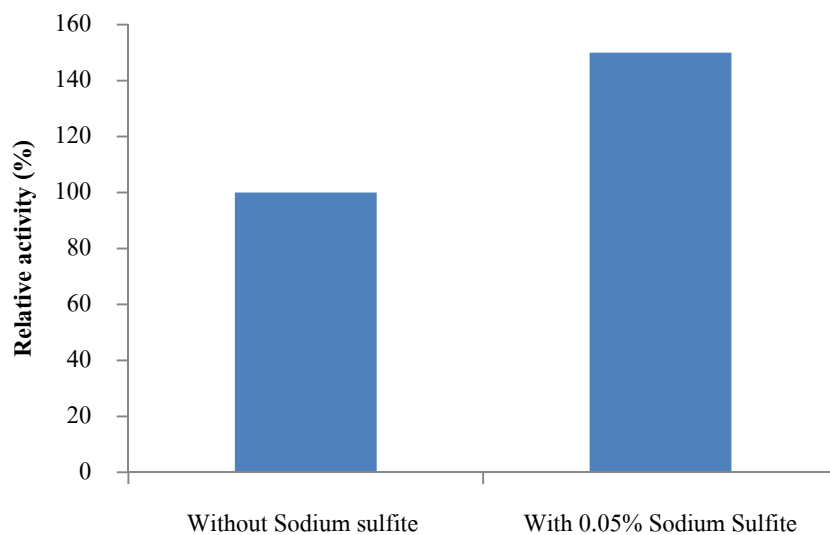
ตัวอักษรที่ต่างกัน (^{a, b, c, d}) หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$



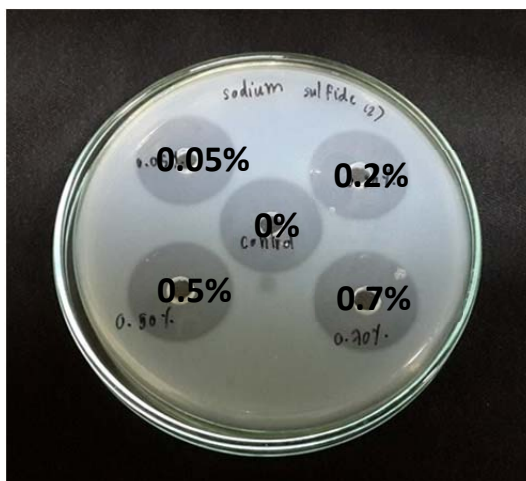
ภาพที่ 1 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไคโรติเอสในสภาวะที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นระดับต่างๆ



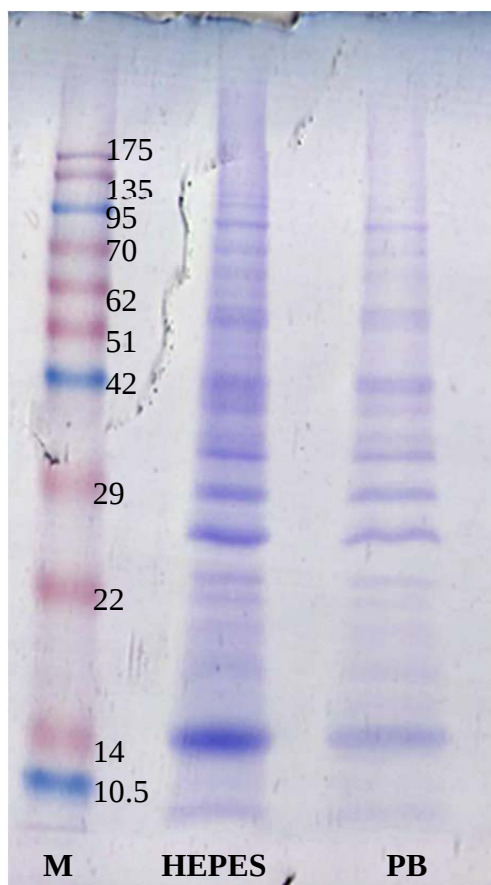
ภาพที่ 2 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไคโรติเอสในสภาวะที่มีแอมโมเนียความเข้มข้นระดับต่างๆ



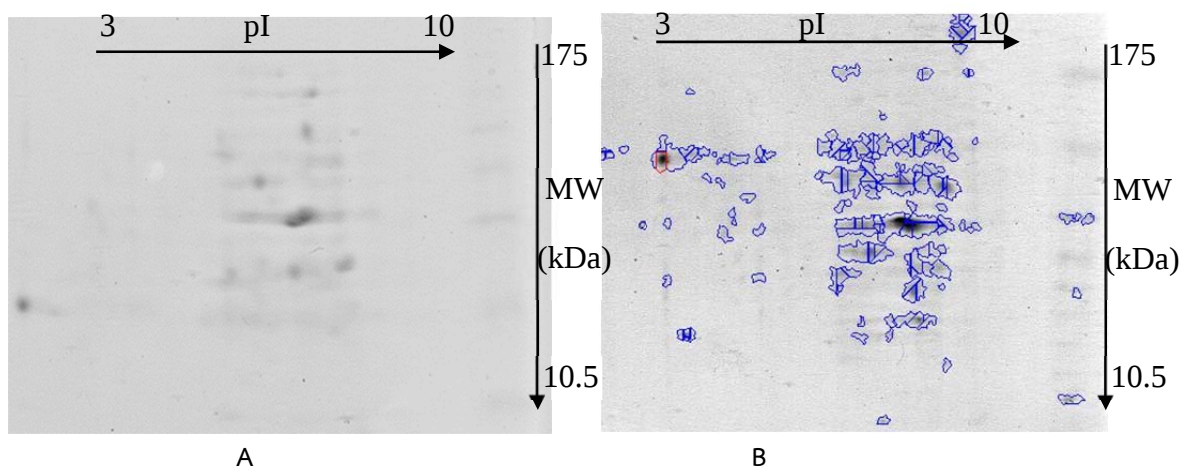
ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.05%



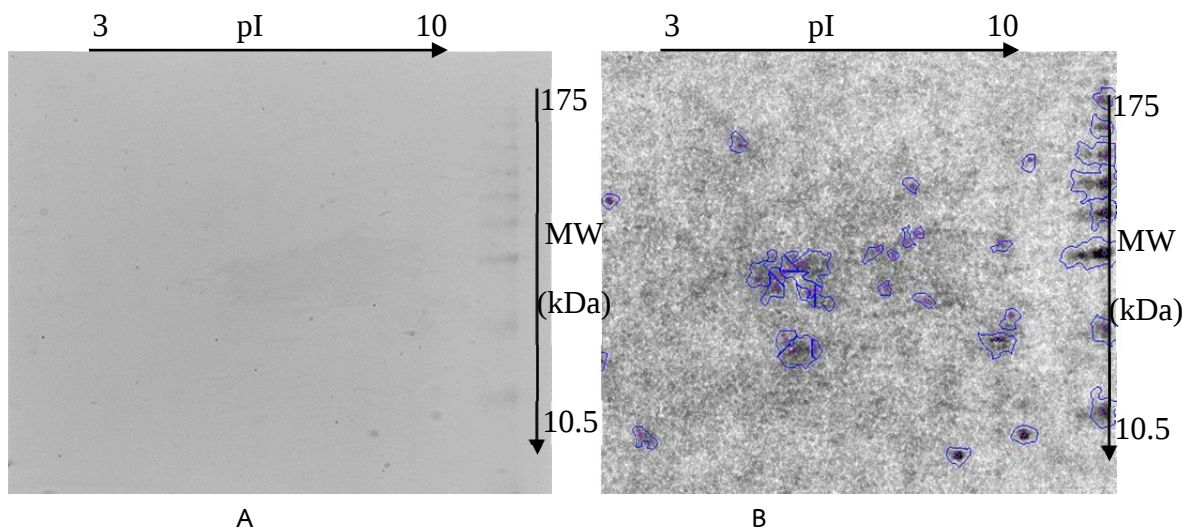
ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่มีสารละลายโซเดียมซัลไฟต์



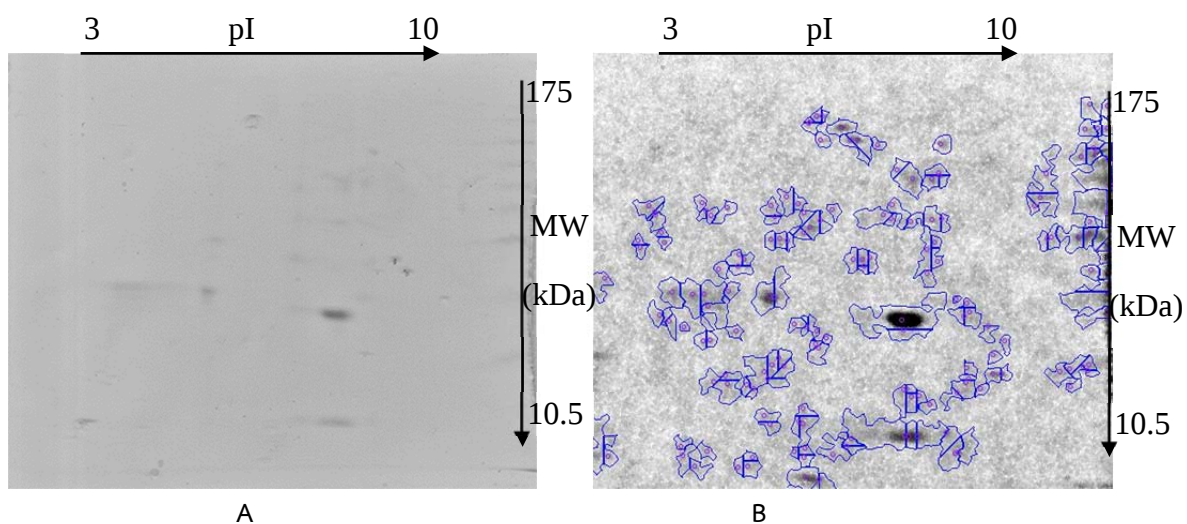
ภาพที่ 5 แสดงการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากแผ่นฟิล์มยางที่ถูกสกัดด้วย HEPES และ Phosphate buffer



ภาพที่ 6 การกระจายตัวของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราสดเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis โดย (A) คือภาพจากการย้อมสี (B) คือภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Image scanner



ภาพที่ 7 การกระจายตัวของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราที่บ่มด้วยโปรตีนจาก *B. subtilis* MR10 เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis โดย (A) คือภาพจากการย้อมสี (B) คือภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Image scanner



ภาพที่ 8 การกระจายตัวของโปรตีนในตัวอย่างน้ำยางพาราที่บ่มด้วยโปรตีนจากการค้า (PROTEX7L) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 2D gel electrophoresis โดย (A) คือภาพจากการย้อมสี (B) คือภาพจากการวิเคราะห์ด้วย Image scanner



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของถุงมือที่ผลิตได้ด้วยสูตรต่างๆ

หมายเหตุ: สูตร CON : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมเอนไซม์)

สูตร MR10 : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรตีนจาก *B. subtilis* MR10

สูตร PRO : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + เอนไซม์โปรตีนจาก PROTEX7L

สูตร SDS : ถุงมือจากสูตรพื้นฐาน + SDS