บทคัดย่อ

งานวิจัยชุดนี้ประกอบด้วยโครงการย่อยจำนวน 2 โครงการ ได้แก่ โครงการการขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับกึ่งอุตสาหกรรมเพื่อประยุกต์ใช้ในการเตรียมน้ำยางพาราปราศจากโปรตีนภูมิแพ้ และโครงการการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* MR10 เพื่อพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์ในการกำจัดโปรตีนภูมิแพ้ในน้ำยางพารา โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย Bacillus subtilis MR10 ในระดับกึ่งอุตสาหกรรม และทดสอบการใช้เอนไซม์โปรติเอสร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ ผลการศึกษาพบว่าสามารถขยายกำลังการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* MR10 ในถังหมักขนาด 20 ลิตรได้ โดยมีค่าผลได้ของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาจากโครงการ RDG5650081 ประมาณ 3-3.8 เท่า โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 28-30 ^{o}C ให้อากาศที่ระดับ 1.0 kg/cm^2 และมีการกวนด้วยใบพัดในอัตราเร็ว 150 rpm การหมักรูปแบบกึ่งกะให้ค่าผลได้สูงกว่าการหมักแบบกะประมาณ 20% ต้นทุนการผลิตเอนไซม์จากการหมักแบบกึ่งกะต่ำกว่าการหมักแบบกะประมาณ 3 เท่า จากการศึกษายังพบว่าเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสสองชนิด คือ เอนไซม์โปรติเอส 1 (P1) และ เอนไซม์โปรติเอส 2 (P2) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 และ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เอนไซม์ P1 และ P2 ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9.0 และ 8.0 ขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานคือ 45-55 และ 45-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ P1 และ P2 ยังมีเสถียรภาพได้ที่ช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 5.0-10.0 และ 7.0-10.0 ตามลำดับ ค่าจลนพลศาสตร์ K_m และ V_{max} ของ P1 มีค่าเท่ากับ 8.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 3840 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ขณะที่ค่าดังกล่าวของ P2 มีค่าเท่ากับ 13.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5302 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที โปรติเอสทั้งสองชนิดมีความจำเพาะกับเคซีนเหมือนกัน การนำเอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ควรปรับสภาวะของกระบวนการผลิตนั้นๆ ให้ใกล้เคียงกับสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ เพื่อให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานสูงสุด อันได้แก่ อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 8.0-9.0 และไม่เกิน 10.0 กระบวนการผลิตต้องปราศจากสารเคมีกลุ่ม Ag^{+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, EDTA และ SDS ผลจากการศึกษายังพบอีกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดนี้มี 2 กลุ่ม ซึ่งให้ชื่อว่า P1 และ P2 นอกจากนี้ ยังพบว่าการเติมเอนไซม์โปรติเอสร่วมในกระบวนการผลิตถุงมือยางทางการแพทย์ด้วยสูตรมาตรฐานของโรงงาน ส่งผลต่อการวัลคาไนซ์ของยาง โดยค่าแรงดึงและค่า stress at 300% ไม่ผ่านมาตรฐาน ISO และ ASTM D3578-05 (Rubber examination glove) ดังนั้นหากใช้เอนไซม์โปรติเอสจากงานวิจัยนี้เพื่อผลิตเป็นถุงมือที่ปราศจากโปรตีนภูมิแพ้แล้ว โรงงานจำเป็นต้องปรับสูตรหรือหาสภาวะในการวัลคาไนซ์ยาง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติผ่านมาตรฐาน

Abstract

This research program composes of 2 research projects, including the semi-pilot up-scaling process of protease production for applying in allergic protein-free rubber latex preparation and the characterization of *Bacillus subtilis* MR10 proteases for utilizing process development in industrial scale production of this enzyme. The main objectives of this program involve the development of protease enzyme production from bacterial Bacillus subtilis MR10 in the semi-pilot scale and to test for the application of protease in the manufacturing of medical glove. The results from these research found that the the production of protease from B. subtilis MR10 could be up-scaled in 20L fermenter. Approximately 3.0-3.38 times of protease productivity comparing to that from the project RDG5650081 was obtained. The optimal conditions for protease production were under the temperature at 28-30 °C, aeration at 1.0 kg/cm^2, agitation at 150 rpm. The productivity obtained from semi-batch fermentation was about 20% higher than batch fermentation. The production cost of semi-batch fermention was also lower than batch fermentation about 3 times. According to our study, it was also found that crude protease consisted of two proteases, Protease 1 (P1) and Protease 2 (P2). The molecular weights of P1 and P2 were approximately 45 and 30 kDa. The optimal pH for the P1 and P2 activity was 9.0 and 8.0 while the optimal temperatures were 45-55 and 45-50°C, respectively. P1 and P2 were stable at pH range of 5.0-10.0 and 7.0-10.0, respectively. Kinetic parameters K_m and V_{max} of P1 were 8.0 mg·ml^{-1} and 3840 µg·ml^{-1}·min^{-1} respectively, while those of P2 were 13.8 mg·ml^{-1} and 5302 µg·ml^{-1}·min^{-1}. The use of this protease in any manufacturing should be under the optimal conditions of protease to maximize the enzyme efficiency, i.e. temperature at 45-55°C, pH 8.0-9.0 and not higher than 10.0 and free from Ag^+, Hg^{2+}, Cu^{2+}, EDTA and SDS. Moreover, the application of protease in the manufacturing of medical glove negatively effected on the rubber vulcanization. The tensile and stress at 500% did not meet to the standard of ISO and ASTM D3578-05 (Rubber examination glove). Thus the glove formula and vulcanization conditions must be optimized when this protease is applied, to obtain the higher quality product.